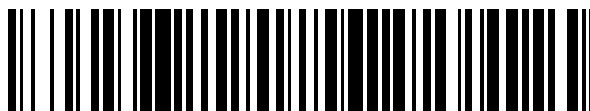


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 205**

51 Int. Cl.:

C08L 89/00 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C08L 89/06 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01)

C08J 9/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2013 E 17181156 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 3255106**

54 Título: **Colágeno modificado**

30 Prioridad:

09.01.2012 EP 12150527
20.11.2012 GB 201220868

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.10.2019

73 Titular/es:

INNOCOLL PHARMACEUTICALS LIMITED
(100.0%)
Unit 9, Block D, Monksland Business Park,
Monksland, Athlone
Co. Roscommon, IE

72 Inventor/es:

MYERS, MICHAEL y
DIETRICH, ALEXANDRA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 728 205 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Colágeno modificado

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un colágeno modificado que se puede obtener proporcionando colágeno aislado; congelando el colágeno aislado; deshidratando el colágeno congelado; y madurando el colágeno deshidratado. Se describen también métodos de fabricación del colágeno modificado y usos de los mismos.

Fundamento de la invención

10 Los procesos para la preparación de materiales con base de colágeno para usar en medicina humana y veterinaria secando o liofilizando dispersiones de colágeno acuosas para crear membranas o esponjas se conocen bien en la técnica. Se conoce también el uso de películas o membranas con base de colágeno como barreras biodegradables temporales para separar superficies tisulares traumatizadas yuxtapuestas después de cirugía para prevenir o reducir la formación de adhesiones postoperatorias.

15 Típicamente, el colágeno usado para la posterior fabricación de los materiales con base de colágeno se aísla primero mediante extracción a partir de piel o tendón de mamífero, se purifica, se trata enzimáticamente para eliminar los telopéptidos no helicoidales, se solubiliza parcialmente con ácido y finalmente se precipita aumentando el pH para dar una dispersión acuosa de colágeno fibrilar purificado. Una vez aislada, la dispersión de colágeno puede procesarse adicionalmente para la fabricación de materiales con base de colágeno inmediatamente, o se almacena de otra forma mientras espera el procesamiento adicional. Por conveniencia de almacenaje a escala comercial, la dispersión de colágeno se concentra normalmente mediante la eliminación de agua usando centrifugado para reducir el volumen y crear así una masa húmeda. La masa húmeda debe almacenarse congelada para conservar el colágeno y evitar el crecimiento bacteriano. Cuando se necesite para la fabricación de materiales con base de colágeno, la masa húmeda de colágeno congelado típicamente se descongela y se vuelve a dispersar. Tanto si el colágeno aislado se usa inmediatamente o se congela y descongela como una masa húmeda, la dispersión de colágeno es generalmente viscosa y difícil de procesar a escala comercial en membranas con base de colágeno o esponjas liofilizadas. Lo que se necesita es un método para reducir la viscosidad de la dispersión de colágeno sin dilución adicional, ya que reducir la concentración de colágeno en la dispersión solo aumentará la cantidad de agua que debe eliminarse en el secado o liofilizado posterior, que es tanto ineficaz como costoso a escala comercial.

20 Por lo tanto, el objeto de la presente invención es modificar el colágeno aislado de tal forma que se reduzca la viscosidad de la dispersión, pero sin comprometer las propiedades de los materiales con base de colágeno hechos de la misma. Preferiblemente, un objeto adicional de la presente invención es modificar el colágeno de tal forma que se reduzca la viscosidad de la dispersión y también se mejoren las propiedades de una membrana de colágeno hecha de la misma para usar como una barrera a la adhesión postoperatoria.

25 Estos objetos se resuelven según la presente invención proporcionando un colágeno modificado que facilita la fabricación eficaz de materiales con base de colágeno a escala comercial y mejora la eficacia potencial de esos materiales en el campo de la medicina humana y veterinaria.

Compendio de la invención

30 La invención es como se reivindica en las reivindicaciones 1-11.

40 Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un colágeno modificado que se puede obtener proporcionando colágeno aislado, opcionalmente una dispersión de colágeno aislado; congelando el colágeno aislado; y deshidratando el colágeno congelado.

Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un colágeno modificado que se puede obtener proporcionando colágeno aislado, opcionalmente una dispersión de colágeno aislado; congelando el colágeno aislado; deshidratando el colágeno congelado; y madurando el colágeno deshidratado.

45 Por el término "dispersión" se entiende una mezcla en que las partículas de colágeno están dispersas en un medio fluido, opcionalmente un medio líquido, más opcionalmente un medio acuoso. Las partículas de colágeno pueden comprender moléculas de colágeno, o agregados de las mismas; que están dispersas en un medio fluido, opcionalmente un medio líquido, más opcionalmente un medio acuoso. Opcionalmente, las partículas de colágeno, que están dispersas en un medio fluido, opcionalmente un medio líquido, más opcionalmente un medio acuoso; tienen una longitud (o dimensión máxima) de al menos un micrómetro.

50 Por "madurar" se entiende procesar el colágeno deshidratado bajo condiciones adecuadas para permitir el envejecimiento del colágeno deshidratado sin degradación o contaminación sustancial.

Se proporciona un método para preparar un colágeno modificado, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar colágeno aislado, opcionalmente una dispersión de colágeno aislado;

- (b) congelar el colágeno aislado; y
- (c) deshidratar el colágeno congelado.

Se proporciona un método para preparar un colágeno modificado, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) proporcionar colágeno aislado, opcionalmente una dispersión de colágeno aislado;

- 5 (b) congelar el colágeno aislado;
- (c) deshidratar el colágeno congelado; y
- (d) madurar el colágeno deshidratado.

10 Opcionalmente, la etapa provisora comprende la etapa de eliminar el medio fluido, opcionalmente el medio líquido, más opcionalmente el medio acuoso; antes de la etapa provisora. Más opcionalmente, la etapa provisora comprende la etapa de eliminar al menos algo del medio fluido, opcionalmente el medio líquido, más opcionalmente el medio acuoso; antes de la etapa provisora. Aún más opcionalmente, la etapa provisora comprende la etapa de eliminar al menos algo del medio fluido, opcionalmente el medio líquido, más opcionalmente el medio acuoso; antes de la etapa provisora; para proporcionar una dispersión de colágeno aislada.

15 Opcionalmente, la etapa provisora comprende la etapa de eliminar el medio fluido, opcionalmente el medio líquido, más opcionalmente el medio acuoso; antes de la etapa provisora para proporcionar una dispersión que tiene una concentración de aproximadamente 3-30%, opcionalmente 3-4% (p/p) de partículas de colágeno.

20 Opcionalmente, la etapa de congelación comprende la congelación a una temperatura de aproximadamente -33°C a aproximadamente -42°C. Más opcionalmente, la etapa de congelación comprende congelar a una temperatura de aproximadamente -38°C. Aún más opcionalmente, la etapa de congelación comprende congelar a una velocidad de aproximadamente 0,3°C a aproximadamente 1,5°C por minuto, opcionalmente una velocidad de aproximadamente 0,5°C por minuto.

25 Opcionalmente, la etapa de deshidratación comprende eliminar la fase acuosa. Más opcionalmente, la etapa de deshidratación comprende eliminar la fase acuosa reduciendo la presión. Aún más opcionalmente, la etapa de deshidratación comprende eliminar la fase acuosa reduciendo la presión a aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mbar. Aún más opcionalmente, la etapa de deshidratación comprende eliminar la fase acuosa aplicando un vacío.

30 Opcionalmente o adicionalmente, la etapa de deshidratación comprende aumentar la temperatura del colágeno congelado. Más opcionalmente o adicionalmente, la etapa de deshidratación comprende aumentar la temperatura del colágeno congelado al vacío. Aún más opcionalmente o adicionalmente, la etapa de deshidratación comprende aumentar la temperatura del colágeno a aproximadamente +30°C. Aún más opcionalmente o adicionalmente, la etapa de deshidratación comprende aumentar la temperatura del colágeno a aproximadamente +30°C al vacío.

35 Opcionalmente o adicionalmente, la etapa de deshidratación comprende aumentar la temperatura del colágeno a aproximadamente +30°C a una velocidad de aproximadamente 0,3°C a aproximadamente 1,5°C por minuto, más opcionalmente a una velocidad de aproximadamente 0,5°C por minuto. Más opcionalmente o adicionalmente, la etapa de deshidratación comprende aumentar la temperatura del colágeno a aproximadamente +30°C a una velocidad de aproximadamente 0,3°C a aproximadamente 1,5°C por minuto, más opcionalmente a una velocidad de aproximadamente 0,5°C por minuto, al vacío.

Opcionalmente, la etapa de deshidratación comprende al menos una etapa de equilibrado.

40 Opcionalmente, la al menos una etapa de equilibrado comprende mantener la temperatura a una temperatura constante, suficiente para permitir al colágeno congelado alcanzar una temperatura deseada. Más opcionalmente, la al menos una etapa de equilibrado comprende mantener la temperatura a una temperatura constante durante un periodo suficiente de tiempo para permitir al colágeno congelado alcanzar una temperatura deseada. Aún más opcionalmente, la al menos una etapa de equilibrado comprende mantener la temperatura a una temperatura constante durante al menos 10 minutos, opcionalmente al menos 20 minutos, más opcionalmente al menos 30 minutos, aún más opcionalmente al menos 45 minutos, aún más opcionalmente al menos 60 minutos; para permitir al colágeno congelado alcanzar una temperatura deseada.

45 Opcionalmente, la al menos una etapa de equilibrado se realiza cuando la temperatura se aumenta a al menos -20°C. Opcionalmente o adicionalmente, la al menos una etapa de equilibrado se realiza cuando la temperatura se aumenta a al menos -10°C. Opcionalmente o adicionalmente, la al menos una etapa de equilibrado se realiza cuando la temperatura se aumenta a al menos 0°C. Opcionalmente o adicionalmente, la al menos una etapa de equilibrado se realiza cuando la temperatura se aumenta a al menos +10°C. Opcionalmente o adicionalmente, la al menos una etapa de equilibrado se realiza cuando la temperatura se aumenta a al menos +20°C. Opcionalmente o adicionalmente, la al menos una etapa de equilibrado se realiza cuando la temperatura se aumenta a al menos +30°C.

- 5 Opcionalmente, la etapa de deshidratación comprende seis etapas de equilibrado, realizándose cada etapa de equilibrado cuando la temperatura se aumenta en aproximadamente 10°C. Más opcionalmente, la etapa de deshidratación comprende seis etapas de equilibrado, realizándose cada etapa de equilibrado cuando la temperatura se aumenta a aproximadamente -20°C, aproximadamente -10°C, aproximadamente 0°C, aproximadamente +10°C, aproximadamente +20°C y aproximadamente +30°C.
- 10 Opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 2°C. Más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 10°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 20°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 30°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 40°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 50°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 60°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 70°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 80°C.
- 15 Opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 30°C. Más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 40°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 65°C.
- 20 Opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de 30°C. Más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de 40°C. Aún más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de 65°C.
- 25 Opcionalmente, la etapa de madurado se realiza durante un periodo de al menos una semana, opcionalmente al menos dos semanas, más opcionalmente al menos tres semanas, aún más opcionalmente al menos cuatro semanas, aún más opcionalmente al menos cinco semanas, aún más opcionalmente al menos seis semanas.
- Opcionalmente, la etapa de madurado se realiza durante un periodo de al menos dos meses, opcionalmente al menos cuatro meses, más opcionalmente al menos seis meses, aún más opcionalmente al menos doce meses.
- 30 Opcionalmente, la etapa de madurado se realiza durante un periodo de una semana, opcionalmente dos semanas, más opcionalmente tres semanas, aún más opcionalmente cuatro semanas.
- Opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 2°C durante un periodo de al menos seis meses. Más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de 2°C durante un periodo de seis meses.
- 35 Opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 30°C durante un periodo de al menos dos meses. Más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de 30°C durante un periodo de dos meses.
- Opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 40°C durante un periodo de al menos seis semanas. Más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de 40°C durante un periodo de seis semanas.
- 40 Opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 65°C durante un periodo de al menos una semana. Más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de 65°C durante un periodo de una semana.
- 45 Opcionalmente, la etapa de madurado se realiza a una humedad relativa de menos de 100%, opcionalmente menos de 90%, más opcionalmente menos de 80%, aún más opcionalmente menos de 70%, aún más opcionalmente menos de 60%, aún más opcionalmente menos de 50%, aún más opcionalmente menos de 40%, aún más opcionalmente menos de 30%.
- 50 Por "humedad relativa" se entiende una medida de la cantidad máxima de agua en una mezcla de gas y vapor de agua, opcionalmente a una temperatura y presión atmosférica de gas dadas, opcionalmente a presión atmosférica constante, opcionalmente expresado como un porcentaje de la cantidad máxima de vapor de agua en el gas a una temperatura y presión atmosférica de gas dadas. Para los propósitos de esta memoria, el término "humedad relativa" pretende significar una medida de la cantidad de vapor de agua en una mezcla de aire medioambiental y vapor de agua, en que se realiza la etapa de madurado, a una presión atmosférica constante, y expresado como un porcentaje. Para los propósitos de esta memoria, presión atmosférica se entiende que es aproximadamente 980 a
- 55 aproximadamente 1040 milibares.

Se entiende que, en la realización de la etapa de madurado, los parámetros de temperatura, tiempo, presión y humedad relativa no son necesariamente mutuamente exclusivos, y el experto reconocería que cuando un parámetro se varía, uno o ambos de los demás parámetros pueden variarse también en consecuencia.

5 Opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 40°C durante un periodo de al menos seis semanas, y a una humedad relativa de menos de 80%. Más opcionalmente, la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de 40°C durante un periodo de 6 semanas, y a una humedad relativa de 75%.

10 Opcionalmente, el colágeno aislado es colágeno fibrilar. Más opcionalmente, el colágeno aislado se selecciona del colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo III y una mezcla de los mismos. Aún más opcionalmente, el colágeno aislado es colágeno tipo I.

Opcionalmente, el método comprende además la etapa de degradar mecánicamente el colágeno modificado antes de la etapa de madurado. Opcionalmente, la etapa de degradado mecánico comprende el molido. Más opcionalmente, la etapa de degradado mecánico se selecciona de molido, cortado, triturado y una mezcla de los mismos.

Se proporciona un método para aislar colágeno, comprendiendo el método las etapas de:

15 (a) proporcionar una fuente de colágeno; y

(b) aumentar el pH de la fuente de colágeno a aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5.

Opcionalmente, la fuente de colágeno es una dispersión de colágeno.

20 Opcionalmente, la etapa provisora comprende la etapa de eliminar el medio fluido, opcionalmente el medio líquido, más opcionalmente el medio acuoso; antes de la etapa provisora. Más opcionalmente, la etapa provisora comprende la etapa de eliminar al menos algo del medio fluido, opcionalmente el medio líquido, más opcionalmente el medio acuoso; antes de la etapa provisora. Aún más opcionalmente, la etapa provisora comprende la etapa de eliminar al menos algo del medio fluido, opcionalmente el medio líquido, más opcionalmente el medio acuoso; antes de la etapa provisora; para proporcionar una dispersión de colágeno aislado.

25 Opcionalmente, el pH de la fuente de colágeno, opcionalmente la dispersión de colágeno, se aumenta a aproximadamente 7,5.

Opcionalmente, la fuente de colágeno es un tejido fibroso, opcionalmente tejido conectivo. Más opcionalmente, la fuente de colágeno es tendón, opcionalmente tendón animal, más opcionalmente tendón equino o bovino, preferiblemente tendón equino.

30 Opcionalmente, el método comprende la etapa de degradar la fuente de colágeno antes de la etapa de aumento de pH. Más opcionalmente, la etapa de degradado comprende degradar mecánicamente la fuente de colágeno antes de la etapa de aumento de pH. Opcionalmente o adicionalmente, la etapa de degradado comprende degradar químicamente la fuente de colágeno antes de la etapa de aumento de pH.

35 Opcionalmente, la etapa de degradado mecánico comprende el molido. Más opcionalmente, la etapa de degradado mecánico se selecciona de molido, cortado, triturado, granulado y una mezcla de los mismos. Opcionalmente o adicionalmente, la etapa de degradado químico comprende poner en contacto la fuente de colágeno con una enzima, opcionalmente una enzima proteolítica. Opcionalmente, la enzima proteolítica se selecciona de quimosina, catepsina E y pepsina; preferiblemente pepsina.

Opcionalmente, la etapa de degradado químico se realiza a un pH de aproximadamente 2,5.

40 Opcionalmente, el método comprende además la etapa de eliminar la contaminación de la fuente de colágeno. Opcionalmente, la etapa de eliminación comprende poner en contacto la fuente de colágeno con una base, opcionalmente una base fuerte, más opcionalmente hidróxido sódico, aún más opcionalmente una disolución acuosa de hidróxido sódico.

Opcionalmente, el método comprende la etapa de filtrar la fuente de colágeno degradado, opcionalmente la dispersión de colágeno degradado, antes de la etapa de aumento de pH.

45 Opcionalmente, el método comprende la etapa de concentrado del colágeno. Opcionalmente, la etapa de concentrado comprende aislar el colágeno. Más opcionalmente, la etapa de concentrado comprende aislar el colágeno por centrifugado.

50 Opcionalmente, la etapa de concentrado comprende la etapa de eliminar el medio fluido, opcionalmente el medio líquido, más opcionalmente el medio acuoso; para proporcionar una dispersión que tiene una concentración de aproximadamente 3-30%, opcionalmente 3-4% (p/p) de partículas de colágeno.

Opcionalmente, el colágeno aislado se congela. Más opcionalmente, el colágeno aislado se congela a menos de -20°C. Opcionalmente, el colágeno aislado congelado se descongela antes de preparar el colágeno modificado.

5 Según un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención, o un colágeno modificado preparado según un segundo aspecto de la presente invención, para usar en el tratamiento prevención de adhesiones quirúrgicas.

10 Opcionalmente, el uso comprende la administración de la composición a una membrana biológica, opcionalmente un tejido biológico. Más opcionalmente, el uso comprende la administración de la composición a una membrana biológica, opcionalmente un tejido biológico, en una cavidad corporal. Aún más opcionalmente, el uso comprende la administración de la composición a una membrana biológica, opcionalmente un tejido biológico, en una cavidad corporal tal como una cavidad peritoneal, una cavidad pericárdica, una cavidad uterina o una cavidad sinovial.

15 Opcionalmente, el uso comprende la administración tópica de la composición a una membrana biológica, opcionalmente un tejido biológico. Más opcionalmente, el uso comprende la administración tópica de la composición a una membrana biológica, opcionalmente un tejido biológico, en una cavidad corporal. Aún más opcionalmente, el uso comprende la administración tópica de la composición a una membrana biológica, opcionalmente un tejido biológico, en una cavidad corporal tal como una cavidad peritoneal, una cavidad pericárdica, una cavidad uterina o una cavidad sinovial.

Se proporciona un método para la fabricación de una composición que comprende un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención o un colágeno modificado preparado según un segundo aspecto de la presente invención, comprendiendo el método las etapas de:

- 20 (a) proporcionar un colágeno modificado;
(b) preparar una dispersión acuosa del colágeno modificado;
(c) degradar la dispersión acuosa; y
(d) deshidratar la dispersión acuosa.

25 Opcionalmente, la etapa de preparación comprende añadir agua caliente, opcionalmente agua purificada caliente, al colágeno modificado. Opcionalmente, el agua, opcionalmente el agua purificada se calienta a aproximadamente 35 a aproximadamente 42°C antes de añadirla al colágeno modificado.

Opcionalmente, la etapa de preparación se realiza a un pH de aproximadamente 4,0.

Opcionalmente, la etapa de degradado comprende degradar mecánicamente la dispersión acuosa. Opcionalmente, la etapa de degradado mecánico comprende la mezcla por cizalladura.

30 Opcionalmente, la composición comprende colágeno modificado en una cantidad de aproximadamente 0,4% a 1,5% (p/p).

Opcionalmente, la composición tiene un pH de aproximadamente 4,0.

35 Opcionalmente, la etapa de deshidratado comprende eliminar líquido de la dispersión acuosa de manera que la composición comprende líquido en una cantidad de menos de 30%, opcionalmente menos de 20%, más opcionalmente menos de 15% (p/p) de la composición. Más opcionalmente, la etapa de deshidratado comprende eliminar líquido de la dispersión acuosa de manera que la composición comprende líquido en una cantidad de menos del 13%, preferiblemente menos del 12% (p/p) de la composición.

Opcionalmente, la etapa de deshidratado comprende eliminar líquido de la dispersión acuosa usando una vitrina de secado convectivo.

40 Se proporciona una composición de distribución de fármaco que se puede obtener proporcionando colágeno aislado, opcionalmente una dispersión de colágeno aislado; congelando el colágeno aislado; y deshidratando el colágeno congelado.

45 Se proporciona una composición de distribución de fármaco que se puede obtener proporcionando colágeno aislado, opcionalmente una dispersión de colágeno aislado; congelando el colágeno aislado; deshidratando el colágeno congelado; y madurando el colágeno deshidratado.

Se proporciona un método para preparar una composición de distribución de fármaco para liberación de fármaco prolongada, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) proporcionar colágeno aislado, opcionalmente una dispersión de colágeno aislado;
(b) congelar el colágeno aislado; y

(c) deshidratar el colágeno congelado.

Se proporciona un método para preparar una composición de distribución de fármaco para liberación de fármaco prolongada, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar colágeno aislado, opcionalmente una dispersión de colágeno aislado;

5 (b) congelar el colágeno aislado;

(c) deshidratar el colágeno congelado; y

(d) madurar el colágeno deshidratado.

Opcionalmente, el método comprende además la etapa de proporcionar un fármaco, opcionalmente una disolución de fármaco, a la que se añade el colágeno maduro, o que se añade al colágeno maduro.

10 Opcionalmente, el fármaco se selecciona de un antibiótico aminoglicósido, o una sal o profármaco del mismo; y un anestésico, o una sal o profármaco del mismo.

Más opcionalmente, el fármaco se selecciona de gentamicina ((3R,4R,5R)-2-[[[(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-[[[(2R,3R,6S)-3-amino-6-[(1R)-1-(metilamino)etil]oxan-2-il]oxi]-2-hidroxiciclohexil]oxi]-5-metil-4-(metilamino)oxano-3,5-diol), o una sal o profármaco del mismo; y bupivacaína ((RS)-1-butyl-N-(2,6-dimetilfenil)piperidina-2-carboxamida), o una sal o profármaco del mismo.

15 Opcionalmente, el fármaco es una disolución de fármaco acuosa. Más opcionalmente, el fármaco es una disolución de fármaco acuosa que comprende un ácido, opcionalmente ácido acético.

Opcionalmente, el método comprende además la etapa de mezclar, opcionalmente homogeneizar, el fármaco-, opcionalmente disolución de fármaco-, que contiene la composición de distribución del fármaco.

20 Opcionalmente, el método comprende además la etapa de liofilizar y/o deshidratar, el fármaco-, opcionalmente disolución de fármaco-, que contiene la composición de distribución del fármaco.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes y los dibujos que los acompañan en donde las barras de error representan desviaciones estándar, en que:

25 La Figura 1 es un gráfico que ilustra la característica de viscosidad de las composiciones preparadas a partir de colágeno fresco, colágeno congelado y colágeno congelado deshidratado, que se dejaron envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (colágeno molido liofilizado viejo);

30 La Figura 2A es un gráfico que ilustra la característica de absorción de agua de las composiciones preparadas a partir de colágeno fresco, colágeno congelado y colágeno congelado deshidratado, que se dejaron envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (colágeno molido liofilizado viejo);

La Figura 2B es un gráfico que ilustra la característica de hinchado de las composiciones que comprenden colágeno fresco, colágeno congelado y colágeno congelado deshidratado, que se dejaron envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (colágeno molido liofilizado viejo);

35 La Figura 3A es un gráfico que ilustra la característica de disolución de composiciones que contienen gentamicina preparadas a partir de colágeno congelado y colágeno congelado deshidratado, que se dejaron envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (colágeno molido liofilizado viejo);

La Figura 3B es un gráfico que ilustra la característica de disolución de composiciones que contienen bupivacaína preparadas a partir de colágeno congelado y colágeno congelado deshidratado, que se dejaron envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (colágeno molido liofilizado viejo);

40 La Figura 4 es un gráfico que ilustra la característica de viscosidad de composiciones preparadas a partir de colágeno fresco, colágeno congelado, colágeno congelado deshidratado, que se dejaron envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (colágeno molido liofilizado viejo), colágeno congelado deshidratado (CML no maduro), y un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención, madurado durante 2, 4 y 6 semanas (CML maduro);

45 La Figura 5 es un gráfico que ilustra la característica de viscosidad de composiciones preparadas a partir de colágeno congelado deshidratado (colágeno molido liofilizado no maduro), y un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención (CML maduro);

La Figura 6 es un gráfico que ilustra la capacidad de hinchado relativo de composiciones preparadas a partir de colágeno congelado (CHC) y colágeno congelado deshidratado, que se dejan envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (CML viejo); colágeno congelado (CHC) y un colágeno modificado según un primer aspecto de la

presente invención (CML maduro); y colágeno congelado deshidratado (CML no maduro) y un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención (CML maduro);

5 La Figura 7 es un gráfico que ilustra la característica de degradación de composiciones preparadas a partir de colágeno congelado deshidratado (CML no maduro), y un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención (CML maduro);

La Figura 8A es un gráfico que ilustra la característica de disolución de composiciones que contienen gentamicina preparadas a partir de colágeno congelado (CHC), colágeno congelado deshidratado (CML no maduro) y un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención (CML maduro);

10 La Figura 8B es un gráfico que ilustra la característica de disolución de composiciones que contienen bupivacaína preparadas a partir de colágeno congelado deshidratado, que se dejaron envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (CML viejo), y colágeno congelado deshidratado (CML no maduro); y

La Figura 9 es un gráfico que ilustra la característica de viscosidad de un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención, madurado durante hasta 4 semanas (CML maduro).

Ejemplos

15 Ejemplo 1 – Aislamiento de colágeno

El colágeno puede aislarse a partir de un número de fuentes, por ejemplo, pieles de animal y tendones de animal. En una realización preferida, el colágeno se aísla del tendón de animal, por ejemplo tendón equino o bovino; aunque puede usarse y seleccionarse cualquier fuente conocida de colágeno, incluyendo tejido fibroso, opcionalmente tejido conectivo, por un experto en la técnica. Preferiblemente, el colágeno se aísla de tendón equino. En el método de
20 aislamiento, los tendones equinos se molieron para degradar la fuente de colágeno. Los tendones equinos molidos se trataron con un número de reactivos, incluyendo hidróxido sódico (NaOH) 1N para eliminar la contaminación microbiológica tal como priones al comienzo del proceso. Se realizaron las etapas de tratamiento con peróxido de hidrógeno y las etapas de lavado a diferentes valores de pH, seguidas por una etapa de molido, que se usó para aumentar la superficie para la siguiente etapa de tratamiento. El peso molecular de la fuente de colágeno se redujo
25 adicionalmente mediante tratamiento con la enzima proteolítica pepsina a un pH aproximado de 2,5. El pH se ajustó usando una disolución acuosa de HCl 1N. La pepsina se usó para degradar los componentes de suero contaminantes tales como albúmina de suero equino (ASE) y dio por resultado la separación de partes no helicoidales de la molécula de colágeno (telopéptidos). Durante este proceso, el material de colágeno se solubilizó parcialmente también en el medio ácido. Después de la filtración, el nivel de pH se aumentó de 2,5 a 7,5 mediante la adición de hidróxido sódico (NaOH) 1N. Este ajuste de pH dio por resultado la precipitación del colágeno fibrilar de la disolución, que se concentró
30 después por medio de centrifugado para proporcionar una dispersión de colágeno que tenía una concentración de aproximadamente 3-30% (p/p). El material resultante se designó colágeno fresco. El colágeno fresco puede procesarse de varias formas.

El colágeno fresco puede envasarse en porciones adecuadas y congelarse a -20°C para almacenarse en un
35 congelador hasta que se necesite usar. El material resultante se designó colágeno congelado (CHC). El colágeno congelado se descongela antes de usar de la misma manera que el colágeno fresco.

De forma alternativa, el colágeno congelado puede secarse por congelación (liofilizarse), y opcionalmente molerse posteriormente. Para este propósito, el colágeno congelado se distribuyó de forma manual en una superficie plana, por ejemplo un molde de poliestireno, teniendo el colágeno congelado un espesor de capa de entre aproximadamente
40 5 mm y aproximadamente 10 mm. Los moldes rellenos de colágeno se transfirieron a los estantes de un secador por congelación disponible comercialmente (Christ Epsilon) y se congelaron a una temperatura de aproximadamente -38°C con una tasa de incremento entre 0,3°C y 1,5°C. Después de un periodo de equilibrado de aproximadamente 30 minutos se inició el vacío y la temperatura del estante se aumentó secuencialmente de aproximadamente -38°C a aproximadamente +30°C a una velocidad de aproximadamente 0,5°C por minuto. La combinación de vacío y aumento
45 secuencial de la temperatura del estante de aproximadamente -38°C a aproximadamente +30°C facilitó la sublimación del hielo desde el colágeno congelado hasta que el colágeno alcanzó una temperatura de 0°C. Para asegurar que la temperatura del colágeno aumentó uniformemente, se realizó al menos una etapa de equilibrado, en que la temperatura del estante se mantuvo a una temperatura deseada constante durante aproximadamente 30 min, o hasta que el colágeno alcanzó la temperatura deseada. Por ejemplo, una etapa de equilibrado se realizó cada 10°C entre
50 las temperaturas de -20°C y +30°C para asegurar que la temperatura del colágeno aumentó uniformemente. La etapa de equilibrado, por ejemplo a -20°C comprendió el mantenimiento de la temperatura del estante a una temperatura constante de -20°C durante aproximadamente 30 min. Una vez que el hielo se había eliminado por sublimación, y el colágeno alcanzó una temperatura de 0°C, el contenido de agua residual se redujo más continuando para aumentar secuencialmente la temperatura del estante a aproximadamente +30°C a una velocidad de aproximadamente 0,5°C
55 por minuto. El colágeno liofilizado se molió entonces usando un molino de corte disponible comercialmente (Rotoplex, Hosokawa Alpine). El material resultante se designó colágeno molido liofilizado no maduro (CML no maduro).

Opcionalmente, el colágeno molido liofilizado no maduro se maduró mediante almacenaje en recipientes (bolsas) de polietileno en condiciones ambiente de aproximadamente 2-8°C a presión atmosférica durante periodos de

aproximadamente 1-3 años hasta que se necesitó usar. El material resultante se designó colágeno molido liofilizado viejo (CML viejo).

De forma alternativa, el colágeno molido liofilizado no maduro (CML no maduro) se maduró mediante almacenaje en recipientes (bolsas) de polietileno como se describe en esta memoria hasta que se necesitó usar, por ejemplo almacenado a 40°C durante 2-6 semanas. El material resultante se designó colágeno molido liofilizado maduro (CML maduro).

Ejemplo 2 – Proceso de composición y equipo

Se preparó una dispersión acuosa de colágeno modificado en un recipiente de acero inoxidable usando agua purificada precalentada (35-42°C), que se ajustó a pH $4,0 \pm 0,2$. Se necesitó mezcla de alta cizalladura para romper la masa de colágeno modificado y exponer las fibras de colágeno al medio ácido. El mezclador de alta cizalladura (homogeneizador) comprendió una cabeza de rotor/estator que se diseña para crear fuerzas de alta cizalladura tirando el colágeno modificado a través de la cabeza del homogeneizador rotatorio y forzando al colágeno modificado contra la cabeza del estator estacionario proximal. Es este diseño el que proporciona las fuerzas de alta cizalladura necesarias para separar la masa de colágeno fibroso al principio de la preparación de la dispersión acuosa. Sin embargo, otro equipo de mezcla comparable puede usarse también; y puede seleccionarse por un experto en la técnica. Por ejemplo, un mezclador IKA Ultra-Turrax puede usarse a una alta velocidad durante aproximadamente 2 a aproximadamente 5 minutos.

Si se necesita, aunque no es esencial, la dispersión acuosa resultante puede filtrarse y desgasificarse, por ejemplo usando filtros de 250 micras y un medio adecuado de desgasificado, por ejemplo ultrasonificación. La concentración de colágeno en la dispersión acuosa final puede estar en el intervalo de 0,4% a 1,5% y el pH puede estar en el intervalo de $4,0 \pm 0,2$. La dispersión acuosa final puede transferirse posteriormente a un recipiente de acero inoxidable cerrado con camisa, opcionalmente donde la temperatura de la camisa se mantiene a 37°C y la dispersión acuosa se agita lentamente usando un ajuste de baja cizalladura.

La dispersión se llenó en, por ejemplo, bandejas de blísteres o moldes de liofilización de 10 x 10 cm usando, por ejemplo, una bomba de desplazamiento positivo. La bomba puede ser una bomba sin válvulas, que tiene opcionalmente pistones cerámicos. De forma alternativa, podría usarse también una bomba peristáltica. El peso de llenado se ajustó en base al contenido de colágeno de la dispersión acuosa para alcanzar el contenido de colágeno diana por área, por ejemplo aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10,0 mg/cm², opcionalmente aproximadamente 4 mg/cm². Al terminar el proceso de llenado, los blísteres o moldes llenos se colocaron en una vitrina de secado convectivo. Una vitrina de secado disponible comercialmente (LabAir; Bleyemehl) a 31°C se utilizó para este proceso de secado. La etapa de secado puede necesitar típicamente entre 1 y 3 días para eliminar el exceso de agua, que da por resultado la composición acabada, por ejemplo membrana, que queda retenida en los blísteres o moldes.

Después de completarse el proceso de secado, los blísteres o moldes se eliminaron de la vitrina de secado. La composición resultante, por ejemplo membrana, se cortó al tamaño deseado, por ejemplo usando un tinte neumático. El proceso de envasado fue un proceso de dos etapas que comprendía la introducción a un envase en bolsa interno y externo (óxido de etileno; tipo EO; PMS MEDICAL LTD) seguido por sellado neumático con calor. Un lado de la bolsa externa comprendía un laminado en hoja de poliéster o polietileno de baja densidad (LDPE) transparente con un sello de tira de polietileno de alta densidad (HDPE). El otro lado era un laminado de poliéster o LDPE opaco. Otro material de envase de bolsa externo puede usarse, incluyendo materiales de polietileno recubiertos con óxido de aluminio o, si se usa radiación de rayos E para el esterilizado, puede usarse una bolsa externa de aluminio. El sellador neumático con calor facilitó la formación de un sello continuo en el extremo abierto de la bolsa. La parte superior de la bolsa incluía dos agujeros o tiras forradas con un sello en tira de polietileno de alta densidad (HDPE). Estas aberturas/ventanas se diseñaron específicamente para el proceso de esterilizado con gas EO y solo eran permeables al gas. La permeabilidad de la ventana facilitó la permeación del gas EO durante el proceso de esterilizado con EO terminal. Después del esterilizado y la ventilación, la bolsa externa se volvió a sellar por debajo de las aberturas/ventanas permeables al gas, y esta parte permeable al gas (arriba) se quitó después de la bolsa. Esto dio por resultado una bolsa externa totalmente sellada que contenía una composición acabada esterilizada de forma terminal, por ejemplo membrana.

Óxido de etileno (EO; C₂H₄O) es un gas que, a temperatura de operación apropiadas, esteriliza por medio de la acción como un poderoso agente alquilante. Bajo las condiciones correctas, los constituyentes celulares de organismos tales como complejos de ácido nucleico, proteínas funcionales y enzimas reaccionarán con óxido de etileno, provocando la adición de grupos alquilo. Como resultado de la alquilación, la reproducción celular se evita y sucede la muerte celular. El esterilizador usado en los actuales Ejemplos fue un DMB 15009 VD (DMB Apparatebau GmbH, Alemania). Una mezcla de EO/CO₂ a una relación de 15:85 se usó como el gas de esterilizado durante un periodo de 6 horas a 4 bar de presión. Para completar con éxito este proceso, el producto necesita contener un nivel de humedad de no menos de 9%, que puede alcanzarse poniéndolo en un área bajo condiciones medioambientales contraladas. Después del proceso de esterilizado con EO, el producto se ventiló durante un mínimo de 3 a 4 semanas para reducir el nivel de gas óxido de etileno que queda y cualquier residuo de la composición, por ejemplo membrana, y materiales de envasado.

Ejemplo 3 – Caracterización

Todas las composiciones (membranas) se prepararon a partir de una dispersión al 0,6% usando el método descrito en esta memoria anteriormente. Todos los ensayos de la dispersión de colágeno se realizaron dentro de 1 día después de la composición; y todos los experimentos de caracterización con las membranas se realizaron dentro de 1 mes después de la fabricación de la membrana usando membranas no esterilizadas.

Viscosidad de dispersión

Los valores de viscosidad de las dispersiones de colágeno al 0,9% preparadas a partir de cada uno de colágeno fresco, colágeno congelado, colágeno molido liofilizado no maduro, y colágeno molido liofilizado maduro según el Ejemplo 2 se midieron usando un viscosímetro Brookfield (Reómetro digital DV-III+ con un Baño circulante TC-501 asociado). Los valores de viscosidad se midieron a una velocidad de cizalladura constante (15 s^{-1}) y sobre un intervalo de temperatura de 25 a 40°C con incrementos de 5°C. Se promediaron 60 medidas por temperatura para obtener resultados fiables.

La viscosidad de dispersión depende de la temperatura y disminuye cuando se calienta la dispersión. Los perfiles de viscosidad de colágeno fresco y congelado son comparables sobre el intervalo de temperatura probado. El colágeno molido liofilizado, que se almacenó a una temperatura de 2-8°C durante 3 años antes de la composición (CML viejo), mostró viscosidad significativamente menor en todas las temperaturas investigadas en comparación con el colágeno fresco y el colágeno congelado (véase la Figura 1). El colágeno molido liofilizado, que se compuso sin almacenaje (CML no maduro), mostró menor viscosidad en todas las temperaturas investigadas en comparación con el colágeno fresco y el colágeno congelado (véase la Figura 4). El colágeno molido liofilizado, que se maduró (almacenó a una temperatura de 40°C antes de la composición; CML maduro), mostró menor viscosidad en comparación con el CML no maduro (véase la Figura 4), y fue comparable con el colágeno molido liofilizado viejo.

Como puede verse en la Figura 5, madurar el colágeno molido liofilizado como se describe en esta memoria da por resultado la viscosidad mejorada en todas las temperaturas investigadas en comparación con el colágeno molido liofilizado no maduro, que no está sometido a la etapa de madurado descrita en esta memoria.

La diferencia en viscosidad es una ventaja para el procesado de las membranas. El colágeno con menor viscosidad puede desgasificarse más fácilmente, y llenarse o moldearse; y el tiempo de secado también se reduce ya que los colágenos que tienen mayores concentraciones pueden procesarse. El colágeno modificado de la presente invención proporciona características mejoradas de viscosidad en comparación con el colágeno fresco y el colágeno congelado; y la etapa de madurado proporciona características comparables de viscosidad en comparación con el colágeno molido liofilizado, que se almacenó a una temperatura de 2-8°C durante 3 años antes de la composición (CML viejo), proporcionando así las características mejoradas de viscosidad del colágeno viejo envejecido (CML viejo) sin el extenso periodo de envejecimiento.

Absorción de agua e hinchado

Se cortaron tres muestras rectangulares (1,5 x 4 cm de tamaño) a partir de 5 membranas preparadas a partir de cada uno de colágeno fresco, colágeno congelado, colágeno molido liofilizado viejo y colágeno molido liofilizado maduro. Cada una de estas muestras se puso en remojo en API (agua para inyección) durante 10 minutos, y se analizó en relación con la absorción de agua (peso húmedo – peso seco) e hinchado (espesor húmedo – espesor seco). El espesor de la muestra se midió usando un Micrómetro Mitutoyo IP54.

Las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado, que se almacenó a una temperatura de 2-8°C durante 3 años antes de la composición (CML viejo), mostraron menor absorción de agua e hinchado que las membranas preparadas a partir de colágeno fresco y a partir de colágeno congelado (véase la Figura 2a y 2b). La variabilidad de resultados fue sustancialmente menor para las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado, que se almacenó a una temperatura de 2-8°C durante 3 años antes de la composición (CML viejo) que para las membranas preparadas a partir de colágeno fresco y a partir de colágeno congelado.

Como puede verse en la Figura 6, el cambio de espesor para cada membrana de colágeno probada demuestra que las características mejoradas de absorción de agua e hinchado de membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado maduro sobre las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado, que se almacenó a una temperatura de 2-8°C durante 3 años antes de la composición (CML viejo), son comparables a las características mejoradas de absorción de agua e hinchado de membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado maduro sobre membranas preparadas a partir de colágeno congelado.

Las características de hinchado reducidas de membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado maduro son ventajosas ya que las membranas pueden implantarse dentro de espacios anatómicos restringidos con un menor riesgo de presurización y daño potencial de órganos vitales. Así, para usar en el tratamiento o prevención de adhesiones quirúrgicas, las membranas preparadas a partir del colágeno modificado pueden usarse en una mayor variedad de geometrías anatómicas y procedimientos quirúrgicos.

Degradación con colagenasa

Los estudios de degradación se realizaron usando 4 a 5 membranas por carga de cada uno de colágeno fresco, colágeno congelado, colágeno molido liofilizado viejo y colágeno molido liofilizado maduro. Una membrana (4,5 x 4,5 cm de tamaño) se colocó en una amasadora y se cubrió con 15 mL de tampón fosfato 0,2N (pH 7,4 con CaCl₂). La colagenasa (Colagenasa tipo IA-S, estéril, 50 mg, SIGMA, REF C5894) se reconstituyó con 5 mL de API, y 0,5 mL de la disolución resultante se añadió a la mezcla. La disolución en la amasadora se agitó usando un baño de agua de agitación (Julabo SW 22) a 37°C (120 rpm) durante 60 minutos. La degradación se documentó tomando fotografías de las muestras cada 5 minutos. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado degradaron de la forma más rápida sin residuo, mientras que las membranas preparadas a partir de colágeno fresco y colágeno congelado degradaron de forma considerablemente más lenta, y dejaron detrás pequeños aglomerados de fibra.

Tabla 1: Degradación de membranas de colágeno equino en presencia de colagenasa

	Colágeno fresco	Colágeno húmedo congelado	Colágeno molido liofilizado viejo
Disolución [min]	50	50	25

En un estudio adicional, se sumergieron muestras de membrana de 3,1 x 3,1 cm en 15 mL del tampón descrito anteriormente; al que se añadieron 100 µL de disolución de colagenasa reconstituida. Se quitaron muestras de 1 mL después de 5, 10, 15, 25, 40, 60 y 90 minutos; se filtraron las muestras a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm, y una alícuota de 100 µL se diluyó a 1:30. Se midieron los espectros de absorción de UV entre 210 y 230 nm (incrementos de 2 nm) frente a una disolución blanca usando un Fotómetro UV-VIS Specord 205 (Analytic Jena). La fracción degradada en cada punto temporal se calculó a partir de la máxima absorción respecto al punto temporal del minuto 90 (definido como 100%). Los resultados pueden verse en la Figura 7, que ilustró que las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado maduro degradaron más rápido que las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado.

Una composición para usar en el tratamiento o prevención de adhesiones quirúrgicas, por ejemplo una membrana para usar como una barrera de adhesión, necesita permanecer intacta durante un cierto tiempo para inhibir eficazmente la adhesión. La presencia prolongada de la membrana podría llevar a un riesgo mayor de infecciones, dado que el colágeno se conoce por ser un medio para el crecimiento bacteriano. Estos experimentos *in vitro* demuestran que las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado maduro degradan más rápido que las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado viejo, y aún más rápido que las membranas preparadas a partir de colágeno fresco y colágeno congelado, sugiriendo que este efecto será también cierto para el comportamiento *in vivo*. Por consiguiente, una composición que comprende un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención, o un colágeno modificado preparado según un segundo aspecto de la presente invención, para usar en el tratamiento de adhesiones quirúrgicas, puede reducir la probabilidad de infecciones como un efecto adverso del uso de la barrera de adhesión.

Tomados juntos, los ejemplos proporcionados en esta memoria demuestran que una composición que comprende un colágeno modificado según un primer aspecto de la presente invención, o un colágeno modificado preparado según un segundo aspecto de la presente invención – por ejemplo, las membranas preparadas a partir de colágeno molido liofilizado maduro – muestran propiedades significativamente alteradas en comparación con membranas hechas a partir de colágeno fresco, colágeno congelado o colágeno molido liofilizado no maduro. La etapa de maduración que proporciona las propiedades alteradas de colágeno envejecido sin el extenso periodo de envejecimiento; y por tanto puede ser particularmente útil en la fabricación de composiciones para usar en la prevención o tratamiento de adhesiones quirúrgicas.

Ejemplo 4- Disolución

Preparación de composiciones que comprenden gentamicina

Las composiciones (esponjas) que contienen sulfato de gentamicina (Fujian Fukang Pharmaceutical Co. Ltd, China) se prepararon para los ensayos de disolución a partir de una dispersión de colágeno al 1,6% en p/p usando una versión modificada del método descrito en esta memoria anteriormente. Cada esponja medía 2,5 x 2,5 x 0,5 cm y contenía 50 mg de colágeno y 50 mg de sulfato de gentamicina. Poco después, se añadieron sulfato de gentamicina (1,6% en p/p) y ácido acético 1N a agua para inyección (API), y se agitó hasta que resultó una disolución clara. Se añadió colágeno (1,6% en p/p) a la disolución, o bien como colágeno congelado (descongelado directamente antes de la producción); como colágeno molido liofilizado no maduro (CML no maduro; directamente liofilizado antes de la producción); o como un colágeno modificado según la presente invención (CML maduro). La mezcla se homogeneizó usando un mezclador de alta cizalladura disponible comercialmente (Ultraturrax, IKA, Alemania) durante 1 a 5 minutos a una temperatura entre 38 y 42°C hasta que se obtuvo una dispersión viscosa homogénea. La dispersión se filtró a través de una malla de 250 µm y se agitó durante aproximadamente 30 minutos. Se llenaron alícuotas de la dispersión en blísteres y se colocaron en los estantes de un secador por congelación adecuado y se liofilizaron. Los blísteres llenos con dispersión se transfirieron a los estantes de un secador por congelación disponible comercialmente y se congelaron a una temperatura de aproximadamente -38°C con una tasa de crecimiento de entre 0,3°C y 1,5°C. Después de un periodo

- de equilibrado de aproximadamente 30 a 60 minutos, se inició el vacío y la temperatura del estante se aumentó secuencialmente de aproximadamente -38°C a aproximadamente +30°C a una velocidad de aproximadamente 0,5°C por minuto. La combinación de vacío y el aumento secuencial de la temperatura del estante de aproximadamente -38°C a aproximadamente +30°C facilitó la sublimación del hielo desde la dispersión congelada hasta que el producto alcanzó una temperatura de 0°C. Para asegurar que la temperatura del colágeno aumentaba uniformemente, se realizó al menos una etapa de equilibrado, en la que la temperatura del estante se mantuvo a una temperatura deseada constante durante al menos 30 minutos, o hasta que el colágeno alcanzó la temperatura deseada. La composición porosa tipo esponja se quitó de las cavidades del blíster y se envasó en bolsas como se describe en el Ejemplo 2 en esta memoria anteriormente.
- 5
- 10 Preparación de composiciones que comprenden bupivacaína
- Las composiciones (esponjas) que contienen HCl de bupivacaína se produjeron para ensayo por disolución según un método similar como se describe anteriormente. Las esponjas se produjeron a partir de colágeno congelado (CHC) y colágeno congelado deshidratado, que se dejó envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (CML viejo). Cada esponja medía 5 x 5 x 0,5 cm y contenía 75 mg de colágeno y 100 mg de HCl de bupivacaína (véase la Figura 3). Las esponjas se produjeron también a partir de colágeno congelado deshidratado, que se dejó envejecer en condiciones ambiente durante 3 años (CML viejo) y colágeno congelado deshidratado (CML no maduro), que medía 10 x 10 x 0,5 cm y que contenía 100 mg de HCl de bupivacaína y 300 mg de colágeno. (Véase la Figura 8B). Poco después, se añadió ácido acético 1N a API y se mezcló brevemente. El colágeno (0,6% en p/p; o bien de colágeno congelado; colágeno molido liofilizado; o CML maduro) se añadió a la disolución. La mezcla se homogeneizó usando un mezclador de alta cizalladura disponible comercialmente (Ultraturrax, IKA, Alemania) durante 1 a 5 minutos a una temperatura entre 38 y 42°C hasta que se obtuvo una dispersión viscosa homogénea. La dispersión se filtró a través de una malla de 250 µm. Se disolvió HCl de bupivacaína (0,8% en p/p) en una pequeña cantidad de API y se añadió a la dispersión de colágeno. La mezcla se agitó durante aproximadamente 30 minutos. Alícuotas de la dispersión se llenaron en moldes y se transfirieron a los estantes de un secador por congelación disponible comercialmente y se congelaron a una temperatura de aproximadamente -38°C con una tasa de incremento de entre 0,3°C y 1,5°C. Después de un periodo de equilibrado de aproximadamente 30 a 60 minutos se inició el vacío y la temperatura del estante se aumentó secuencialmente de aproximadamente -38°C a aproximadamente +30°C a una velocidad de aproximadamente 0,5°C por minuto. La combinación de vacío y aumento secuencial de la temperatura del estante desde aproximadamente -38°C a aproximadamente +30°C facilitó la sublimación del hielo desde la dispersión congelada hasta que el producto alcanzó una temperatura de 0°C. Para asegurar que la temperatura del colágeno aumentaba uniformemente, se realizó al menos una etapa de equilibrado, en que la temperatura del estante se mantuvo a una temperatura deseada constante durante al menos 30 min, o hasta que el colágeno alcanzó la temperatura deseada. Las composiciones porosas tipo esponja se quitaron de los moldes y se envasaron en bolsas, como se describe en el Ejemplo 2 en esta memoria anteriormente.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35 Estudios de disolución de gentamicina
- Las propiedades de disolución de las composiciones (esponjas) que contenían sulfato de gentamicina se analizaron por duplicado usando un Aparato de disolución tipo II (Distek Inc., USA), según las instrucciones del fabricante. Para evitar que las esponjas floten, se colocaron en dispositivos de inmersión de acero inoxidable hechos a medida. Las esponjas pesadas se sumergieron en 500 mL de tampón de PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, temperatura del baño 37°C) y se agitó a 50 rpm durante 24 horas. 4,0 mL de muestra se quitó después de 5, 10, 30, 45, 60, 120, 180, 240 y 1440 minutos. Las muestras se sometieron a una reacción de derivatización química con ftalaldehído (4 mL de muestra + 1,6 mL de una disolución que comprende ftalaldehído al 1% + 4,4 mL de metanol) a 60°C durante 15 min (dilución 4/10). Las disoluciones resultantes se filtraron y se analizaron en un sistema HPLC (Shimadzu Corp., Japón), según las instrucciones del fabricante. Se usó una columna de HPLC RP-18 y una fase móvil que comprende API, metanol, ácido acético y Na-1-heptanosulfonato con un caudal de 0,5 mL/min. Los picos de gentamicina C1, C2 y C2a a 330 nm se integraron, y la concentración de gentamicina se calculó a partir del área bajo la curva de las muestras y a partir de un patrón de referencia que se sometió a idéntica preparación que la muestra.
- 40
- 45
- Estudios de disolución de bupivacaína
- 50 Las propiedades de disolución de las composiciones (esponjas) que contenían HCl de bupivacaína se analizaron por duplicado usando un aparato de disolución tipo II (Distek Inc., USA), como se describe anteriormente. Para evitar que las esponjas floten, se colocaron en dispositivos de inmersión de acero inoxidable hechos a medida. Poco después, las esponjas pesadas se sumergieron en 500 mL de tampón de PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 6,8, temperatura del baño 37°C) y se agitó con 50 rpm durante 24 horas. 4,0 mL de muestra se quitó después de 5, 10, 30, 45, 60, 120, 180, 240 y 1440 minutos. Las muestras se diluyeron a 1:1 con tampón de PBS, se filtraron y se analizaron en un sistema HPLC (Shimadzu Corp., Japón). Se usó una columna de HPLC RP-18 y una fase móvil que comprende tampón fosfato a pH 4,5 y acetonitrilo con un caudal de 0,5 mL/min. El pico de bupivacaína a 230 nm se integró, y la concentración de bupivacaína se calculó a partir del área bajo la curva de las muestras y a partir de un patrón de referencia.
- 55
- 60 Los resultados de los estudios de disolución se ilustran en las Figuras 3A, 3B y 8A y 8B.

5 Los resultados de estos estudios de disolución demuestran que un colágeno modificado según la presente invención proporciona una composición de distribución de fármaco, en donde la velocidad de liberación de sustancias biológicamente activas desde la composición con base de colágeno se reduce respecto a las composiciones hechas de colágeno aislado sin modificación, proporcionando así una composición de distribución de fármaco que tiene una acción más prolongada de liberación de fármaco (véanse las Figuras 3A y 3B).

10 Además, como puede verse por las Figuras 8A y 8B, el CML maduro proporciona una composición de distribución de fármaco, que demuestra una velocidad significativamente reducida de liberación de sustancias biológicamente activas en comparación con composiciones preparadas a partir de CML liofilizado no maduro o colágeno congelado; proporcionando así una composición de distribución de fármaco que tiene una acción mas prolongada de liberación de fármaco.

15 Esta liberación extendida puede ser beneficiosa para los productos con base de colágeno que contienen ingredientes farmacéuticamente activos (IFA) con buena solubilidad en agua. Un retraso de las cinéticas de liberación para esta combinación es difícil de otra forma de alcanzar sin reticulado químico de la composición de distribución de fármaco. Tanto en administración tópica como implante, la liberación extendida del ingrediente desde la composición de distribución de fármaco puede llevar a una acción terapéutica más larga y eficacia local mejorada.

Ejemplo 5 – Almacenaje

Se preparó colágeno molido liofilizado no maduro (CML no maduro) como se describe en el Ejemplo 1; y se maduró mediante almacenaje en recipientes de polietileno (bolsas) como se describe en esta memoria durante hasta 4 semanas. El material resultante se designó colágeno molido liofilizado maduro (CML maduro).

20 Los valores de viscosidad se midieron en cada uno de los periodos de tiempo anotados (1, 2, 3 y 4 semanas de almacenaje) como se describe en el Ejemplo 3. Poco después, los valores de viscosidad se midieron usando un viscosímetro Brookfield (Reómetro Digital DV-III+ con baño circulante TC-501 asociado) a una velocidad de cizalladura constante (15 s^{-1}) y sobre un intervalo de temperatura de 30 a 65°C. Se midieron los valores de viscosidad de colágeno molido liofilizado maduro que tenía un bajo contenido de humedad de 1-2% y un alto contenido de humedad de 13-25 15%.

30 Como puede verse a partir de la Figura 9, generalmente, la viscosidad del colágeno molido liofilizado maduro no está afectada por el contenido de humedad del colágeno molido liofilizado maduro. Además, aumentar la temperatura de almacenaje acelera la reducción de viscosidad del colágeno molido liofilizado maduro. Ciertamente, madurar el colágeno molido liofilizado como se describe en esta memoria da por resultado una viscosidad mejorada a todos los tiempos de almacenaje investigados. A menor temperatura de almacenaje, el tiempo necesario para alcanzar la viscosidad diana se amplía.

Ítems

- S1. Un método para preparar un colágeno modificado, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar colágeno aislado;
 - (b) congelar el colágeno aislado; y
- 5 (c) deshidratar el colágeno congelado.
- S2. Un método según S1, que además comprende la etapa de (d) madurar el colágeno deshidratado.
- S3. Un método según S1 ó 2, en el que la etapa provisora comprende la etapa de eliminar el fluido antes de la etapa provisora para proporcionar una dispersión que tiene una concentración de aproximadamente 3-30% (p/p) de partículas de colágeno.
- 10 S4. Un método según cualquiera de S1-3, en el que la etapa de congelación comprende congelar a una temperatura de aproximadamente -33°C a aproximadamente -42°C.
- S5. Un método según cualquiera de S1-4, en el que la etapa de deshidratación comprende eliminar la fase acuosa reduciendo la presión de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 mbar.
- 15 S6. Un método según cualquiera de S1-5, en el que la etapa de deshidratación comprende aumentar la temperatura del colágeno a aproximadamente +30°C.
- S7. Un método según cualquiera de S1-6, en el que la etapa de deshidratación comprende al menos una etapa de equilibrado, en donde la o cada etapa de equilibrado comprende mantener la temperatura a una temperatura constante durante al menos 10 min.
- 20 S8. Un método según S7, en el que la etapa de deshidratación comprende seis etapas de equilibrado, realizándose cada etapa de equilibrado cuando la temperatura se aumenta en 10°C.
- S9. Un método según S2, en el que la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 2°C.
- S10. Un método según S2 ó 9, en el que la etapa de madurado se lleva a cabo durante un periodo de al menos una semana.
- 25 S11. Un método según cualquiera de S2, 9 o 10, en el que la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 2°C durante un periodo de al menos seis meses.
- S12. Un método según cualquiera de S2, 9 o 10, en el que la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 30°C durante un periodo de al menos dos meses.
- 30 13. Un método según cualquiera de S2, 9 o 10, en el que la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 40°C durante un periodo de al menos seis semanas.
- S14. Un método según cualquiera de S2, 9 o 10, en el que la etapa de madurado comprende almacenar el colágeno deshidratado a una temperatura de al menos 65°C durante un periodo de al menos una semana.
- S15. Un método según cualquiera de S2 o 9-14, en donde la etapa de madurado se realiza a una humedad relativa de menos de 80%.
- 35 S16. Un colágeno modificado que se puede obtener proporcionando colágeno aislado; congelando el colágeno aislado; deshidratando el colágeno congelado y madurando el colágeno deshidratado.
- S17. Una composición que comprende un colágeno modificado según S16, o un colágeno modificado preparado según uno cualquiera de S1-15, para su uso en el tratamiento o prevención de adhesiones quirúrgicas.
- 40 S18. Una composición para su uso según S17, donde el uso comprende la administración de la composición a una membrana biológica
- S19. Un método para la fabricación de una composición que comprende un colágeno modificado según S16 o un colágeno modificado preparado según uno cualquiera de S1-15, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar el colágeno modificado;
 - (b) preparar una dispersión acuosa del colágeno modificado;
- 45 (c) degradar la dispersión acuosa; y

(d) deshidratar la dispersión acuosa.

S20. Un método según S19, en el que la etapa de preparación comprende añadir agua calentada hasta, de aproximadamente 35 a aproximadamente 42°C, al colágeno modificado, antes de añadirla al colágeno modificado.

5 S21. Un método para preparar una composición de distribución de fármaco para liberación de fármaco prolongada, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar colágeno aislado,

(b) congelar el colágeno aislado; y

(c) deshidratar el colágeno congelado.

S22. Un método según S21, que además comprende la etapa de (d) madurar el colágeno deshidratado.

10 S23. Un método según S21 o 22, que además comprende la etapa de proporcionar un fármaco al que se añade el colágeno maduro, o que se añade al colágeno maduro.

15 S24. Un método según S23, en el que el fármaco se selecciona entre gentamicina ((3R,4R,5R)-2-[[[1 S,2S,3R,4S,6R)-4,6-diamino-3-[[[2R,3R,6S)-3-amino-6-[(1R)-1-(metilamino)etil]oxan-2-il]oxi]-2-hidroxiciclohexil]oxi]-5-metil-4-(metilamino)oxano-3,5-diol), o una sal o profármaco del mismo; y bupivacaína ((RS)-1-butil-N-(2,6-dimetilfenil)piperidina-2-carboxamida), o una sal o profármaco del mismo.

S25. Un método según S23 o 24, que además comprende la etapa de liofilizar y/o deshidratar, el fármaco, que contiene la composición de distribución del fármaco.

S26. Una composición de distribución de fármaco que se puede obtener proporcionando colágeno aislado, congelando el colágeno aislado, deshidratando el colágeno congelado y madurando el colágeno deshidratado.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un colágeno maduro que se puede obtener proporcionando colágeno aislado, congelando el colágeno aislado, deshidratando el colágeno congelado y madurando el colágeno deshidratado, donde el colágeno maduro comprende colágeno deshidratado almacenado a una temperatura de:
- a. al menos 40 °C durante un periodo de al menos seis semanas, o
 - b. al menos 65 °C durante un periodo de al menos una semana, o
 - c. al menos 30 °C durante un periodo de al menos dos meses.
- 10 2. El colágeno maduro según la reivindicación 1, donde el colágeno deshidratado se almacena a una temperatura de al menos 40 °C durante un periodo de al menos seis semanas y a una humedad relativa de menos de 80%.
3. El colágeno maduro según la reivindicación 1, donde el colágeno deshidratado se almacena a una temperatura de 40 °C durante un periodo de seis semanas.
4. El colágeno maduro según la reivindicación 1, donde el colágeno deshidratado se almacena a una temperatura de 40 °C durante un periodo de dos meses, cuatro meses o seis meses.
- 15 5. El colágeno maduro según la reivindicación 3 o 4, donde el colágeno deshidratado se almacena a una humedad relativa de 75%.
6. Una composición que comprende el colágeno maduro según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
7. La composición según la reivindicación 6, que adicionalmente comprende un fármaco.
- 20 8. La composición según la reivindicación 7, en la que el fármaco es gentamicina, bupivacaína o una sal o profármaco de las mismas.
9. La composición según la reivindicación 8, que está en forma de esponja.
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para uso como medicamento.
11. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, para uso en el tratamiento o prevención de las adhesiones quirúrgicas.

25

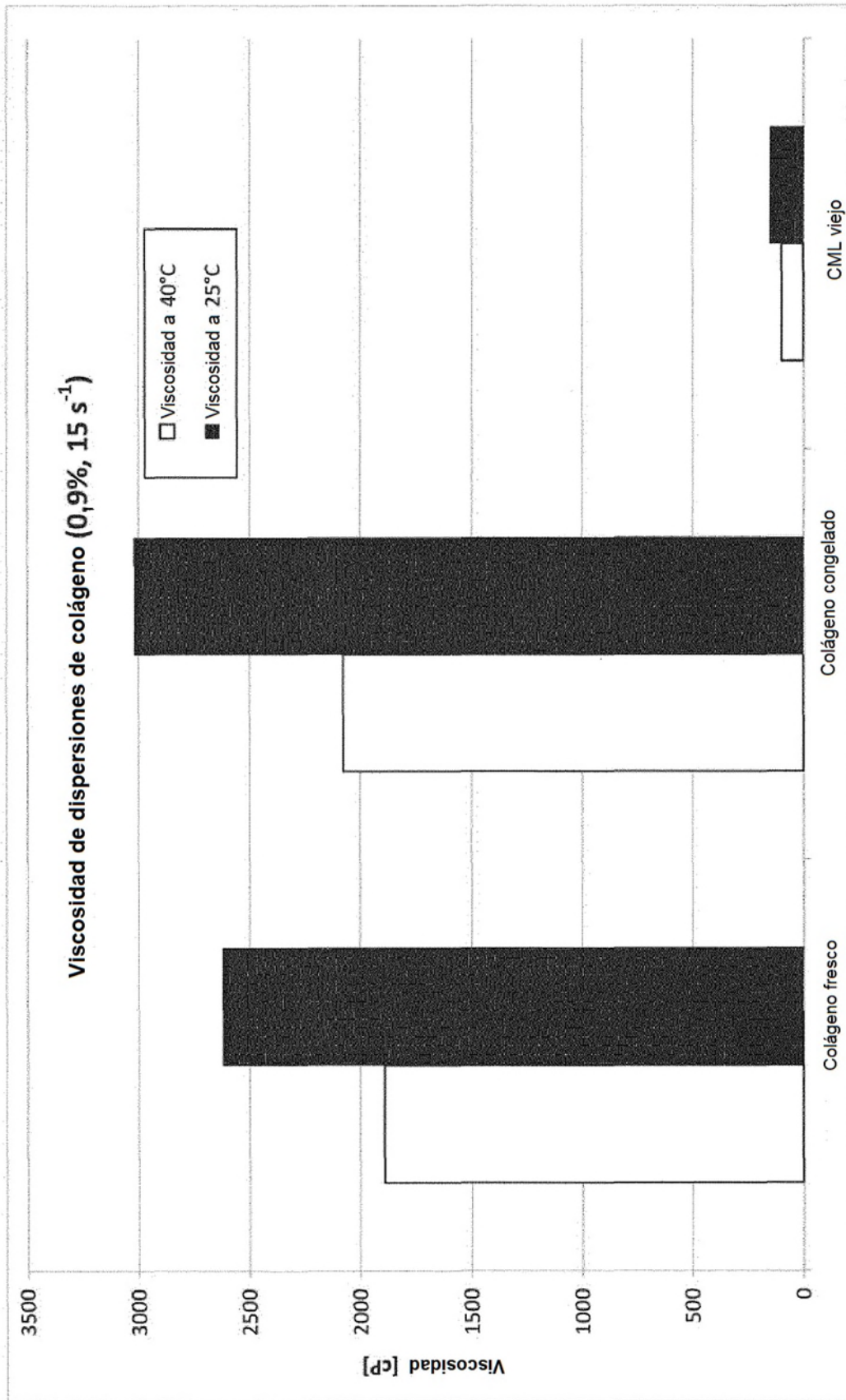


Figura 1

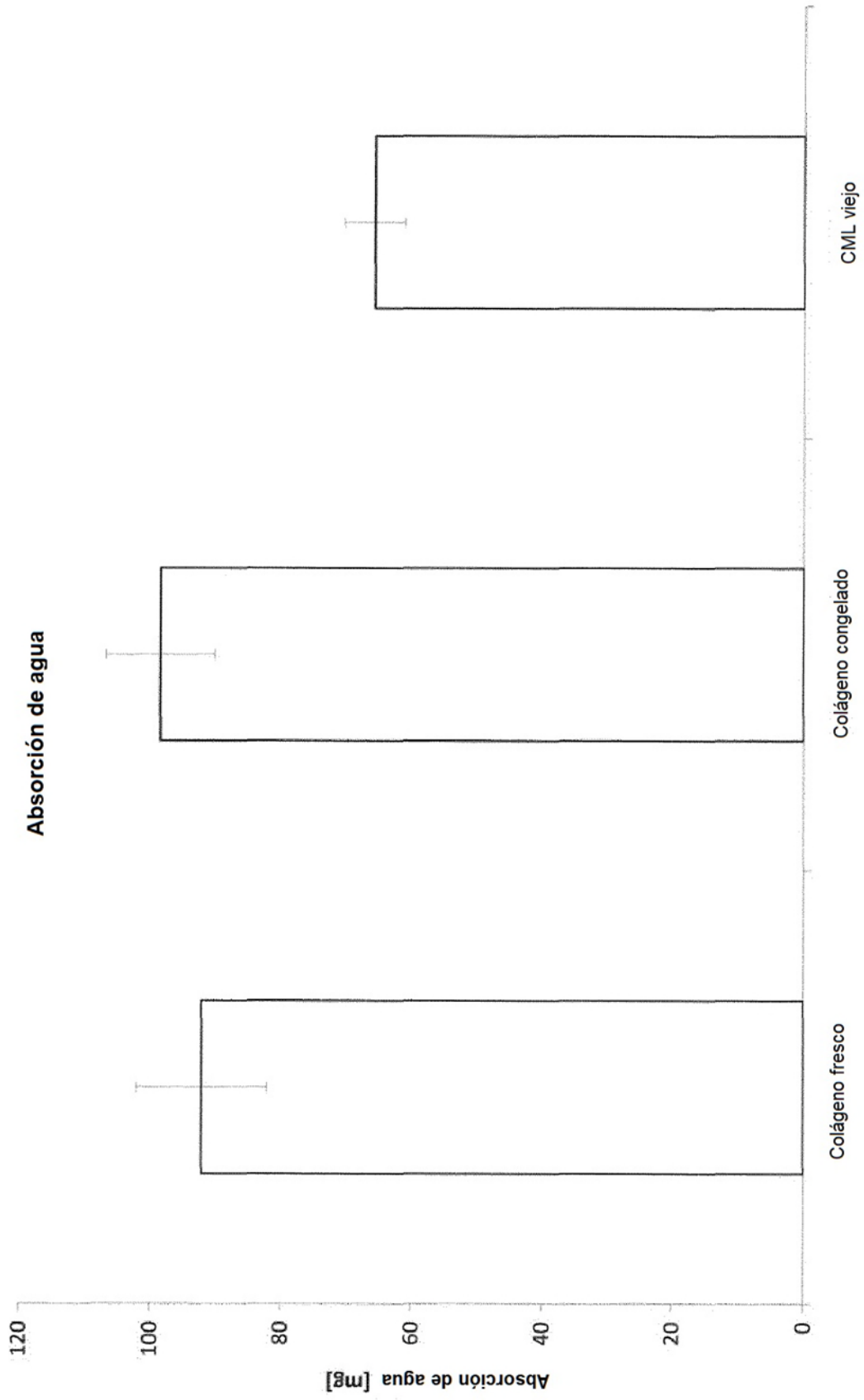


Figura 2A

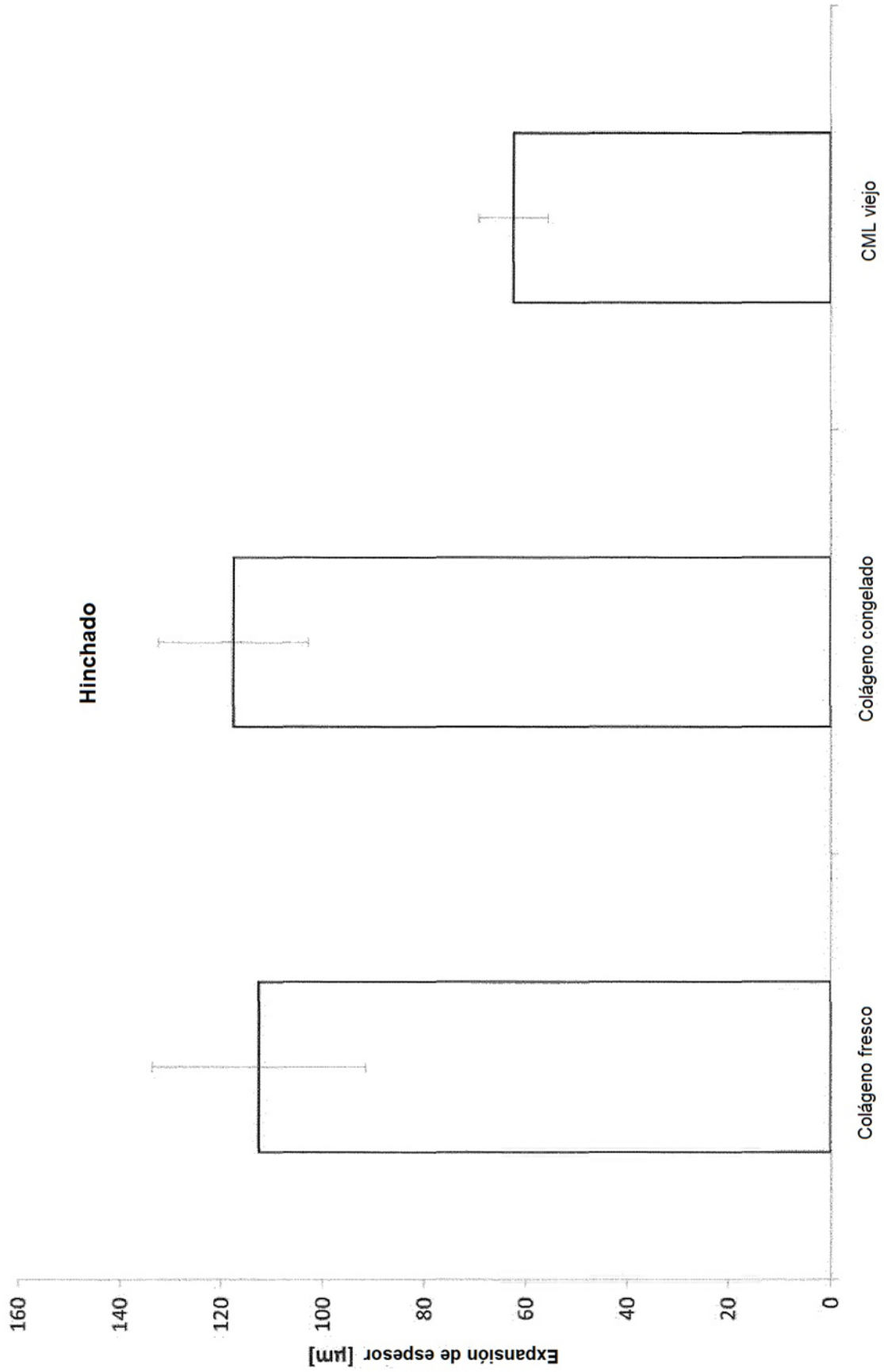


Figura 2B

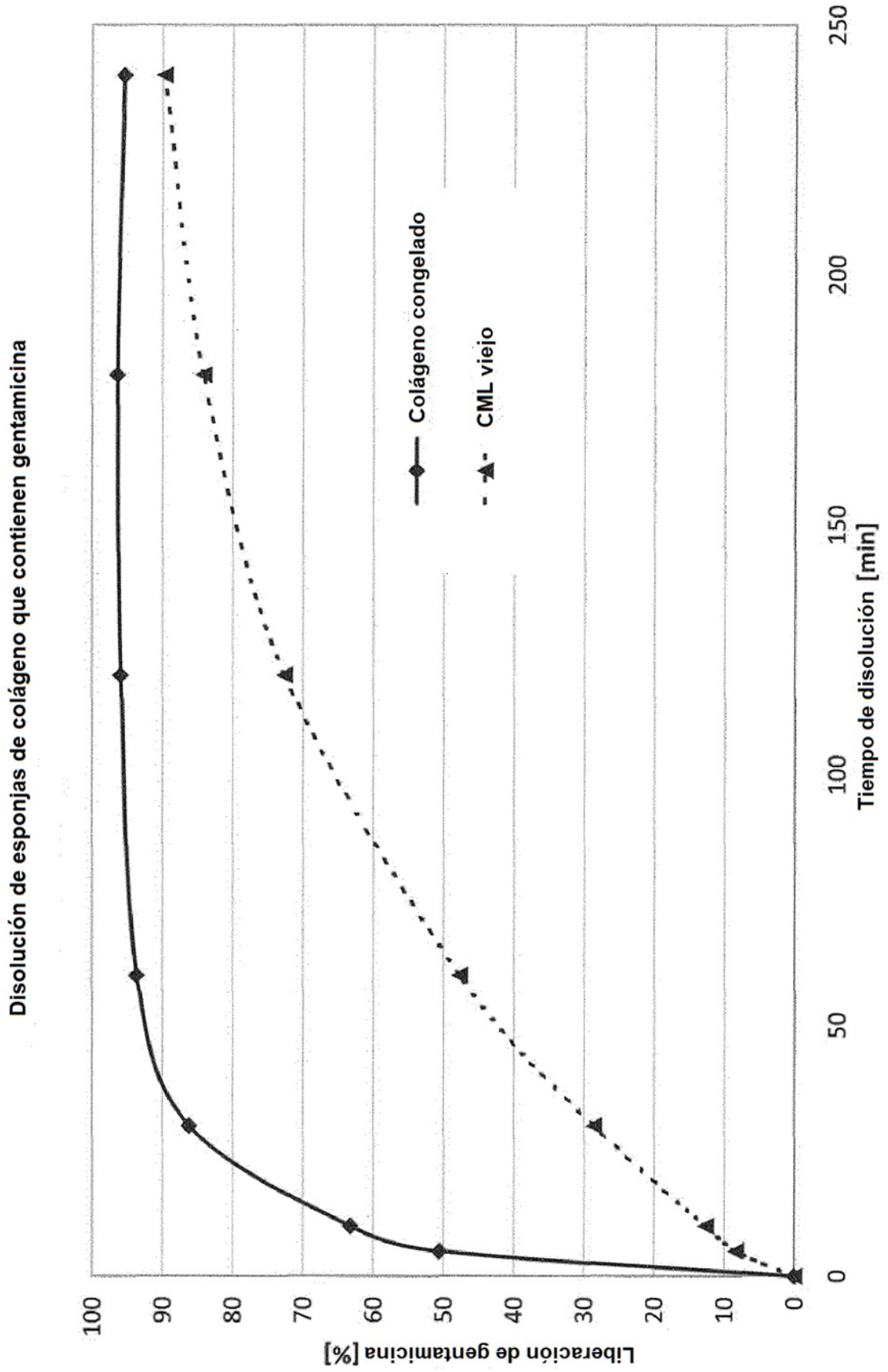


Figura 3A

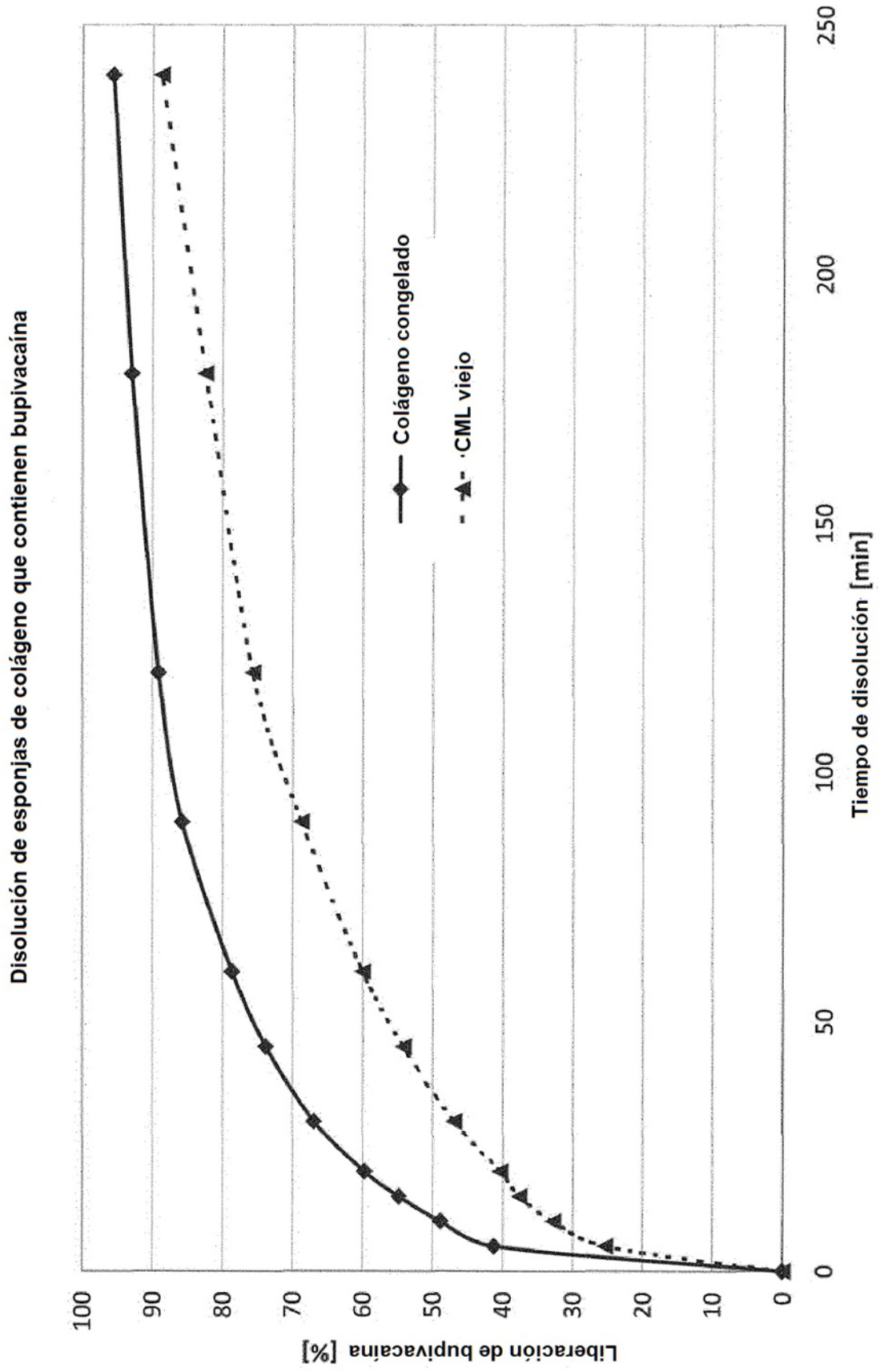


Figura 3B

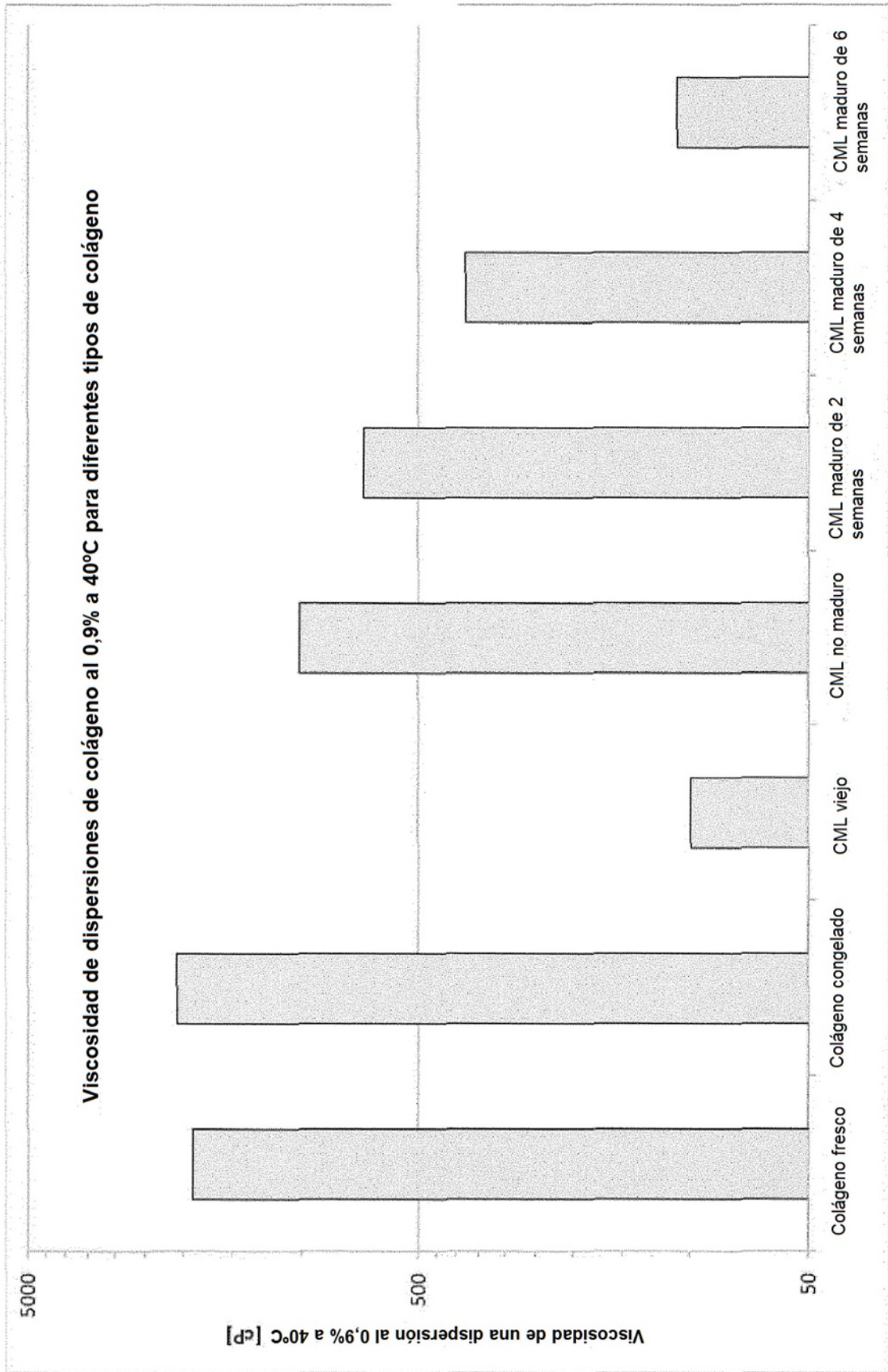


Figura 4

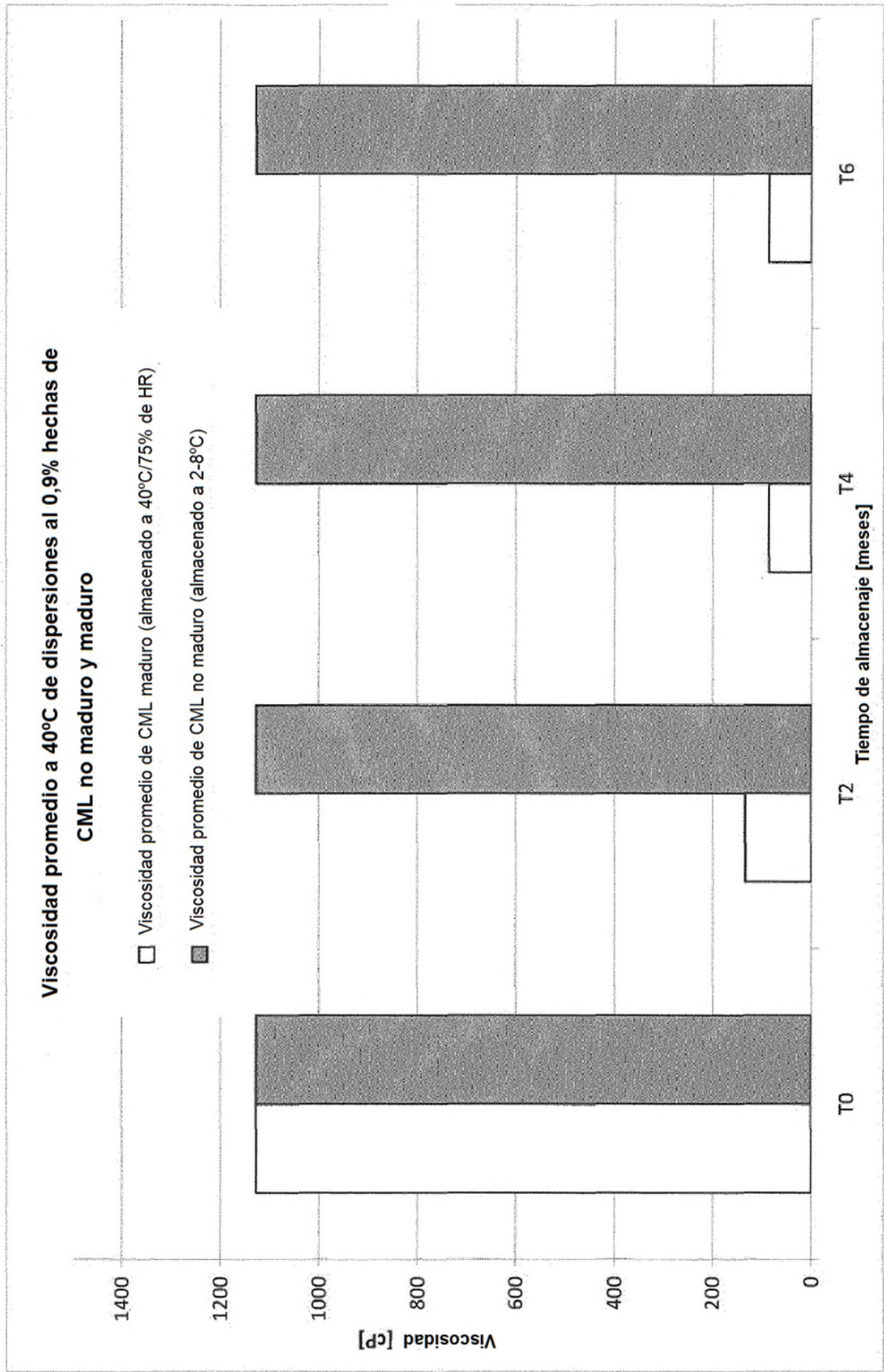


Figura 5

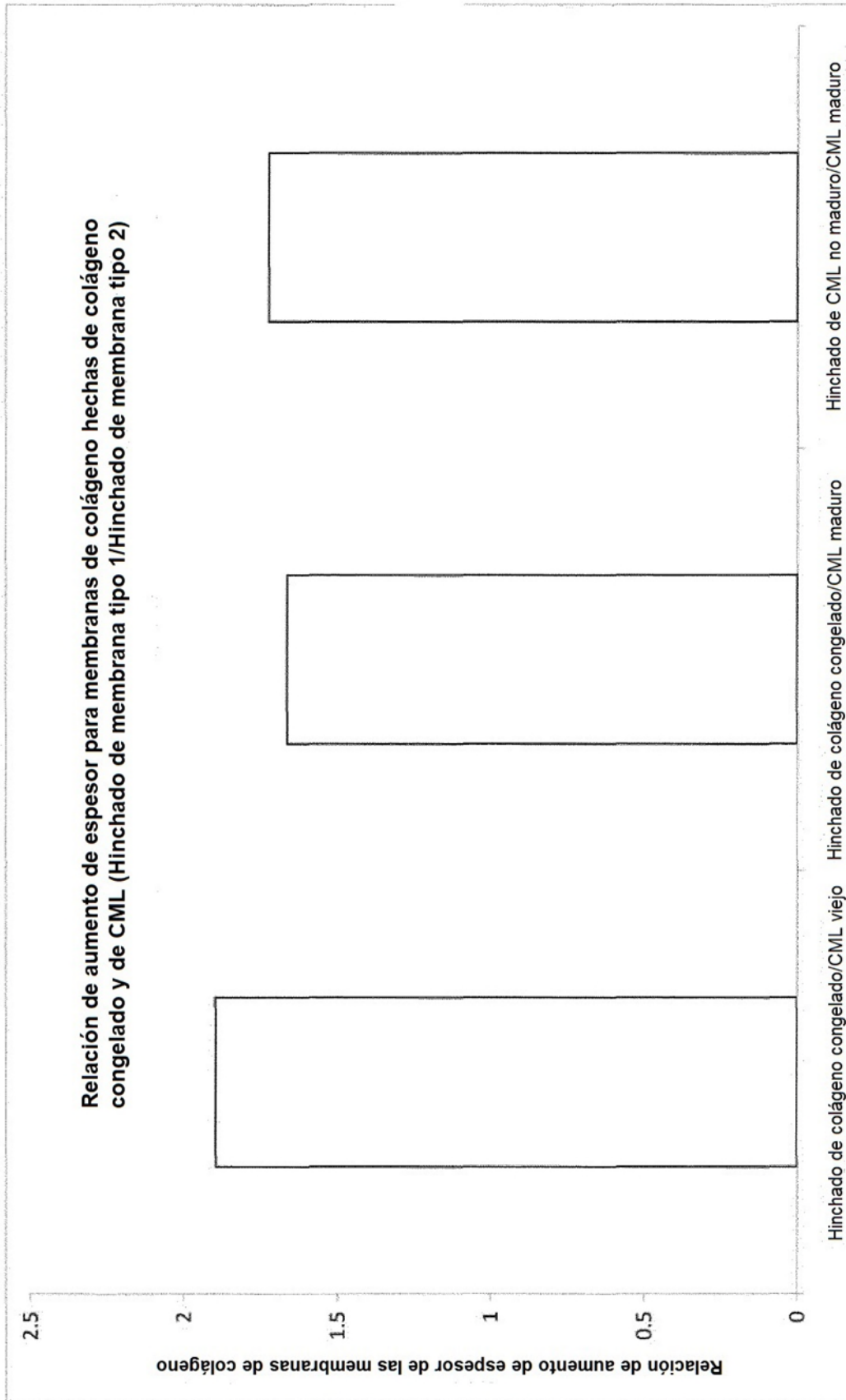


Figura 6

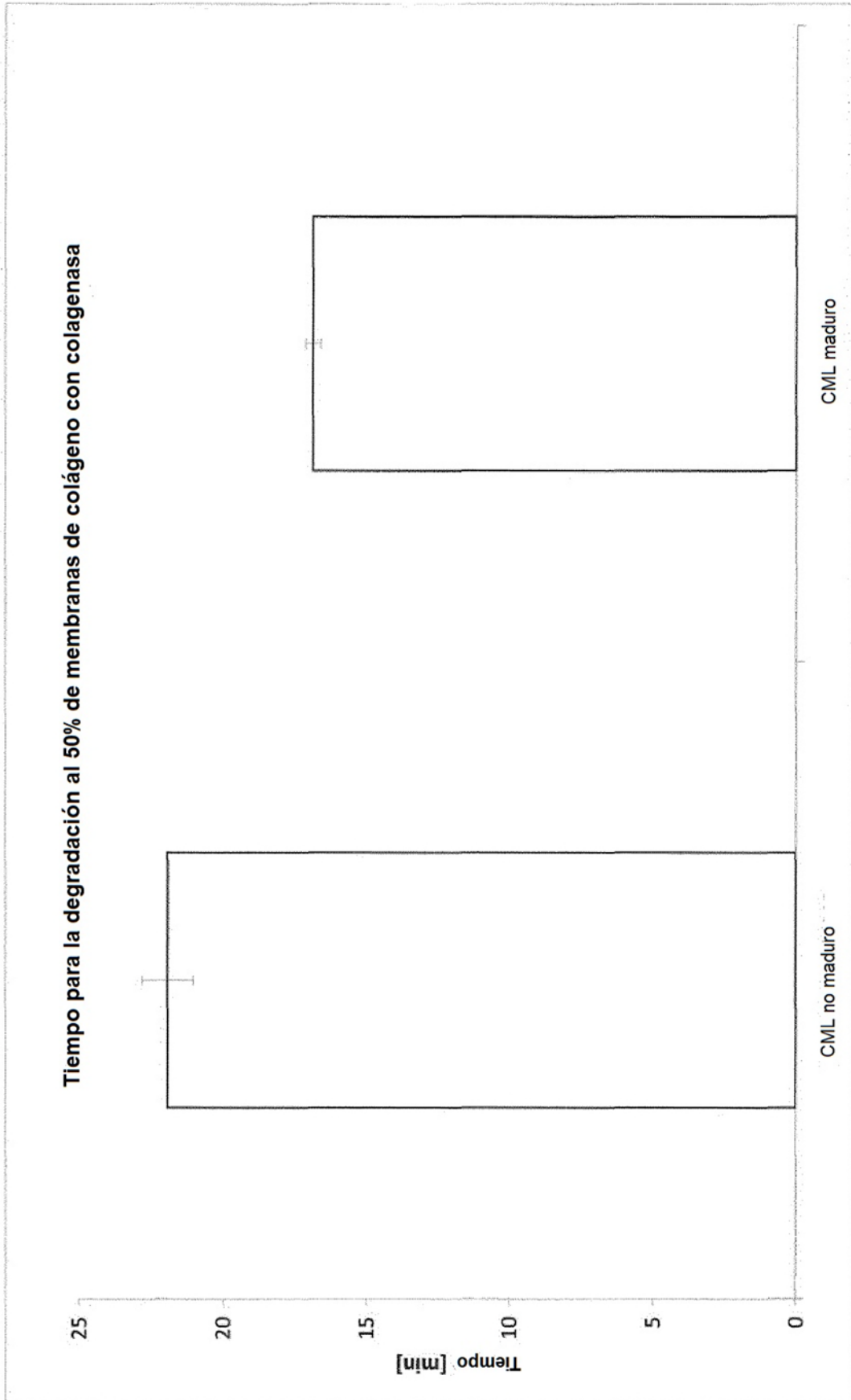


Figura 7

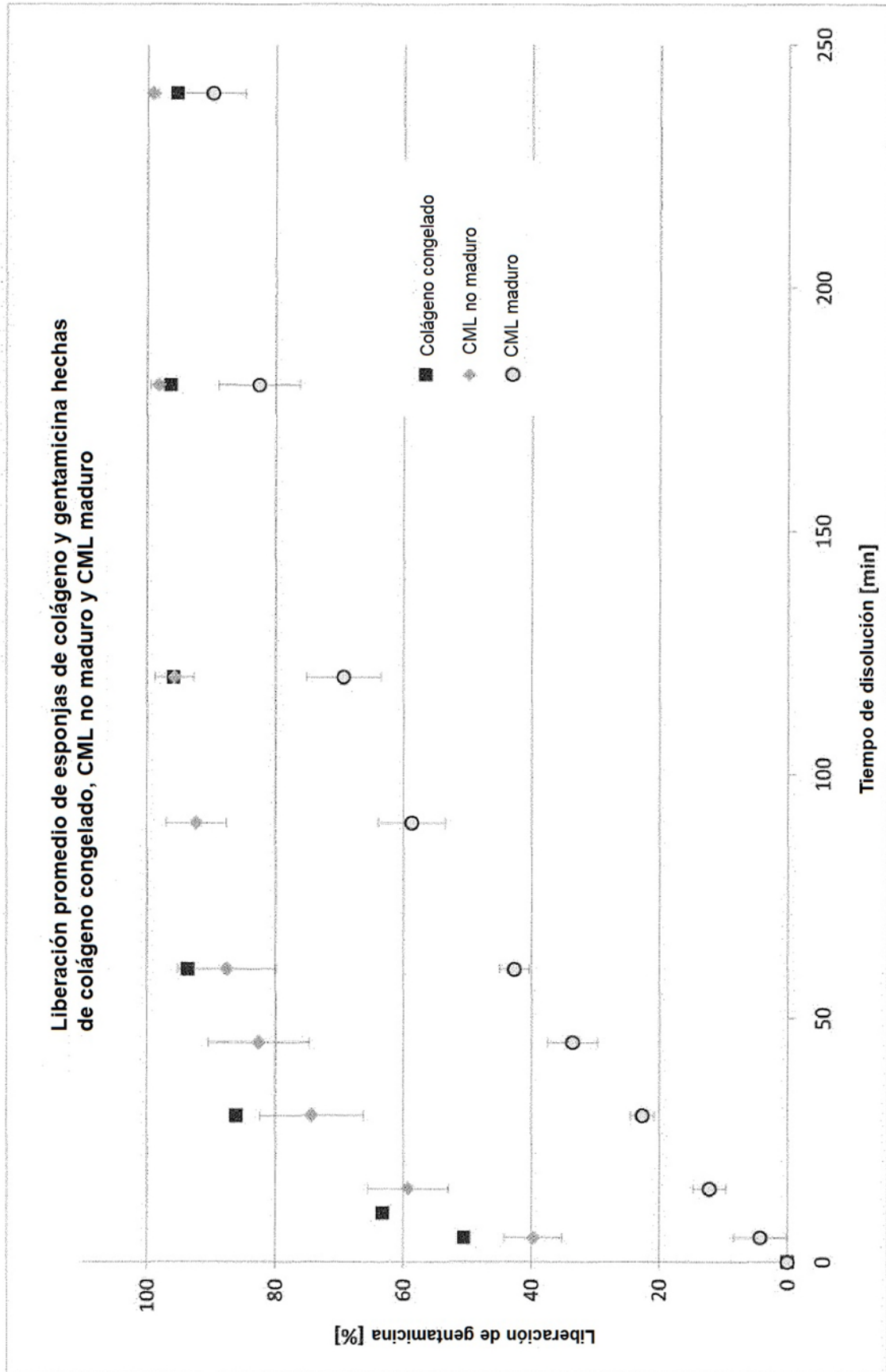


Figura 8A

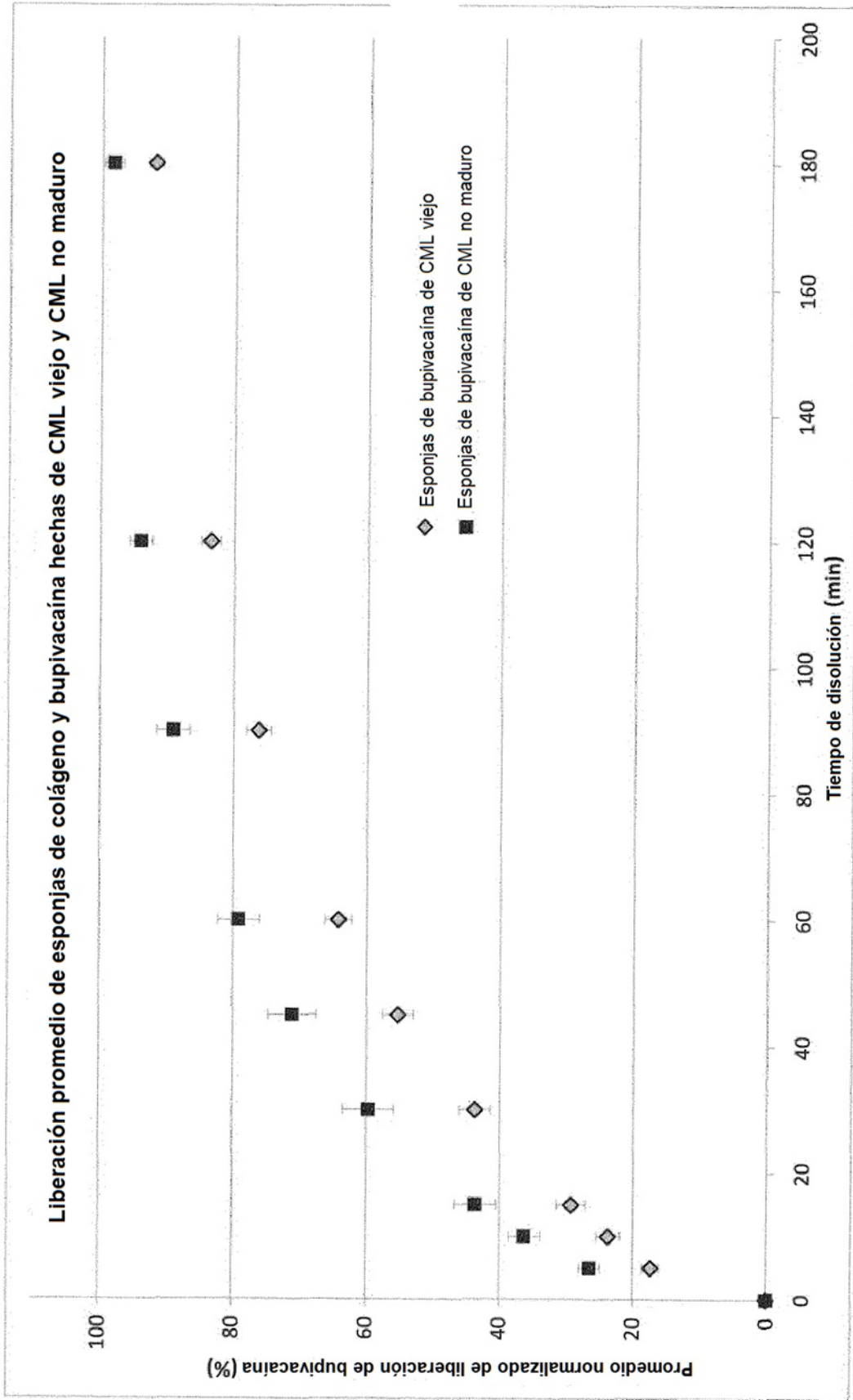


Figura 8B

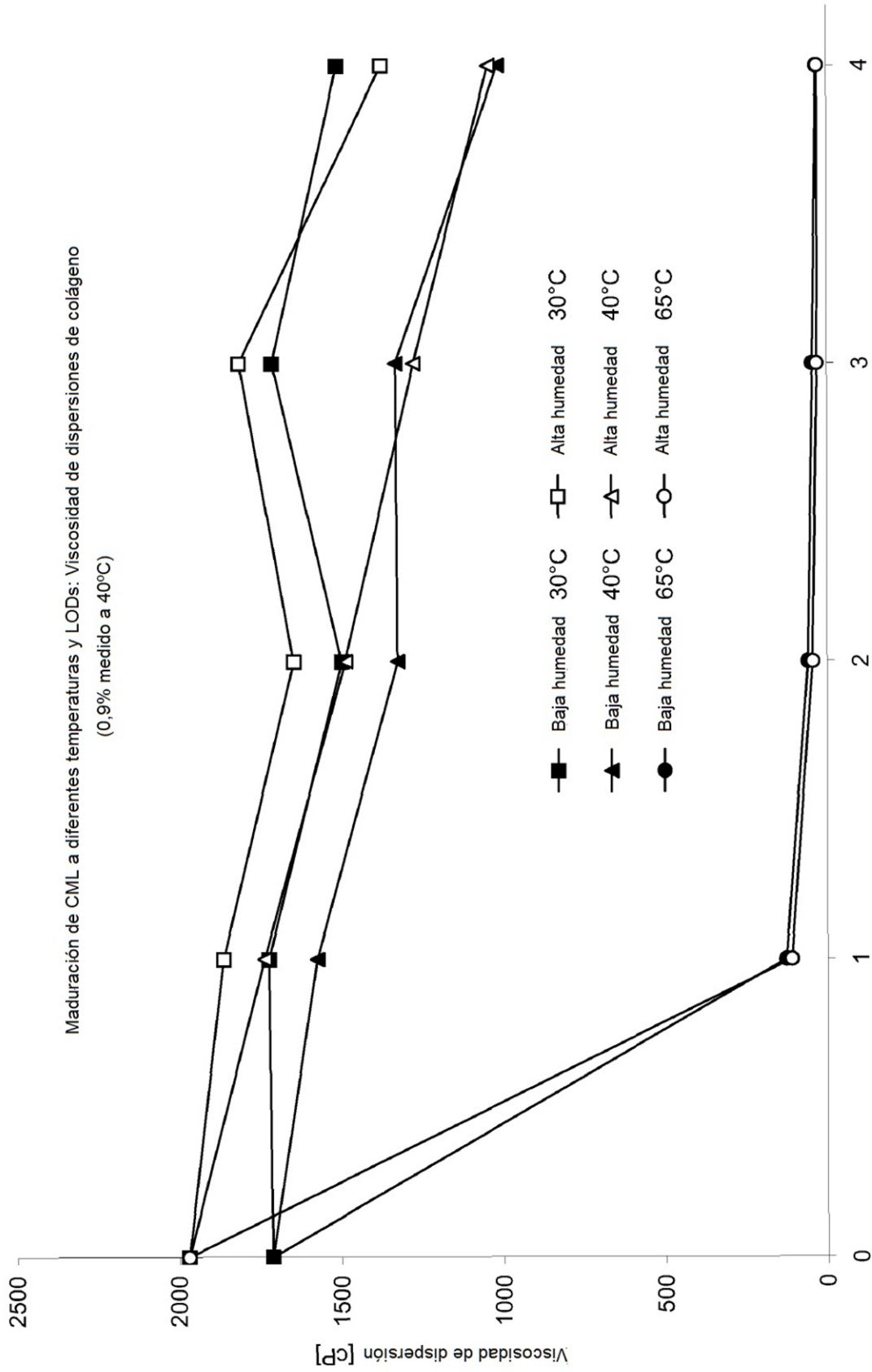


Figura 9