

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 285**

51 Int. Cl.:

A61K 38/39 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 31/728 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.09.2012 PCT/AU2012/001179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13044314**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2012 E 12835454 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2760466**

54 Título: **Síntesis in vivo de fibra elástica**

30 Prioridad:

30.09.2011 AU 2011904041

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

31.10.2019

73 Titular/es:

**ALLERGAN PHARMACEUTICALS
INTERNATIONAL LIMITED (100.0%)
Clonshaugh Business & Technology Park
Dublin 17, D17 E400, IE**

72 Inventor/es:

**MITHIEUX, SUZANNE MARIE. y
WEISS, ANTHONY STEVEN.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 729 285 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

Síntesis *in vivo* de fibra elástica

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método no terapéutico de restauración o recreación de la elasticidad en los tejidos, mejorando con ello el aspecto físico y/o la función del tejido envejecido o dañado.

10 **Antecedentes de la invención**

El envejecimiento y los daños en los tejidos están asociados con la degeneración de la matriz extracelular, que da lugar a la pérdida de la estructura y/o de la función de los tejidos. Una piel flácida, tejido subcutáneo relajado, pérdida de densidad de la matriz extracelular, arrugas, estrías y fibrosis, son manifestaciones físicas de la degeneración. Dependiendo del tejido relevante, la pérdida de la función de elasticidad puede manifestarse como una menor capacidad pulmonar o cardíaca, o como elasticidad reducida y/o resiliencia de varias válvulas y esfínteres.

Hace unos 20 años, el esfuerzo de investigación buscaba utilizar las distintas moléculas de la matriz extracelular en una serie de intervenciones clínicas y cosméticas para corregir la pérdida de estructura y función de los tejidos. Las moléculas clave de interés fueron aquellas que son sustratos de las fibras relevantes de la matriz extracelular, concretamente el colágeno y la elastina. En general, el enfoque consistió en utilizar estos biomateriales, bien como implantes o como rellenos para aumentar la apariencia del tejido rellenando los huecos de tejido o mediante un relleno del tejido, o bien utilizar estas fibras como implantes o cargas para mejorar una función defectuosa.

La elastina fue considerada ventajosa por algunos para este trabajo debido a que, a diferencia del colágeno, podría utilizarse para formar implantes elásticos y cargas. El trabajo inicial se centró en la síntesis de formas recombinantes de tropoelastina que posteriormente coacervaría y se reticularía química o enzimáticamente, antes o después de su administración a un paciente, de modo que se formaría un implante o carga elástica *ex vivo* o *in vivo* para rellenar huecos de tejido o para aumentar o dar nueva forma a un tejido. Véase por ejemplo WO1994/14958; WO1999/03886; W02000/04043.

W02010/102337 se refiere a la relevancia de la concentración de sólidos en la formación de un biomaterial inyectable reticulado.

35 Cuando se utilizó reticulación enzimática *in vivo*, se utilizó una lisil oxidasa recombinante u otra exógena. El documento USSN 09/498.305 describe un enfoque para la reticulación enzimática de los monómeros de tropoelastina *in vivo* mediante la administración de una composición que incluye lisil oxidasa exógena y monómeros de tropoelastina.

Otro enfoque para la formación de un material similar a ciertas características de la tropoelastina reticulada se describe en W02008/058323, donde se describe un material elástico que comprende tropoelastina no reticulada que se forma en condiciones alcalinas.

En cada uno de los ejemplos anteriores, se utilizan la tropoelastina exógena y el agente de reticulación o se utilizan condiciones alcalinas para impulsar la formación del implante o carga. El tiempo hasta la formación del producto final elástico es una función de la concentración de tropoelastina, del agente de reticulación y de las condiciones correspondientes, de modo que el producto final es el resultado de un proceso que es acelular.

Se contemplaron también diversos otros usos de la tropoelastina, incluidas: (i) como sellante de heridas (WO94/14958); (ii) como vehículo de administración de ingredientes activos que proporciona formulaciones biodegradables o biodisociables de liberación retardada (WO94/14958) (iii) como un reactivo de unión para GAG (WO99/03886); (iv) para interferir con la deposición de elastina (WO99/03886); y (v) en zonas de heridas, lugares de daño al tejido y remodelación donde normalmente se encuentran las serín-proteasas (WO00/04043).

El trabajo inicial sugería que podrían utilizarse múltiples formas de tropoelastina para una cualquiera de las aplicaciones anteriores. Véase por ejemplo el documento WO94/14958, que se refiere a una forma sintética de tropoelastina humana que incluye el dominio 26A. WO94/14958 describe formas de mamíferos y de aves para su uso en composiciones farmacéuticas; WO99/03886, que se refiere a una serie de formas sintéticas de la tropoelastina humana, incluidas aquellas que carecen del dominio 26A, el dominio C-terminal y otras. WO99/03886 describe formas humanas y no humanas para su uso en aplicaciones farmacéuticas. Una forma particular, SHELδ26A se considera con referencia a una falta de la actividad de unión de GAG; y WO00/04043, que se refiere a formas de tropoelastina con susceptibilidad reducida a serín-proteasas, específicamente trombina, plasmina, calicreína, gelatinasas A y B y metaloelastasa de la matriz. WO00/04043 describe las formas relevantes de tropoelastina con susceptibilidad reducida, (denominadas "derivado de tropoelastina reducida") útiles en estas aplicaciones, que incluyen formas de longitud parcial y completa y formas xenogénicas.

65 En cada ejemplo de este trabajo inicial, aun cuando podía proporcionarse un implante con propiedades elásticas al tejido, la naturaleza del implante y sus propiedades elásticas no sugerían que se confirieran estas normalmente a los tejidos. Por

ejemplo, como se describe en este trabajo inicial, las propiedades elásticas transmitidas por una carga o implante a tejido dérmico o subcutáneo, podrían percibirse como claramente distintas a la elasticidad normal de ese tejido. En otras palabras, mientras que podría transmitirse elasticidad a un tejido mediante la implantación de un material con propiedades que incluyen la elasticidad, no podría transmitirse un retorno a una apariencia o función física parecida a la normal.

En retrospectiva, este resultado tal vez no sea sorprendente, dado que el trabajo más reciente realizado en los últimos 5 a 10 años ha revelado que el perfil elástico de un tejido dado es el resultado de un proceso complejo que implica múltiples factores además de la lisil oxidasa y la tropoelastina, proceso conocido como 'elastogénesis'. De forma general se entiende que la elastogénesis se refiere a un proceso fisiológico que aparece desde la vida fetal tardía a la vida postnatal temprana, por el cual células, que incluyen los fibroblastos, células del músculo liso y similares, crean *de novo* fibra elástica a partir de monómeros de tropoelastina y otros factores relevantes. Comenzando con un conjunto común de factores, un tejido relevante posibilita una interacción específica de tejido de estos factores, dando lugar a una síntesis, organización y distribución de fibra elástica que es natural para el tejido relevante y a partir del cual surge el perfil elástico del tejido (Cleary E.G and Gibson M.A. Elastic Tissue, Elastin and Elastin Associated Microfibrils in Extracellular Matrix Vol 2 Molecular Components and Interactions (Ed Comper W.D.) Harwood Academic Publishers 1996 p95). Lo que ha quedado claro es que esta organización y el perfil concomitante no pueden recrearse simplemente reticulando la tropoelastina exógena con lisil oxidasa exógena, ya sea *ex vivo* o *in vivo*, como proponen los trabajos iniciales.

La iniciación de un proceso que sea como la elastogénesis (es decir, uno por el que el tejido sintetiza una fibra elástica *de novo* a partir de un conjunto común de factores) en tejidos adultos es un objetivo deseable porque se cree que este proceso restauraría un perfil elástico a un tejido. Por ejemplo, podría restaurarse un perfil elástico de un tejido envejecido de modo que el perfil del tejido se asemeje al de un tejido más joven. Desafortunadamente, el objetivo sigue siendo difícil de alcanzar, principalmente debido a que hay una formación despreciable de fibra elástica *de novo* en un adulto. Aunque la reparación de la fibra elástica puede producirse en algunas enfermedades cardiovasculares y pulmonares, la integridad y la organización de las fibras elásticas que surgen de los mecanismos de reparación es distinta de la que surge de la elastogénesis. (Akhtar y col. 2010 J. Biol. Chem. 285: 37396-37404).

Este problema se ha estudiado de forma intensiva por una serie de grupos de investigación en la última década (Huang R y col., Inhibition of versican synthesis by antisense alters smooth muscle cell phenotype and induces elastic fiber formation in vitro and in neointima after vessel injury. Circ Res. 2006 Feb 17; 98(3):370-7; Hwang JY y col., Retrovirally mediated overexpression of glycosaminoglycan-deficient biglycan in arterial smooth muscle cells induces tropoelastin synthesis and elastic fiber formation in vitro and in neointimae after vascular injury. Am J Pathol. 2008 Dec;173(6):1919-28; Albertine KH y col., Chronic lung disease in preterm lambs: effect of daily vitamin A treatment on alveolarization. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010 Jul 299(1):L59-72; Mitts TF y col., Aldosterone and mineralocorticoid receptor antagonists modulate elastin and collagen deposition in human skin. J Invest Dermatol. 2010 Oct;130(10):2396-406; Sohm B y col., Evaluation of the efficacy of a dill extract in vitro and in vivo. Int J Cosmet Sci. 2011 Apr;33(2): 157-63; Cenizo V y col., LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin; a dill extract induces the LOXL gene expression. Exp Dermatol. 2006 Aug;15(8):574-81). La hipótesis ampliamente considerada para explicar la ausencia de formación de fibra elástica *de novo* en un adulto es que las células adultas o el tejido relevante en el que está contenida carece de uno o más de los factores necesarios y procesos requeridos para la elastogénesis (Shifren A y Mecham R.P. The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. Proc Am Thorac Soc Vol 3 pág. 428-433 2006). Según la hipótesis, la provisión de tropoelastina sintética a tejido adulto no debería permitir que una célula adulta sintetice la fibra elástica a partir de la tropoelastina sintética.

La investigación actual se ha centrado en la comprensión de los mecanismos y factores que sustentan la elastogénesis en la vida temprana y en determinar si están presentes en la vida adulta (Wagenseil JE y Mecham RP. New insights into elastic fiber assembly. Birth Defects Res C Embryo Today. 2007 Dec;81(4):229-40).

De forma general se cree que poco después de la expresión de la proteína tropoelastina, esta se transforma en un conjunto de esferas de aproximadamente 200-300 nm que posteriormente se fusionan en partículas de aproximadamente un micrómetro. Estas partículas se ensamblan seguidamente a lo largo de la longitud de las microfibrillas en la matriz extracelular, formando con ello fibra elástica (Kozel BA y col., Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. J Cell Physiol. 2006 Apr;207(1):87-96). Se sigue explorando la implicación de un intervalo de factores adicionales en este proceso.

Los estudios *in vitro* de las distintas etapas moleculares han tendido a examinar sustratos de tropoelastina humana y no humana y una gama de distintas isoformas de tropoelastina (Davidson JM y col., Regulation of elastin synthesis in pathological states. Ciba Found Symp. 1995;192:81-94; discussion 94-9). En este trabajo se ha revelado que al menos 34 diferentes moléculas están asociadas a fibras elásticas, aunque solo algunas de estas han demostrado estar implicadas estructuralmente en la producción de fibra. Estas incluyen tropoelastina, fibrilina 1, fibrilina 2, lisil oxidasa, proteína similar a lisil oxidasa 1 (LOXL1), emilina, fibulina 4 y fibulina 5 (Chen y col. 2009 J. Biochem 423: 79- 89). Un grupo considera a LOXL1, un miembro de la familia LOX, la molécula clave que falta en determinados tejidos adultos (véase US-2004/0258676, US-2004/0253220 y US-20100040710). Otros grupos identifican la fibulina 4 y otras moléculas, sea a través de la interacción con la lisil oxidasa o con otras moléculas (Yanagisawa H y Davis EC. Unraveling the mechanism of elastic fiber assembly: The roles of short fibulins. Int J Biochem Cell Biol. 2010 Jul;42(7): 1084-93).

En resumen, aun cuando todavía no está completa la imagen respecto a la interacción de los factores en la elastogénesis, la investigación actual indica que las células y tejidos adultos no completan un proceso similar a la elastogénesis debido a que carecen de uno o más factores. Como consecuencia de ello, la provisión de tropoelastina sola a tejidos adultos no debería ser suficiente en sí misma para restablecer el perfil elástico del tejido, porque sin los factores relevantes requeridos para la elastogénesis, el tejido no puede utilizar la tropoelastina para formar una fibra elástica.

Sigue siendo necesario restaurar o recrear un perfil elástico de un tejido, o reducir al mínimo la degeneración de un perfil elástico de un tejido.

Es necesario mejorar el perfil elástico de un tejido envejecido de modo que se asemeje más estrechamente al perfil del tejido en una etapa de vida más temprana.

Existe la necesidad de mejorar el aspecto físico del tejido envejecido, incluido el tejido envejecido por la luz, por ejemplo para minimizar la piel flácida, tejido subcutáneo relajado, pérdida de densidad de la matriz extracelular, arrugas y estrías.

También es necesario mejorar el perfil elástico en tejido cicatricial o fibrótico de modo que el perfil se asemeje más estrechamente al perfil del tejido pertinente que contiene el tejido cicatricial o fibrótico antes de la lesión del tejido.

También es necesario proporcionar una función elástica mejorada en tejido envejecido o lesionado que se asemeje más estrechamente a la función elástica del tejido pertinente en una etapa anterior de la vida o antes de la lesión.

Las necesidades mencionadas anteriormente son distintas de las planteadas por implantes o cargas, y del uso de los mismos para rellenar el tejido con tropoelastina reticulada, como en el estado de la técnica relevante anteriormente mencionado.

La invención está definida por las reivindicaciones y pretende abordar, una o más de las necesidades anteriormente mencionadas.

Sumario

En una realización se proporciona un método para restaurar un perfil elástico de un tejido de una persona, que incluye:

- proporcionar una persona que tenga un tejido en el que debe restaurarse el perfil elástico;
- administrar tropoelastina a la persona, según un régimen de tratamiento seleccionado para mantener la tropoelastina administrada en el tejido durante un período de tiempo que permite que los factores expresados en el tejido para la formación de una fibra elástica se unan a la tropoelastina administrada para la síntesis de fibra elástica a partir de la misma;
- restableciendo o recreando así el perfil elástico del tejido de la persona.

En otra realización se proporciona un método para minimizar la degeneración de un perfil elástico de un tejido de una persona, que incluye:

- proporcionar una persona que tenga un tejido en el que deba minimizarse la degradación de un perfil elástico;
- administrar tropoelastina a la persona, según un régimen de tratamiento seleccionado para mantener la tropoelastina administrada en el tejido durante un período de tiempo que permite que los factores expresados en el tejido para la formación de una fibra elástica se unan a la tropoelastina administrada para la síntesis de fibra elástica a partir de la misma;
- reduciendo con ello la degeneración de un perfil elástico de un tejido de una persona.

En otra realización se proporciona un método para mejorar el perfil elástico de un tejido envejecido de modo que se asemeje más estrechamente al perfil del tejido en una fase anterior de la vida, que incluye:

- proporcionar una persona que tenga un tejido en el que deba mejorarse el perfil elástico;
- administrar tropoelastina a la persona, según un régimen de tratamiento seleccionado para mantener la tropoelastina administrada en el tejido durante un período de tiempo que permite que los factores expresados en el tejido para la formación de una fibra elástica se unan a la tropoelastina administrada para la síntesis de fibra elástica a partir de la misma;
- mejorando con ello el perfil elástico del tejido envejecido de modo que se asemeje más estrechamente al perfil del tejido en una etapa de vida más temprana.

En otra realización se proporciona un método para mejorar el aspecto físico de tejido envejecido, que incluye:

5 - proporcionar una persona que tenga un tejido en el que debe mejorarse el aspecto físico;

- administrar tropoelastina a la persona, según un régimen de tratamiento seleccionado para mantener la tropoelastina administrada en el tejido durante un período de tiempo que permite que los factores expresados en el tejido para la formación de una fibra elástica se unan a la tropoelastina administrada para la síntesis de fibra elástica a partir de la misma;

10 - mejorando con ello el aspecto físico del tejido envejecido.

En otra realización se proporciona un método para mejorar el perfil elástico en tejido cicatricial o fibrótico de modo que el perfil se asemeje más estrechamente al perfil del tejido pertinente que contiene el tejido cicatricial o fibrótico antes de la lesión del tejido, que incluye:

15 - proporcionar una persona que tenga tejido cicatricial o fibrótico;

20 - administrar tropoelastina a la persona, según un régimen de tratamiento seleccionado para mantener la tropoelastina administrada en el tejido durante un período de tiempo que permite que los factores expresados en el tejido para la formación de una fibra elástica se unan a la tropoelastina administrada para la síntesis de fibra elástica a partir de la misma;

25 - mejorando con ello el perfil elástico en tejido cicatricial o fibrótico.

En otra realización se proporciona un método para mejorar la función elástica en tejido envejecido o lesionado elástico que se asemeje más estrechamente a la función elástica del tejido pertinente en una etapa anterior de la vida o antes de la lesión, que incluye:

30 - proporcionar una persona que tenga un tejido envejecido o lesionado;

35 - administrar tropoelastina a la persona, según un régimen de tratamiento seleccionado para mantener la tropoelastina administrada en el tejido durante un período de tiempo que permite que los factores expresados en el tejido para la formación de una fibra elástica se unan a la tropoelastina administrada para la síntesis de fibra elástica a partir de la misma;

- mejorando así la función elástica en tejido envejecido o lesionado.

40 En otra realización se proporciona un método para proporcionar elasticidad a la piel de una persona, preferiblemente para proporcionar espesor a la piel de una persona al tiempo que se mantiene o mejora la elasticidad de la piel de la persona, incluyendo el método las siguientes etapas:

- proporcionar una persona;

45 - definir un área de tratamiento sobre la piel de la persona, en donde el área de tratamiento es un área de la piel en la que va a proporcionarse elasticidad;

50 - inyectar una composición de tropoelastina dentro del área de tratamiento para establecer una cantidad de tropoelastina dentro del área de tratamiento que es mayor con respecto a la piel fuera del área de tratamiento;

- mantener la cantidad de tropoelastina en el área de tratamiento durante un periodo de tiempo previamente determinado, proporcionando con ello elasticidad a la piel de una persona.

55 En otra realización se proporciona una composición de tropoelastina según se describe en la presente memoria para su uso en una o más de las siguientes aplicaciones:

• restaurar un perfil elástico de un tejido de una persona

60 • minimizar la degeneración de un perfil elástico de un tejido de una persona

• mejorar el perfil elástico de un tejido envejecido de modo que se asemeje más estrechamente al perfil del tejido en una etapa de vida más temprana

65 • mejorar el aspecto físico del tejido envejecido

- mejorar el perfil elástico en tejido cicatricial o fibrótico de modo que el perfil se asemeje más estrechamente al perfil del tejido pertinente que contiene el tejido cicatricial o fibrótico antes de la lesión del tejido

- mejorar la función elástica en tejido envejecido o lesionado que se asemeje más estrechamente a la función elástica del tejido pertinente en una etapa anterior de la vida o antes de la lesión.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1: Imágenes de fluorescencia que muestran redes de elastina formadas 7 días después de la adición de 250 µg/ml de tropoelastina a fibroblastos humanos cultivados obtenidos a partir de distintos grupos de edad. A. Neonatales primarias de varón (NHF 8-9-09); E. Varón de 10 años de edad (GM3348); C. Varón quemado de 31 años de edad (230209A); D. Varón de 51 años de edad (142BR); E. Varón de 92 años de edad (AG04064). La deposición de la red de elastina es de color verde, los núcleos celulares son de color azul.

15 Figura 2: Imágenes de fluorescencia que muestran la deposición de elastina 7 días después de la adición de tropoelastina a fibroblastos cultivados de cerdo y conejo. A. Fibroblastos primarios de piel de cerdo de 10 semanas; B. Fibroblastos adultos de la piel de conejo. La deposición de elastina es de color verde, los núcleos celulares son de color azul.

20 Figura 3: Imágenes de fluorescencia que muestran la formación de fibras de elastina por las células del músculo liso de las vías respiratorias principales 7 días después de la adición de tropoelastina. A. Células del músculo liso de vías respiratorias (3785). B. Otra fuente de células del músculo liso de vías respiratorias (3791). La deposición de elastina es de color verde, los núcleos celulares son de color azul.

25 Figura 4: Imágenes de fluorescencia que muestran la formación de fibras de elastina por fibroblastos humanos neonatales primarios 7 días después de la adición de tropoelastina o derivados. A. Sin tropoelastina; B. Tropoelastina de longitud completa; C. Péptidos de elastina de piel humana; D. Deleción de RKRK; E. Sustitución de RGDS. F. Tropoelastina de Advanced Biomatrix. La deposición de elastina es de color verde, los núcleos celulares son de color azul.

30 Figura 5: Imágenes de fluorescencia que muestran la formación de fibra de elastina por fibroblastos humanos primarios neonatales 7 días después de la adición de 125 de µg/ml de tropoelastina en ausencia (A) y en presencia (B) de blebistatina 50 µM. La deposición de elastina es de color verde, los núcleos celulares son de color azul.

35 Figura 6: Imágenes de fluorescencia que muestran el grado de formación de la red de elastina por fibroblastos humanos neonatales primarios tras adiciones repetidas de tropoelastina. A. Células; B. Células + adición de tropoelastina el Día 10; C. Células + adiciones de tropoelastina el Día 10 y el Día 17; D. Células + adiciones de tropoelastina el Día 10, Día 17 y Día 24. Todas las muestras se fijaron para las imágenes el Día 31. La deposición de elastina es de color verde, los núcleos celulares son de color azul.

40 Figura 7: Fibras de elastina madura autofluorescentes. (A) fibroblastos sin tropoelastina añadida, (B) fibroblastos con tropoelastina añadida.

45 Figura 8: Análisis de AFM de cultivos de fibroblastos dérmicos humanos. Las imágenes representan la topografía del cultivo superpuesta con el canal de módulo. (A) fibroblastos sin tropoelastina añadida, (B) fibroblastos con tropoelastina añadida.

Figura 9: Formación de fibra elástica por fibroblastos neonatales dérmicos humanos. Se añadió tropoelastina 12 días después de la siembra y las muestras se tiñeron con DAPI, anticuerpo de ratón antielastina y anticuerpo antirratón conjugado con FITC.

50 Figura 10: La inhibición de la lisil oxidasa impide la formación de fibra elástica. Formación de fibras de elastina en presencia del inhibidor BAPN de la lisil oxidasa. Las muestras se tiñen con DAPI, anticuerpo antielastina de ratón y anticuerpo antirratón conjugado con FITC.

55 Figura 11: Imágenes de microscopía de alta resolución de esférulas de tropoelastina en un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos. (A) Barra de escala de 1 micrómetro. (B) Barra de escala de 2 micrómetros.

Figura 12: Imágenes de MET de un cultivo de fibroblastos dérmicos humanos de 3 días después de añadir tropoelastina.

60 Figura 13: Secciones con tinción de Verhoeff-Van Gieson (VVG) de biopsias de la semana 2. Tinción de VVG para la elastina en secciones transversales dérmicas en piel de cerdo 2 semanas después del tratamiento de una herida de espesor completo con constructos que contienen tropoelastina. El ensayo A es una plantilla de colágeno reticulado, reticulado en presencia de tropoelastina al 10 %. El ensayo B es una plantilla de colágeno reticulado aplicada sobre la parte superior de una matriz de tropoelastina reticulada a un AH modificado. Las imágenes se comparan con la piel de cerdo normal y con el Control, que es una plantilla de colágeno reticulado.

65

Figura 14: Secciones de biopsias de piel tomadas de pacientes tratados con RVL o con formulaciones basadas en elastina en la dermis de la parte superior del brazo. (A) La piel tratada con RVL muestra fibras de colágeno dérmico separadas por material de RVL sin teñir, lo que hace a la piel más rígida y nodular. (B) La piel tratada con formulaciones basadas en tropoelastina dan lugar a fibras de colágeno dérmico separadas por material de implante que se tiñe mediante VVG de azul a púrpura a negro, lo que indica que el material de implante se remodela a fibras de elastina madura.

Descripción detallada de las realizaciones

Se cree que los hallazgos clave de la invención surgen de un nuevo sistema de ensayo desarrollado por los inventores e ilustrado en los ejemplos de la presente memoria. El sistema de ensayo utiliza células humanas adultas para formar fibra elástica *in vitro*. El sistema puede manipularse para permitir la disección de cada etapa de formación de fibra elástica, y para identificar los componentes y procesos necesarios para la formación de fibra elástica.

Este sistema de ensayo ha revelado una ruta de síntesis de fibra elástica distinta de como se entendía la misma antes de la invención. Un hallazgo clave es que la formación de fibra es mucho más dependiente de una interacción celular de lo que se creía anteriormente.

Un hallazgo clave es que el sistema no da lugar a una síntesis sustancial o de otro modo significativa de fibra elástica a menos que se añada al sistema monómeros de tropoelastina exógena. Esto señala la importancia de la tropoelastina en la síntesis de fibra elástica *in vivo*.

Además de esto, el sistema demuestra que la formación de fibra elástica no se produce de forma eficiente si el sistema utiliza monómeros de tropoelastina humana con células no humanas.

Además, de forma general se requiere que los monómeros tomen la forma de una o más isoformas naturales. Mientras que los monómeros pueden sintetizarse de forma recombinante, se ha descubierto que formas recombinantes que tienen una secuencia o estructura que no existe en la fisiología humana no permiten una formación eficiente de fibra elástica, si bien la formación de fibra sigue siendo posible hasta cierto punto siempre que la diferencia entre la secuencia endógena y la de la tropoelastina exógena no sea inferior a aproximadamente 65 % de homología.

Además de esto, la administración repetida de tropoelastina al sistema demuestra una capacidad continua para formar fibra elástica, lo que indica que la tropoelastina es el factor limitante en la formación de fibra elástica.

Se cree que el uso de células humanas adultas y de isoformas de tropoelastina humana naturales distingue al sistema de ensayo de otros (véase por ejemplo [Sato F y col., Distinct steps of cross-linking, self-association, and maturation of tropoelastin are necessary for elastic fiber formation. J Mol Biol. 2007 Jun 8;\(3\) 369: 841 - 51](#)) y es probable que esto sea el motivo por el que estos grupos de investigación relevantes no hayan comprendido que las células humanas adultas tienen potencial de síntesis de fibra elástica en un proceso similar a la elastogénesis, siempre que las células estén expuestas a la tropoelastina.

En estudios adicionales, un ensayo clínico ilustrado en la presente memoria establece la importancia de mantener la tropoelastina en el tejido durante un tiempo suficiente para que las células se unan a la tropoelastina. Puede conseguirse esto estableciendo y manteniendo un nivel de tropoelastina en un área de tejido a tratar durante un periodo seleccionado de tiempo de forma que el área tratada tenga un nivel de tropoelastina superior al de un área sin tratar. Se cree que, siempre que la tropoelastina persista en el tejido durante un período de tiempo suficientemente prolongado requerido para la participación de las células, o cuando el tejido tiene pocas células, para el reclutamiento y la participación de células, puede producirse un proceso similar a la elastogénesis en tejido adulto, que dé lugar a la formación de fibra y a la restauración del perfil elástico en el tejido. Más adelante se describen con mayor detalle ejemplos de períodos de tiempo para la persistencia o mantenimiento de la tropoelastina en los tejidos.

Se entenderá que la fibra elástica formada según la invención puede tener la misma estructura molecular que la observada en la naturaleza, aunque en algunas realizaciones, la estructura molecular y/o física de la fibra pueden ser distintas. En determinadas realizaciones, la fibra elástica puede tener una estructura física distinta de la del tejido tratado, al tiempo que se siguen manteniendo los objetivos de la invención.

En realizaciones específicas, la elastina que se sintetiza según los métodos de la invención se integra en los tejidos, células y/o en la matriz extracelular, restableciendo o recreando el perfil elástico, mejorando el aspecto físico o alcanzando otros criterios de valoración clínicos. En estas realizaciones, la elastina sintetizada puede tener distinta estructura física o molecular en comparación con la fibra elástica normalmente observada en el tejido, y la obtención de un criterio de valoración puede ser el resultado de la interacción entre, o de la participación de, la elastina y los demás componentes del tejido relevante. La interacción o participación puede modelar ostensiblemente aquellos procesos observados normalmente entre la fibra elástica y los elementos del tejido en el tejido relevante.

En una realización, la fibra elástica formada según la invención se proporciona en una forma hidratada, confiriendo con ello a la fibra un potencial elástico.

Los estudios que conforman la base de esta invención demuestran que es posible una restauración o recreación de perfil elástico en tejido adulto debido a que células adultas tales como fibroblastos, células del músculo liso y similares, tienen un potencial elastogénico; es decir, la capacidad de participar en un proceso similar a la elastogénesis y que por lo tanto proporciona un perfil elástico relevante al tejido. Además, el potencial se realiza siempre que se proporcionen células adultas con las especies e isoformas correspondientes de monómero de tropoelastina potencialmente relevantes para el tejido. Además, los inventores han demostrado que la tropoelastina recombinante humana que contiene niveles significativos de impurezas no da lugar a una formación eficiente de fibra de elastina. En determinadas realizaciones, la tropoelastina tiene un grado de pureza especificado con respecto a la cantidad de tropoelastina en una composición para administración, comparado con las cantidades de otras proteínas o moléculas en la composición. En una realización, la tropoelastina está en una composición que tiene al menos 75 % de pureza, preferiblemente 85 % de pureza, más preferiblemente más de 90 o 95 % de pureza. Se entenderá que en determinadas realizaciones, la tropoelastina puede proporcionarse en forma de una composición que consiste en, o consiste esencialmente en, tropoelastina, preferiblemente una isoforma de tropoelastina de longitud completa. Por último, las células son incapaces de utilizar tropoelastina para formar fibra elástica si la tropoelastina ya se ha reticulado intramolecularmente de modo sustancial.

Según la invención, el régimen de tratamiento es uno que mantiene la tropoelastina dentro de un área de tratamiento definida de un tejido durante un tiempo suficiente dentro del cual las células puedan participar y emplear la tropoelastina administrada para formar fibra elástica. Un régimen adecuado puede implicar más de una única administración de monómeros de tropoelastina, o más que la administración de monómero sin adulterar, puesto que se cree que los monómeros de tropoelastina tienen una semivida dentro de un área de tratamiento definida de tejido que es generalmente inferior a la requerida para que las células relevantes formen fibra elástica. Más detalladamente, se cree que los monómeros de tropoelastina que no interactúan con células se metabolizan en un área de tratamiento, o se dispersan desde un área de tratamiento. Por ello, sin la selección de un régimen de tratamiento adecuado, una tropoelastina administrada puede agotarse ostensiblemente de un área de tratamiento definida antes de que pueda ser utilizada por una célula para formar una fibra elástica.

Una etapa en los regímenes de tratamiento descritos adicionalmente más adelante puede incluir una administración única de tropoelastina cuando se sepa que el lugar en el que se administra la tropoelastina tiene un número significativo de células. El conocimiento del número de células o de la densidad puede obtenerse del conocimiento histológico previo del tejido. De forma alternativa, el sitio de administración puede haberse tratado previamente con un tratamiento para inducir la proliferación o reclutamiento de células en el sitio de tratamiento.

Podrían adoptarse varios regímenes de tratamiento para mantener la tropoelastina administrada en el tejido durante el tiempo requerido en un área de tratamiento. Estos procesos son de forma general los siguientes:

(i) administración de tropoelastina en una formulación de liberación sostenida que libera gradualmente tropoelastina durante un período de tiempo.

La liberación sostenida de tropoelastina en el tejido requerido puede lograrse mediante la incorporación de la tropoelastina a un vehículo de administración no degradable o degradable. Un experto en la técnica podría utilizar varios de estos enfoques de liberación sostenida. Preferiblemente se emplea una formulación degradable de liberación sostenida para evitar la necesidad de eliminar el vehículo una vez administrada la tropoelastina. Dichos vehículos de administración pueden estar compuestos de polímeros tales como polilactida (PLA) y poli(lactida-co-glicólido) (PLGA). Otros vehículos de administración sostenida pueden incluir polímeros formados a partir de polisacáridos tales como ácido hialurónico, goma xantano o quitosano. Además, en algunas realizaciones el vehículo de administración puede modificarse químicamente para unir la tropoelastina mediante enlaces iónicos o covalentes al implante, de modo que la tropoelastina se libere únicamente a medida que se degrada el implante.

En algunas realizaciones, la tropoelastina se libera en el sitio de tratamiento requerido durante un período de entre 1 a 90 días. En algunas realizaciones, la tropoelastina puede liberarse en el sitio de tratamiento requerido por entre 1 a 180 días. En algunas realizaciones, la tropoelastina puede formularse de modo que se libere únicamente tras un retraso después de la aplicación del implante, tal como de 10 a 90 días o de 10 a 180 días. Otros tiempos adecuados de suministro de tropoelastina incluyen 1 a 30 días, 1 a 60 días, 10 a 60 días, 30 a 60 días, 30 a 180 días, o para 1 a >180 días.

La cantidad y la concentración de tropoelastina a administrar depende del área y volumen de tejido a tratar, de los niveles endógenos típicos de elastina presentes normalmente en el tejido; y del nivel de síntesis de fibra de elastina requerido. De forma típica, la tropoelastina se administrará al tejido en una cantidad de 1 μg a 1 mg por cada cm^3 de tejido. Para la piel, esta cantidad puede calcularse como 1 μg a 1 mg por cm^2 . Otras cantidades que pueden suministrarse incluyen 0,1 μg a 10 mg por cm^3 de tejido, 1 mg a 20 mg por cm^3 tejido o 1 mg a 100 mg por cm^3 de tejido. En algunas realizaciones, las cantidades suministradas puede ser inferiores a 0,1 μg o superiores a 100 mg por cm^3 de tejido. La concentración de tropoelastina en los implantes que se aplicarán en el lugar tratado puede variar para hacer posible que se suministren las cantidades de tropoelastina requeridas. En determinadas realizaciones, la concentración de tropoelastina en los implantes puede variar de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 100 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de tropoelastina en el producto estará entre 0,5 mg/ml y 200 mg/ml, 1 mg/ml y 50 mg/ml, 5 mg/ml y 50 mg/ml o 1 mg/ml y 25 mg/ml.

La tropoelastina incorporada en la formulación deberá ser sustancialmente equivalente a una isoforma de tropoelastina que se encuentra de forma natural en el tejido a tratar. Además, la tropoelastina deberá proporcionarse en una forma que esté sustancialmente exenta de impurezas. En este contexto, los fragmentos de tropoelastina, p. ej., formas truncadas de una isoforma de tropoelastina que surgen de forma no intencionada durante la fabricación de tropoelastina, pueden considerarse una impureza. En determinadas realizaciones, la tropoelastina incorporada a la formulación de tratamiento será al menos 65 % de la longitud de la isoforma de tropoelastina de longitud completa correspondiente, más preferiblemente 80 % de la isoforma de tropoelastina de longitud completa correspondiente. En otras realizaciones, la tropoelastina será más de 85 %, más de 90 % o más de 95 % de la longitud completa. Como se describe en la presente memoria, determinadas secuencias de la tropoelastina son más críticas que otras; por ejemplo, la eficiencia de formación de fibra aumenta cuando la secuencia C-terminal final de aminoácidos de la tropoelastina de aproximadamente 4 residuos posee homología o identidad con la secuencia de tropoelastina endógena del tejido pertinente.

También pueden incluirse componentes adicionales en la formulación para ayudar a la activación de las células necesarias en el tejido para formar la fibra elástica. Por ejemplo, para el tratamiento de la piel, pueden incorporarse componentes adicionales en la formulación que ayuden en el reclutamiento o proliferación de células de fibroblastos en el sitio de tratamiento. Estos componentes incluyen la familia del factor de crecimiento epidérmico, la familia del factor de crecimiento transformante beta, la familia del factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento endotelial vascular, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, el factor de crecimiento derivados de plaquetas, el factor de crecimiento del tejido conectivo, la familia de las interleucinas, y la familia del factor de necrosis tumoral α .

En determinadas realizaciones, el tratamiento puede incluir también el suministro de las células al sitio de tratamiento con la tropoelastina. A modo de ejemplo, para el tratamiento de la piel, los fibroblastos pueden incluirse en la formulación del tratamiento o procedimiento para ayudar a la síntesis de fibra elástica en el sitio de tratamiento. Las células de fibroblastos pueden obtenerse de una fuente alogénica tal como el prepucio neonatal u obtenerse mediante biopsia de un lugar no visible de la piel (p. ej. detrás de la oreja) y utilizarse como un tratamiento autólogo.

(ii) administración de tropoelastina en las que se han eliminado las regiones susceptibles a las proteasas o bloqueado su acceso por parte de las enzimas presentes en el tejido

La tropoelastina utilizada en el tratamiento puede modificarse para reducir la degradación por proteasas. Por ejemplo, las especies de proteína pueden seleccionarse como se describe en W02000/04043 en la medida en que sigan siendo especies de tropoelastina sustancialmente de longitud completa encontradas de forma natural en el tejido a tratar. De forma alternativa, las formulaciones del tratamiento pueden incorporar inhibidores de proteasa o moléculas que bloquean las rutas de señalización que se sabe aumentan la expresión de las proteasas. Dichas moléculas incluyen inhibidores de la serín-proteasa, inhibidores de metaloproteinasas de la matriz, galactósidos tales como lactosa, anticuerpos inhibidores e inhibidores en forma de moléculas pequeñas de la señalización de la elastina

(iii) administración repetida de tropoelastina en puntos temporales predefinidos.

En determinadas realizaciones, para asegurar que la tropoelastina se administra en una forma que pueda ser utilizada por las células como sustrato para la construcción de fibra elástica y permanecer en el sitio de tratamiento durante un período de tiempo suficiente para que esto sea posible, el tratamiento se aplica al lugar de forma repetida.

En determinadas realizaciones, cada lugar de tejido a tratar recibirá los tres tratamientos del producto, con una diferencia de 1 a 24, o de 2 a 12 o de 3 a 6 semanas. El tratamiento puede consistir en múltiples inyecciones en el área a tratar, cada una de ellas separada aproximadamente a 10 mm entre sí en una formación de rejilla. El tratamiento puede administrarse utilizando una aguja de calibre fino, tal como 27G, 29G, 30G o 31G. La aguja puede insertarse en el tejido teniendo en cuenta el ángulo y la orientación del bisel, la profundidad de inyección, y la cantidad de material a administrar. El tratamiento puede inyectarse en el tejido en forma de bolo, por ejemplo con un volumen de 10-100 μ l, 10-50 μ l, preferiblemente 20 a 30 μ l de producto implantado en cada sitio de inyección. Tras completar cada inyección, la aguja puede retirarse lentamente. Cuando se han completado todos los implantes, si es necesario pueden masajearse suavemente los sitios tratados para permitir que el material del implante se adapte al contorno de los tejidos circundantes. El número de tratamientos, el período entre tratamientos y la cantidad de tropoelastina administrada en cada sitio de tratamiento se ajustarán sobre la base del área de tejido a tratar y del nivel de elasticidad a restaurar.

Cualquiera de estos enfoques podrá aplicarse de forma individual o en combinación, aumentando de este modo la persistencia de la tropoelastina en el tejido.

Se reconocerá en cada uno de los enfoques que la etapa de administración es un procedimiento invasivo con potencial de causar lesiones reversibles en tejidos o células y el inicio de las diversas cascadas inflamatorias que aparecen como respuesta a dicha lesión. Los inventores reconocen que este tipo de tratamiento físico puede aplicarse para crear condiciones de lesiones celulares reversibles, dado que es probable que dichas condiciones estimulen la activación y/o la proliferación de los fibroblastos. Es importante tener en cuenta que el tratamiento físico no es suficiente para inducir la fibrosis.

- Según se describe en la presente memoria, las consideraciones que guían una selección de un régimen de tratamiento particular incluyen la naturaleza del tejido, la amplitud de la degradación o degeneración de perfil de elastina, y el resultado deseado. De nuevo, un aspecto crítico de la invención es que se dé a las células la oportunidad de formar, reparar o sintetizar fibra elástica a partir de la tropoelastina que se les proporciona. Hay una mayor oportunidad donde, debido a la liberación sostenida, la protección frente a la degradación o a un suministro continuo, la tropoelastina persiste de modo eficaz en los tejidos durante un período de tiempo mayor. De forma general, cuanto mayor sea la pérdida de perfil elástico y más acelular sea el tejido, más adecuado es que un régimen de tratamiento deba proporcionar persistencia de la tropoelastina en el tejido durante un período de tiempo más prolongado.
- 5 Más detalladamente, un tiempo de persistencia más corto puede ser adecuado cuando el objetivo sea mejorar el aspecto físico de la piel más joven, comparada con dicha mejora en una piel más vieja. Aquí, puede ser más adecuada la administración repetida de tropoelastina en puntos temporales predefinidos según (iii) y/o (i) anteriores.
- 10 Puede ser necesario un tiempo de persistencia más prolongado cuando el tejido es cicatricial o fibrótico y esencialmente acelular. Aquí será importante dejar un tiempo suficiente para la quimiotaxis de las células hacia el tejido en cuestión. Un régimen según (ii) y/o (i) puede ser más adecuado.
- 15 Como se ha mencionado, el resultado también es una consideración importante que guía la selección de un régimen adecuado. Donde el resultado sea incrementar o mejorar la función elástica, puede requerirse un tiempo de persistencia mucho más largo que permita a las células participantes construir la red de fibra elástica requerida específica para la función. Aquí puede ser más adecuada una forma de liberación sostenida que en el punto (i) anterior.
- 20 Más adelante se describen con más detalle algunos ejemplos de consideraciones relevantes para una selección de los regímenes de tratamiento adecuados:
- 25 (i) mejorar el aspecto físico de la piel.
- (ii) aumentar el contenido de elastina de tejido fibrótico y cicatricial.
- 30 (iii) mejorar la elasticidad del tejido cartilaginoso o de la vasculatura.
- Casi todos los tejidos elásticos de mamífero tienen un perfil de elastina que procede de las fibras elásticas contenidas en los mismos. Como cada tejido elástico distinto tiene una función distinta, esto da lugar a que el perfil elástico no sea el mismo en un tejido que en otro. Por ejemplo, la resiliencia de la vasculatura del lado izquierdo al flujo sanguíneo no es la misma que la resiliencia del tejido bronquial al aire inhalado. La tabla que sigue describe ejemplos de tejido a los que se dirige la invención y cómo puede medirse y expresarse el perfil elástico de cada uno:
- 35

Tejido	Característica elástica relevante que forma el perfil elástico	Cómo se mide la elasticidad
Piel	<p>Módulo de Young</p> <p>La elasticidad de la piel medida mediante Cutometer o mediante mediciones de par se describen de forma típica como:</p> <p>Ue (estiramiento elástico en °)</p> <p>Uv (estiramiento viscoelástico en °)</p> <p>Ur (recuperación elástica en °)</p> <p>Las mediciones normalmente incluyen Ur/Ue o Ur/(Ue+Uv)</p> <p>Ur/Ue varía según el lugar de la piel y el espesor y depende del dispositivo de medición. Para la piel normal se obtiene de forma típica un resultado de 0,5-0,8. A medida que se envejece, el valor disminuye y el intervalo puede ser, p. ej., 0,35-0,6. Una piel dañada por el sol u otro daño en la piel puede afectar de forma similar a la elasticidad. Un tratamiento con éxito pueden mejorar esa relación Ur/Ue después del tratamiento aumentando tanto Ur como Ue. Debe tenerse cuidado al</p>	<p>Cutometer</p> <p>Balístmografía</p> <p>Mediciones de par</p>

	interpretar las relaciones U_r/U_e dado que la piel puede parecer más elástica (relación U_r/U_e más alta) cuando de hecho es simplemente más rígida (U_e se ha reducido significativamente sin cambio o incluso una disminución de U_r). Por ejemplo, en tejido cicatricial, la piel será menos elástica y el estiramiento total de la piel ($U_e + U_v$) estará dominado por U_v . En este escenario, U_r/U_e parece bastante alta debido a que la piel tiene una capacidad de estiramiento mínimo. Un tratamiento exitoso en este escenario puede simplemente aumentar el componente U_e del estiramiento total (U_e+U_v).	
Tejido bronquial	Contenido de elastina alveolar	Espirómetro
Vaso sanguíneo	Contenido de elastina íntima y media	Capacitancia vascular y respuesta a sístole/diástole
Vejiga	Elastina radial en la pared de la vejiga	Volumen y retención
Ligamento elástico	Organización de fibras elásticas	Flexibilidad, extensibilidad y retorno del tejido alrededor del lugar del ligamento
Esfínter	Distribución espacial de la elastina para soportar la función muscular	Retención y extensión
Núcleo pulposo	Movimiento, compresión y retroceso para restablecer y mantener la forma del disco	Dispositivo de medición espinal

De forma típica, el sujeto tratado según la invención es un ser humano.

5 Preferiblemente, el tejido es tejido cutáneo, especialmente tejido en tejido cutáneo en una persona de al menos 20 años, preferiblemente de 20 a 50 años de edad, más preferiblemente de 30 a 60 años de edad.

El tejido cutáneo puede estar caracterizado por una rotura o fragmentación de las fibras elásticas en la unión de la dermis y de la epidermis.

10 El tejido cutáneo puede ser tejido fotoenvejecido.

El tejido cutáneo puede presentar una o más de las siguientes características: piel flácida, tejido subcutáneo relajado, pérdida de densidad de la matriz extracelular, arrugas y estrías.

15 El tejido cutáneo está ubicado preferiblemente en la cara, cuello o extremidades superiores o inferiores.

20 Preferiblemente el tejido no contiene una herida en el momento del inicio del régimen de tratamiento. Es posible que al completar la administración de tropoelastina según un régimen de tratamiento seleccionado, que se produzcan heridas poco importantes en el tejido, como por ejemplo cuando la administración sea por inyección u otra manipulación física de la piel.

25 Cuando el sujeto es humano, la tropoelastina tiene la secuencia de una isoforma de tropoelastina expresada en un ser humano. En esta realización, la isoforma puede seleccionarse del grupo que consiste en SHEL (véase WO1994/14958) y SHEL δ 26A (véase WO1999/03886) y derivados resistentes a las proteasas de estas isoformas (véase WO2000/0403).

De forma típica la isoforma de tropoelastina es SHEL δ 26A cuando el tejido es tejido cutáneo humano.

30 La isoforma de tropoelastina puede proporcionarse en forma de una composición adaptada para una liberación sostenida de la tropoelastina en el tejido. Cuando el tejido es tejido cutáneo humano, se prefiere que la composición incluya SHEL δ 26A y un componente para la liberación sostenida de la tropoelastina procedente de la composición seleccionada del grupo que consiste en hialuronano, glicosaminoglicanos, colágeno de tipo I.

De forma típica, la composición para la administración que incluye tropoelastina no contiene factores exógenos para la formación de fibra elástica, especialmente lisil oxidasa.

En determinadas realizaciones, la tropoelastina se proporciona según un régimen de tratamiento en una forma prácticamente monomérica.

5 En determinadas realizaciones, la tropoelastina se proporciona según un régimen de tratamiento en una forma que carece prácticamente de reticulaciones intramoleculares.

10 En determinadas realizaciones, la tropoelastina se proporciona según un régimen de tratamiento en una composición que consiste en tropoelastina y un disolvente para la tropoelastina, tal como una solución acuosa. Preferiblemente la tropoelastina es SHELδ26A.

En determinadas realizaciones, la tropoelastina se proporciona según un régimen de tratamiento en una composición que consiste prácticamente en tropoelastina. En una realización, la tropoelastina es SHELδ26A.

15 En determinadas realizaciones, el tratamiento incluye tropoelastina y un ácido hialurónico.

20 En determinadas realizaciones, la tropoelastina en la composición puede estar reticulada a ácido hialurónico (AH) derivatizado. La reticulación de la tropoelastina a una molécula tal como el ácido hialurónico puede ayudar a mantener a la tropoelastina en la zona del implante según la invención actual. La composición puede tener de 5 a 100 mg/ml de tropoelastina + 0,1 % a 2 % de reticulante de AH, preferiblemente de 10 a 50 mg/ml de tropoelastina y 0,25 % a 1 % de reticulante de AH. Formulaciones adecuadas para la invención pueden incluir de 10 a 30 mg/ml de tropoelastina reticulada de 0,25 % a 1 % de reticulante de AH.

25 Algo a tener en cuenta es que la reticulación de la tropoelastina a polisacáridos tales como ácido hialurónico puede no dar lugar a, o implicar, reticulaciones intramoleculares de tropoelastina, tales como las que se producen con lisil oxidasa. Más detalladamente, si el ácido hialurónico es disuelto por la hialuronidasa (una enzima de la piel), la tropoelastina puede liberarse en forma monomérica.

30 En determinadas realizaciones, el tratamiento puede implicar compuestos que incrementan la utilización de tropoelastina. Los ejemplos incluyen:

- diclofenaco - un antiinflamatorio (y asociado con la reducción de aparición de queratosis actínicas p. ej. ver Solaraze)
- 35 • Lys'lastine - para favorecer la elastogénesis
- aminoácidos Gly, Val Ala, Pro, correspondientes al 75 % de los residuos de la tropoelastina
- Vitaminas C, E; la vitamina C ayuda a la formación de colágeno nuevo y ambos son antioxidantes
- 40 • filtro solar - limita la proteólisis inducida por el sol
- potenciadores químicos - asisten en la transferencia de componentes a través del estrato córneo
- 45 • pH ajustado en un emoliente humectante - para proporcionar pH a la piel; el humectante es relevante para la piel de más edad

50 Cuando el tejido es piel, el régimen de tratamiento incluye de forma típica la administración de tropoelastina en puntos temporales definidos. En cualquier un punto temporal, puede haber una administración concomitante de tropoelastina.

Preferiblemente, la tropoelastina se administra por inyección.

Cuando el tejido es la piel, se prefiere que la tropoelastina se administre a la dermis.

55 En determinadas realizaciones, el régimen de tratamiento puede incluir de forma adicional la aplicación tópica de sustancias capaces de aumentar la formación de fibra elástica. Dichas sustancias serían bien conocidas por el experto en la técnica y pueden incluir, aunque no de forma limitativa, un extracto de eneldo para estimular la expresión de la lisil oxidasa (2006 CAD Cenizo y col. 2006 Exp. Dermatol. 15:574-81); y, cremas basadas en cobre y/o zinc para reducir la rotura de fibras elásticas (Mahoney y col. 2009 Exp. Dermatol. 18:205-211).

60 En una realización se proporciona un método para proporcionar elasticidad a la piel de una persona, incluyendo el método las siguientes etapas:

- proporcionar una persona;

65

- definir un área de tratamiento sobre la piel de la persona, en donde el área de tratamiento es un área de la piel en la que va a proporcionarse elasticidad;
 - inyectar una composición de tropoelastina dentro del área de tratamiento para establecer una cantidad de tropoelastina dentro del área de tratamiento que es mayor con respecto a la piel fuera del área de tratamiento;
 - mantener la cantidad de tropoelastina en el área de tratamiento durante un periodo de tiempo previamente determinado, proporcionando con ello elasticidad a la piel de una persona.
- Como se describe en los ejemplos que siguen, el método permite aumentar el grosor de la piel al tiempo que se mantiene o se mejora la elasticidad de la piel. El método permite también mejoras en la elasticidad de la piel, o la restauración o recreación del perfil elástico, al tiempo que conserva la suavidad (es decir, evitando la formación de nódulos) y un aspecto natural de la piel.
- De forma típica la persona es una persona adulta que ha perdido condición de la piel, como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, el área de tratamiento de la piel puede estar caracterizada por fotoenvejecimiento, piel flácida, tejido subcutáneo relajado, pérdida de densidad de la matriz extracelular, arrugas y estrías. El adulto puede ser de 20 a 70 años de edad, por ejemplo de 20 a 35 años de edad o de 40 a 70 años de edad.
- Según se describe en la presente memoria, la piel que se trata preferiblemente según la invención pueden estar situada en la cara, cuello, o extremidades superiores o inferiores. El área de tratamiento puede comprender todo o parte de la piel del lugar correspondiente. Por ejemplo, cuando la piel está situada en una extremidad superior, el área de tratamiento puede comprender toda la extremidad superior, o parte de esta, por ejemplo la superficie medial de la extremidad superior. Cuando la piel está situada en la cara, el área de tratamiento puede comprender todo o parte de la piel de una mejilla, párpado, barbilla, etc.
- Según la invención, un área de tratamiento es un área de piel en la que el perfil elástico es subóptimo y/o requiere mejora o restauración. Esta área puede definirse de cualquier número de modos conocidos por el experto. El modo más sencillo de los anteriores es demarcar el área de la piel que requiere tratamiento respecto a la piel en la que no se requiera tratamiento, indicando los límites de área a tratar. Esto puede hacerse utilizando por ejemplo un rotulador, indicador, guía o carácter que distinga el área a tratar del área en la que no se requiera tratamiento, por ejemplo un marcador que identifique de forma selectiva un área a tratar, o que de forma selectiva identifique un área en la que no se requiere tratamiento. En una realización, la zona a tratar puede definirse identificando una o más coordenadas que establezcan de modo relevante el límite del área de tratamiento.
- Una vez definida el área de tratamiento, la composición de tropoelastina puede inyectarse por vía intradérmica en la piel situada dentro del área de tratamiento. El propósito de la inyección es establecer o proporcionar una cantidad de tropoelastina al área de tratamiento que no está normalmente presente en el área de tratamiento. En este contexto, la cantidad de tropoelastina establecida en el área de tratamiento es superior a la cantidad de tropoelastina en un área adyacente o vecina de piel situada fuera del área de tratamiento.
- La composición puede inyectarse en la dermis media o profunda dependiendo de dónde esté situada el área de tratamiento. Por ejemplo, pueden ser más adecuadas unas inyecciones más profundas para tratar áreas donde la piel sea más gruesa, tal como en las mejillas, que en las áreas de tratamiento donde la piel sea más fina tal como en el cuello, en el escote o alrededor de los ojos.
- Se entenderá que en algunos casos el resultado objetivo puede conseguirse mediante implantación en la hipodermis y reclutando células elastogénicas en el lugar de implantación o de inyección.
- El volumen de composición que se proporciona depende en parte de la localización de la piel que se va a tratar. Volúmenes mayores son más adecuados o posibles cuando la piel está situada en una extremidad o en el cuello, más que en la cara. Los volúmenes de cada inyección individual pueden variar de 10 a 100 µl, preferiblemente de aproximadamente 20 a 50 µl. El volumen total del tratamiento administrado dependerá del número de inyecciones administradas, lo que a su vez depende del tamaño del área de piel a tratar y de la distancia determinada como adecuada entre cada sitio de inyección.
- En una forma especialmente preferida de la invención, una cantidad deseada de tropoelastina se mantiene en el área de tratamiento durante un periodo de tiempo predeterminado, mediante la inyección repetida de tropoelastina en el área de tratamiento. Esto crea claramente un suministro continuo de tropoelastina al tejido en el área de tratamiento de modo que el área de tratamiento retiene un nivel umbral de tropoelastina para la formación *in situ* de fibra elástica que no se halla fuera del área de tratamiento. Se cree que, en el transcurso de un tratamiento (se explica a continuación), esto aumenta la probabilidad de participación de las células y los factores con la tropoelastina inyectada, permitiendo así la formación de fibra elástica.
- En determinadas realizaciones, el tratamiento se administra mediante inyección de la composición de tropoelastina en la dermis media a profunda con una aguja de inyección fina. La inyección puede hacerse utilizando una aguja

hipodérmica con un calibre de 25G, preferiblemente, 27G o inferior, más preferiblemente 30G o 31G. La inyección puede hacerse utilizando una sola jeringa y aguja mediante aplicación manual del tratamiento a la piel.

5 En determinadas realizaciones, un tratamiento único puede incluir múltiples inyecciones en un área de tratamiento. Cuando cada tratamiento requiera inyecciones múltiples, estas pueden espaciarse entre sí de 1 mm a 3 cm.

10 En determinadas realizaciones, la inyección puede hacerse utilizando un dispositivo que permite una inyección automatizada en la dermis de la piel, tal como una pistola Mesotherapy, o un dispositivo de inyección asistida tal como el dispositivo de inyección Artiste (<http://www.nordsonmicromedics.com/se/google/en/artiste-assisted-injection-system.html>) o el dispositivo de inyección Anteis (<http://www.anteis.com/AestheticDermatology/injectionsystem.php>). En determinadas realizaciones, la jeringa o dispositivo de inyección automatizado pueden utilizarse con un adaptador que permita fijar múltiples agujas, de modo que se pueda aplicar más de una inyección a la vez. En determinadas realizaciones, el tratamiento puede aplicarse utilizando un sistema de aguja sólida tal como un rodillo dérmico, o un sistema de agujas Dermapen (p. ej. como describen Kalluri, H. y col 2011, AAPS Journal 13:473-4841).

15 Puede haber un período de aproximadamente 3 a 168 días entre cada tratamiento. Los periodos típicos entre cada tratamiento pueden incluir de 3 a 7 días, 3 a 21 días, 14 a 28 días, 21 a 84 días y 3 a 84 días. Puede haber 1 a 24 o 3 a 6 tratamientos en total. De forma general, el período de tratamiento no es superior a aproximadamente 1 año, preferiblemente, de 3 semanas a 6 meses, preferiblemente, de aproximadamente 1 a 3 meses.

20 Los lugares de tratamiento preferidos incluyen los cercanos, próximos, dentro de, o adyacentes a, las mejillas, ojos, cuello, escote, manos, tejido cicatricial o estrías.

25 Como se utiliza en la presente memoria, salvo que el contexto requiera otra cosa, el término “comprende” y variaciones del término tales como “que comprende”, “comprende” y “comprendido”, no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas adicionales.

30 Otros aspectos y realizaciones adicionales de los aspectos descritos en los párrafos anteriores resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción, dada a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos que la acompañan.

Ejemplos

Ejemplo 1 Sistema de análisis *in vitro* para la síntesis de fibra elástica

35 Materiales y métodos

a) Células

Código de célula	Tipo de célula	Edad de donantes	Fuente
NHF8909	Fibroblastos dérmicos humanos primarios	Neonatal	University of Queensland, Australia
GM3348	Fibroblastos dérmicos humanos	10 años de edad	Coriell Research Institute, NJ, EE. UU.
230209A	Fibroblastos dérmicos humanos primarios (paciente con quemaduras)	31 años de edad	Anzac Research Institute, Australia
142BR	Fibroblastos dérmicos humanos	51 años de edad	European Collection of Cell Cultures
AG04064	Fibroblastos dérmicos humanos	92 años de edad	Coriell Research Institute, NJ, EE. UU.
Pig 10-10	Fibroblastos dérmicos porcinos primarios	10 semanas	University of Queensland, Australia
RAB-9	Fibroblastos dérmicos de Conejo	Adultos	European Collection of Cell Cultures
3785	Células humanas del músculo liso de las vías respiratorias principales (paciente con trasplantes de pulmón)	28 años de edad	Woolcock Institute of Medical Research, Australia
3791	Células humanas del músculo liso de las vías respiratorias principales (paciente con resección pulmonar)	59 años de edad	Woolcock Institute of Medical Research, Australia

b) Cultivo celular

Las células se cultivaron en Medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido en glucosa (DMEM; Invitrogen), que contenía suero fetal bovino al 10 % (FBS; Invitrogen) y 1 % (v/v) de penicilina/estreptomina (Invitrogen). Los medios se cambiaron cada 2-3 días. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂. Para evaluar la capacidad de las células para formar fibras de elastina, se sembraron 1 x 10⁵ células en cubreobjetos de vidrio en placas de cultivo de 12 pocillos. Diez a 17 días después de la siembra de la tropoelastina de longitud completa (Elastagen), o de una proteína alternativa derivada de la elastina, se esterilizó por filtración en PBS y se añadió a los cultivos celulares. Las proteínas alternativas derivadas de la elastina incluyeron péptidos de elastina de la piel humana (Elastin Products Company; HSP72), un constructo de delección de tropoelastina C-terminal Δ RKRK (Weiss lab) y un constructo de sustitución de tropoelastina C-terminal que contiene RGDS (Weiss lab). La formación de fibra también se evaluó en presencia de blebistatina 50 μ M (Sigma). Para los experimentos que evalúan el efecto de las adiciones repetidas de tropoelastina se añadió la proteína 10, 17 y 24 días después de la siembra. El espesor de la matriz celular se determinó promediando el número de secciones z de 0,41 μ m requerido para obtener imágenes de los núcleos de la parte más alta hasta el fondo de la muestra en diez campos de visión escogidos al azar.

En puntos temporales fijos tras la adición de tropoelastina, las células se fijaron con formaldehído al 3 % (p/v) o paraformaldehído al 4 % (p/v) durante 20 min y se inactivaron con glicina 0,2 M. Las células se incubaron con Triton X-100 0,2 % (v/v) durante 6 min, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5 % a 4 °C toda la noche, y se tiñeron con anticuerpos primarios de ratón antielastina BA4 (Sigma) 1:500 durante 1,5 h y con anticuerpo secundario antirratón IgG-FITC (Sigma) 1:100 durante 1 h. Seguidamente se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio con reactivo de antidesvanecimiento ProLong Gold con DAPI (Invitrogen).

c) Imágenes por fluorescencia

Las muestras se visualizaron con un microscopio confocal Olympus Fluoview FV1000. Las imágenes mostradas en la presente se construyeron mediante una proyección en z de la pila.

30 Resultados y discusión

a) Formación de fibras de elastina por fibroblastos dérmicos humanos obtenidos de diversos grupos de edad

Evaluamos la capacidad de los fibroblastos dérmicos humanos de formar fibras y redes de elastina tras la adición de tropoelastina (SHEL δ 26A (es decir, elastina humana sintética que no contiene el dominio 26A)). La Figura 1 muestra la formación de elastina 7 días después de la adición de 250 μ g/ml de tropoelastina a fibroblastos dérmicos obtenidos de donantes neonatos, y de 10, 31, 51 y 92 años de edad. Todas las líneas celulares demostraron formación de fibras de elastina. No se observó la formación de elastina en cultivos celulares de control en donde no se añadió tropoelastina (datos no mostrados). Las células donantes más jóvenes proliferaron más ampliamente, como muestra el mayor número de núcleos (azul). Las células donantes más jóvenes crearon redes de elastina extensas cuando se añadió tropoelastina. Las células donantes de mayor edad seguían capaces de crear fibras de elastina sustanciales a partir de tropoelastina añadida; sin embargo, la red era menos densa (Figura 1).

b) Formación de fibras de elastina por células animales

Se evaluó la capacidad de fibroblastos dérmicos de cerdo (Fig 10-10) y de conejo (RAB-9) para formar fibras y redes de elastina tras la adición de tropoelastina 250 μ g/ml. Como se muestra en la Figura 2, cada una de estas células animales depositó tropoelastina en la matriz. Sin embargo, solo las células de conejo fueron capaces de producir una red de elastina. Las diferencias en la secuencia de aminoácidos de la tropoelastina entre la especie humana y las especies animales pueden explicar la menor eficiencia y el uso variado de la tropoelastina por las células animales (Figura 2).

c) Formación de fibras de elastina por las células de músculo liso de las vías respiratorias

Hemos evaluado la capacidad de las células del músculo liso de las vías respiratorias principales de seres humanos obtenidas de pulmones enfermos de formar fibras de elastina tras la adición de tropoelastina. La Figura 3 muestra la formación de elastina 7 días después de la adición de 250 μ g/ml de tropoelastina. Estas células diferían en el grado de formación de fibra: de una cantidad mínima de deposición de esférulas de tropoelastina a una red de fibras de elastina (Figura 3). Los resultados demuestran que las células del músculo liso, al igual que los fibroblastos observados en la Figura 1, tienen capacidad de formación de fibra elástica a partir de tropoelastina exógena, como la tendrían las células del músculo liso de otros tejidos, tales como las de la vasculatura.

d) Formación de fibras de elastina cuando se utilizan derivados de tropoelastina

Evaluamos la capacidad de los fibroblastos neonatales humanos primarios (NHF8909) para formar redes de elastina utilizando tres proteínas alternativas derivadas de elastina. Estas proteínas fueron péptidos dérmicos de elastina preparados mediante hidrólisis enzimática de elastina dérmica humana con elastasa de esputo humana y dos

isoformas de tropoelastina. La tropoelastina contiene un motivo GRKRRK en su extremo C terminal, que hemos demostrado dirige la unión celular a la integrina $\alpha_v\beta_3$. En la forma iso de tropoelastina Δ RKRRK, se ha eliminado la secuencia RKRRK de este motivo. En la isoforma +RGDS, se ha eliminado la secuencia RKRRK y se ha sustituido por el dominio de unión a células canónico RGDS. En todos los casos se añadieron 125 μ g/ml de proteína a fibroblastos dérmicos neonatales humanos primarios 12 días después de la siembra.

La Figura 4 muestra las redes de elastina resultantes. Se observó la formación de fibras de elastina cuando se añadió tropoelastina de longitud completa a los cultivos. Por el contrario, la formación de fibra se alteró significativamente cuando se añadieron derivados de tropoelastina a los cultivos. No hubo deposición de péptidos de elastina de la piel en la matriz. Se observó la deposición de esférulas más que de fibras de cada una de las formas Δ RKRRK y +RGDS.

e) Formación de fibras de elastina cuando se alteran las fuerzas de contracción celulares

Se investigó el requisito de fuerzas de contracción celular en la formación de fibras de elastina mediante la adición de blebistatina al cultivo celular al mismo tiempo que la tropoelastina. La blebistatina es un inhibidor de la miosina no muscular II que altera las fuerzas de contracción celular y la migración celular. La Figura 5 muestra que la formación de fibras de elastina se ve afectada sustancialmente en presencia de blebistatina.

f) Formación de fibras de elastina después de adiciones repetidas de tropoelastina

Evaluamos la capacidad de los fibroblastos dérmicos neonatales humanos (NHF8909) para formar redes de elastina a partir de adiciones repetidas de tropoelastina. Se añadió tropoelastina (250 μ g/ml) a los cultivos 10 días, 10 y 17 días, y 10, 17 y 24 días después de la siembra. Todas las muestras se fijaron 31 días después de la siembra. La Figura 6 muestra que la formación de la red de elastina aumentó sustancialmente con tratamientos repetidos de tropoelastina. Esto dio lugar a un aumento del espesor de la matriz celular, donde una muestra sin tropoelastina añadida 31 días después de la siembra tuvo un espesor de $13,4 \pm 2,2$ μ m, las muestras con una y dos adiciones de tropoelastina tuvieron un espesor de $15,3 \pm 1,2$ μ m y $16,9 \pm 0,8$ μ m respectivamente, y una muestra con tres adiciones de tropoelastina tuvo un espesor de $19,0 \pm 2,2$ μ m.

g) Elasticidad de fibra formada *in vitro*

Los fibroblastos dérmicos humanos se sembraron en placas con fondo de vidrio WillCo a una densidad de 20.000 células/cm² en DMEM (Invitrogen, 11995) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (vol/vol) y penicilina/estreptomicina al 1 % (vol/vol). A los 12 días después de la siembra, se añadió tropoelastina, 250 μ g/ml en PBS, a los cultivos de fibroblastos. Los medios de cultivo se cambiaron cada 2 días. A los 19 días después de la siembra, las muestras se analizaron con un microscopio de fuerza atómica BioScope Catalyst. La autofluorescencia intrínseca de las fibras de elastina maduras se utilizó para indicar su posición dentro del cultivo. Las muestras de control igualadas en el tiempo sin adición de tropoelastina no mostraron autofluorescencia (Figura 7). El mapeo por módulos de topografía/elástico demostró un cambio de elasticidad del cultivo (Figura 8, áreas amarillas) tras la adición de tropoelastina, tal como demuestra la presencia de una región dominante de material intercelular con un módulo de Young de \sim 600 kPa, consistente con la formación de fibras elásticas. La elastina natural no purificada tiene un módulo de Young de \sim 600 kPa.

h) Curso temporal para la formación de fibra elástica

Los fibroblastos dérmicos humanos se sembraron en cubreobjetos de vidrio a una densidad de 20.000 células/cm² en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 % (vol/vol) y penicilina/estreptomicina al 1 % (vol/vol). A los 10-12 días después de la siembra, se añadió tropoelastina, 250 μ g/ml en PBS, a los cultivos de fibroblastos. Los medios de cultivo se cambiaron cada 2 días. En los días establecidos, de forma general los días 1, 3 y 7, tras la adición de tropoelastina, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % (peso/volumen) durante 20 min y se desactivaron con glicina 0,2 M. Las células se incubaron con Triton X-100 0,2 % (v/v) durante 6 min, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5 % a 4 °C toda la noche, y se tiñeron con anticuerpo de ratón antielastina BA4 1:500 durante 1,5 h y con anticuerpo antirratón IgG-FITC 1:100 durante 1 h. Seguidamente se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio con reactivo de antidesvanecimiento ProLong Gold con DAPI. Las muestras se visualizaron utilizando un microscopio confocal Olympus FluoView FV1000. Se tomaron Z pilas y se convirtieron a imágenes de proyección comprimidas.

Este sistema modelo de cultivo celular *in vitro* muestra que tras la adición tropoelastina, la proteína se deposita en el ECM en forma de esférulas (Fig 9a). La formación posterior de fibra se alinea inicialmente en la dirección de las células (Fig. 9b) antes de generar una extensa red elástica ramificada (Fig. 9c).

i) Implicación de la lisil oxidasa

Se estudió el efecto del inhibidor BAPN de la lisil oxidasa sobre la formación de fibra elástica en este sistema.

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos durante 12 días antes de la adición de tropoelastina, como se describe. Las células se cultivaron durante 72 horas adicionales después de la adición de tropoelastina. Se añadió BAPN en diferentes puntos temporales con respecto a la adición de tropoelastina. Las muestras se tiñeron para visualizar la

elastina y los núcleos como se ha descrito más arriba. La inclusión de BAPN permite una cierta deposición de esférulas en el ECM, pero impide la formación de fibra (Fig. 10), demostrando que las células utilizan lisil oxidasa durante la formación de la fibra elástica a partir de tropoelastina.

5 j) Alineación de esférulas

Se utilizó microscopía de muy alta resolución para seguir investigando la formación de fibra elástica en un sistema modelo *in vitro*. Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos y se fijaron 3 días después de la adición de tropoelastina como se describe. Las células se tiñeron con anticuerpo anti-elastina de ratón BA4 1\500 durante 1,5 h y anticuerpo antirratón IgG-AlexaFluor 488 1\100 durante 1 h. Las muestras se visualizaron con un microscopio Leica SP5 cwSTED.

Se observa alineación de esférulas 3 días después de añadir tropoelastina a un cultivo de fibroblastos dérmicos de 12 días de antigüedad (Fig 11). Las esférulas muestran decoraciones punteadas con el anticuerpo. El diámetro promedio de las esférulas es de 605 ± 97 nm.

15 k) Procesamiento de esférulas

También se utilizó microscopía electrónica de transmisión para seguir investigando la formación de fibra elástica en un sistema modelo *in vitro* prácticamente como se ha descrito. Las muestras se procesaron 3 días después de la adición de tropoelastina a un cultivo de fibroblastos dérmicos de 12 días. Las células cultivadas sobre elastina se fijaron posteriormente con glutaraldehído al 2 % en tampón PBS durante 1 hora a 4 °C y se fijaron posteriormente con tetróxido de Osmio al 0,1 % durante 10 min en la oscuridad a 4 °C y se lavaron inmediatamente dos veces con agua destilada durante 5 min cada vez. Posteriormente, las muestras se deshidrataron a través de una serie de gradiente de etanol durante 10 min cada una (es decir, 70, 80 y 90 % y dos veces 100 %). La infiltración de la muestra con Epon (resina) se logró con las siguientes mezclas y tiempos de incubación: Epon al 25 % en etanol durante 4 horas, Epon en etanol al 50 % durante la noche y dos cambios de Epon al 100 % durante 8 h cada uno a temperatura ambiente. Cuando estuvo completa la infiltración de resina, la muestra se embebió utilizando el método de polimerización doble de Kobayashi K., y col. (2012). Las caras de bloque resultantes que contienen las células embebidas se recortaron y se obtuvieron secciones ultrafinas por medio de un ultramicrotomo (Leica, Ultracut-7), produciendo secciones de aproximadamente 70 nm que se montaron en rejillas de cobre de 74 micrómetros (malla 200). Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo acuoso al 2 % y citrato de plomo de Reynolds durante 10 min cada una, y se lavaron a fondo con agua entre los pasos para minimizar los depósitos de tinción. Se obtuvieron imágenes de las secciones utilizando un MET JEOL 2100 (JEOL, Japón) a 200 kV.

35 Se observan tres estructuras distintas que contienen elastina (Fig. 12):

(1) Esférulas rodeadas por una cubierta densa con un diámetro promedio de 615 ± 153 nm. Estas esférulas están en contacto directo con las células.

40 (2) Esférulas que se han roto, vertiendo su contenido.

(3) Masas elásticas formadas por la coalescencia de esférulas rotas.

45 La asociación estrecha del material elástico con las células y las proyecciones de las células sugiere que las fuerzas mecánicas alteran las esférulas.

l) Modelo Animal

50 Se examinó el efecto de las plantillas dérmicas que contienen tropoelastina junto con injertos finos de piel dividida sobre la formación de fibra de elastina. Se utilizaron dos cerdos en el estudio. Se aplicaron los siguientes sustitutos de piel en el día 0.

1. Control: plantilla de colágeno reticulado solo

55 2. Ensayo A: plantilla de colágeno reticulado, reticulado en presencia de tropoelastina al 10 %

3. Ensayo B: plantilla de colágeno reticulado aplicada sobre la parte superior de una matriz de tropoelastina reticulada a un AH modificado

60 En el día 0 se crearon cuatro heridas por escisión (5 cm de diámetro) en la parte superior del dorso de cada cerdo. Se cubrieron dos heridas de un lado con control. Una herida del otro lado se trató con el ensayo A y la otra herida se trató con el ensayo B. En el día 7 (semana 1) se cambiaron los apósitos para todas las heridas. En el día 14 (semana 2) se obtuvieron biopsias de 4 mm a unos pocos mm del borde de las heridas. En el día 21 (semana 3) se realizaron injertos de piel fina dividida en todas las heridas con cambios de apósito. El día 28 (semana 4) se cambiaron los apósitos para todas las heridas. El día 35 (semana 5) se sacrificó a los animales y se recogió tejido de la herida y de la piel normal. Las biopsias se fijaron en formalina y se embebieron en parafina.

La formación de fibras de elastina se evaluó mediante la tinción de Verhoeff van Gieson de secciones (Figura 13) que da a las fibras de elastina un color púrpura/negro. Las fibras de elastina se ven rodeando un folículo piloso en piel de cerdo normal (rodeadas con un círculo).

5 Ocasionalmente se vieron fibras cortas, observadas esporádicamente en la dermis de las muestras de control.

Tras la biopsia de las Muestras del ensayo A, el tejido procedente del lugar de la herida mostró elastina *de novo* en forma de fibras y colecciones de fibras (p. ej., áreas resaltadas con círculos negros).

10 Tras la biopsia de las Muestras del ensayo B, el tejido procedente del lugar de la herida mostró una matriz persistente de tropoelastina reticuladas con AH modificado (p. ej., área resaltada con un círculo negro), y la formación de fibras de elastina *de novo* (p. ej., área resaltada con un círculo blanco).

15 Ejemplo 2, estudio clínico para evaluar el tratamiento de la piel humana utilizando un producto de rejuvenecimiento de la piel inyectable de elastina.

Métodos:

20 Se llevó a cabo un estudio clínico utilizando una formulación de tropoelastina ligeramente reticulada con un ácido hialurónico derivatizado (como se describe en PCT/AU2011/001503, en particular en el Ejemplo 3 y en el Ejemplo 6) comparado con Restylane Vital Light (RVL - ácido hialurónico 12 mg/ml reticulado con BDDE, Q-Med, Australia). Los participantes recibieron tratamiento en la piel del interior de la parte superior del brazo implantando el producto en la dermis mediante inyección con aguja fina. Se eligió la parte superior del brazo para el estudio dado que es un área de la piel que de forma típica no está expuesta a la luz solar, por lo que se presenta como tejido cutáneo sano no dañado. El estudio pretendía evaluar el impacto de los productos en el grosor y textura de la piel, incluida la elasticidad, y obtener información subjetiva del paciente sobre el aspecto, aspecto natural y suavidad del lugar tratado de la piel.

30 Se inscribieron en el estudio sujetos sanos y tras un período de evaluación, se incluyó a dieciséis sujetos que cumplían con los requisitos de inclusión y se asignaron aleatoriamente a recibir un tratamiento con una de entre una serie de formulaciones de tropoelastina (ELAPR002: 10 - 30 mg/ml de tropoelastina reticulada a un ácido hialurónico derivatizado) en un brazo más el control Restylane Vital Light (RVL - 12 mg/ml de ácido hialurónico reticulado con BDDE) en el otro brazo. Todos los sujetos recibieron tres de estos tratamientos en el mismo sitio de tratamiento, con una separación de 3 semanas. Cada tratamiento consistió en múltiples inyecciones de 20-30 µl de producto utilizando una aguja 30 Gx1/4 pulg, cada una de ellas a aproximadamente 1 cm de distancia en una formación de rejilla sobre el área en la parte superior del brazo.

40 Se formularon preguntas a los sujetos en cada visita en relación con la suavidad, aspecto natural y aspecto de la piel en el lugar tratado y se les pidió que proporcionaran información por medio de una Visual Analogue Scale (Escala Analógica Visual - VAS) marcando una línea en una escala de 0-100 (siendo 0 no muy suave, natural o con mal aspecto y 100 muy suave, natural y con buen aspecto). Las mediciones de elasticidad de la piel y de espesor de la piel se llevaron a cabo utilizando un Dermal Torque Meter (DTM) y calibradores de piel, respectivamente. La histopatología de las secciones de biopsia se llevó a cabo a los 3 meses y 6 meses para evaluar la persistencia de los implantes y los niveles de contenido de elastina en los lugares de tratamiento mediante la tinción de Verhoff Van Giesen (VVG).

45 Resultados:

Análisis histopatológico de los lugares de implante:

50 Los lugares de la piel evaluados mediante VVG revelaron que las áreas de piel tratadas con RVL mostraron cambios dérmicos, incluidas fibras de colágeno dérmico estiradas y separadas por el implante de material como muestran los espacios extracelulares sin teñir que predominan en la Figura 14A. Por el contrario, las áreas de la piel tratadas con ELAPR002 mostraron que el material de implante se integraba con el tejido cutáneo con evidencia de remodelación del material del implante en elastina, tal como lo demuestra el material de implante que pasa de azul a púrpura a negro con la tinción de VVG. Está claro por lo tanto que la administración de tropoelastina ha permitido *in situ* el ensamblado y deposición de fibra elástica muy similar a la observada en la elastogénesis (Figura 14B).

Mediciones del espesor y nódulos de la piel

60 El médico clínico investigador midió el espesor de la piel en el sitio de tratamiento utilizando calibradores de piel. La Tabla 1 muestra mediciones de espesor medio de la piel para los lugares tratados con las formulaciones de RVL y ELAPR inicial y a los 3 meses. Se observó que el aumento de espesor de la piel era significativo para las dos formulaciones de RVL y elastina ($p < 0,001$).

65

Tabla 1: Mediciones de espesor de la piel

Tiempo / Producto	RVL	ELAPR002i	ELAPR002ii
Espesor de la piel inicial (mm)	1,66	1,51	1,6
Grosor de la piel a los 3 meses (mm)	2,55	1,95	2,28

5 De los dieciséis pacientes del estudio, todos los dieciséis brazos tratados con RVL presentaban nódulos que eran visibles y que el investigador podía sentir a los 3 meses. Por el contrario, solo 1 de los 16 brazos tratados con formulaciones de ELAPR002 presentaba algún nódulo a los 3 meses. Como tales, las mediciones del espesor de la piel para RVL son sobre todo una medición de los nódulos de RVL en la piel, mientras que las mediciones de los lugares tratados con ELAPR002 reflejan con más precisión un aumento general del espesor de la piel en el área tratada.

10 Mediciones de elasticidad de la piel

Las mediciones del estiramiento elástico de la piel, Ue, se tomaron de los lugares de piel tratados usando el DTM en cada visita de evaluación durante todo el período del estudio clínico.

15 Las puntuaciones medias de Ue iniciales y de 6 meses se proporcionan en la Tabla 2 para RVL y ELAPR002i. Como puede verse en los datos de la tabla, los lugares de piel tratados con RVL revelaron una menor capacidad de estiramiento elástico (Ue reducido tras el tratamiento), lo que indica que el aumento del espesor de la piel producido por el tratamiento con RVL hace que la piel sea más rígida. Sin embargo, las áreas de piel tratadas con implantes de tropoelastina mantuvieron la capacidad de estiramiento elástico (Ue permanece relativamente estable), lo que indica

20 que se logra el mayor espesor de la piel al tiempo que se mantienen las propiedades elásticas de la piel.

Tabla 2: Estiramiento elástico de la piel (Ue)

Tiempo/Producto	RVL	ELAPR002i
Ue medio inicial (°)	5,07	4,93
Ue medio a los seis meses (°)	3,85	4,55

25 Evaluaciones del paciente

Las puntuaciones medias de la evaluación analógica visual del paciente de la suavidad, aspecto natural y aspecto del área tratada de la piel se proporcionan en la Tabla 3 para lugares de la piel tratados con RVL y ELAPR002ii. Los datos muestran que los pacientes dieron puntuaciones altas de suavidad, aspecto natural y aspecto para los

30 lugares de la piel tratados con formulaciones de tropoelastina, en comparación con aquellos tratados con RVL (puntuaciones más altas representan una evaluación positiva).

Confort/Formulación	RVL	ELAPR002ii
Suavidad media de la piel inicial	74,9	68,6
Suavidad media de la piel a los 6 meses	48,9	81,1
Aspecto natural medio de la piel inicial	84,8	79,8
Aspecto natural medio de la piel a los 6 meses	51,9	83,1
Aspecto medio de la piel inicial	82,9	74,9
Aspecto medio de la piel a los 6 meses	43,6	82,0

REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico para restaurar el perfil elástico del tejido cutáneo de una persona, incluyendo el método las siguientes etapas de tratamiento:
- 5
- proporcionar una persona;
 - definir un área de tratamiento sobre la piel de la persona, en donde el área de tratamiento es un área de la piel en la que va a restaurarse el perfil elástico;
 - 10 - inyectar una composición de tropoelastina en el tejido cutáneo dentro del área de tratamiento para permitir la formación de fibra elástica en el área de tratamiento;
- 15 en donde la composición de tropoelastina se inyecta en el tejido cutáneo dentro del área de tratamiento según un programa de tratamiento predeterminado para establecer una cantidad de tropoelastina dentro del área de tratamiento que es mayor con respecto a la piel fuera del área de tratamiento,
- 20 en donde dicho programa de tratamiento predeterminado se caracteriza por tener uno o más tratamientos, cada tratamiento en forma de una inyección en el área de tratamiento; en donde cada tratamiento del programa de tratamiento se espacia con 1 a 24 semanas de diferencia; en donde al menos un tratamiento del programa de tratamiento incluye múltiples inyecciones en el área de tratamiento, cada inyección realizada en un sitio de inyección que está separado de otros sitios de inyección por 1 mm a 3 cm;
- 25 en donde la composición de tropoelastina se inyecta en un volumen de 10 µl a 100 µl y la composición tiene una concentración de tropoelastina de 0,5 mg/ml a 200 mg/ml;
- 30 manteniendo con ello una cantidad de tropoelastina dentro del área de tratamiento durante un período de tiempo predeterminado en el programa de tratamiento para permitir la formación de fibra elástica y restableciendo con ello el perfil elástico de la piel de una persona.
2. El método de la reivindicación 1 en donde la composición de tropoelastina incluye tropoelastina y ácido hialurónico, en donde preferiblemente la tropoelastina está unida a ácido hialurónico, y en donde más preferiblemente la composición incluye de 0,5 a 50 mg/ml de tropoelastina y 0,1 % a 1 % de ácido hialurónico.
- 35 3. El método de la reivindicación 1 o 2 en donde la composición es una composición acuosa que incluye tropoelastina.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la composición es una composición acuosa que incluye tropoelastina y ácido hialurónico.
- 40 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el programa de tratamiento incluye inyecciones en el área de tratamiento cada 2 a 8 semanas.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el programa de tratamiento abarca un período de aproximadamente 1 a 6 meses, preferiblemente de aproximadamente 1 a 3 meses.
- 45 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la piel es de una persona de 20 a 70 años de edad.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el sitio de tratamiento está cerca de, próximo a, dentro o adyacente a las mejillas, ojos, cuello, escote, manos, cicatrices o estrías.
- 50 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la piel se caracteriza por fotoenvejecimiento, flacidez, tejido subcutáneo relajado, arrugas, cicatrices o estrías.

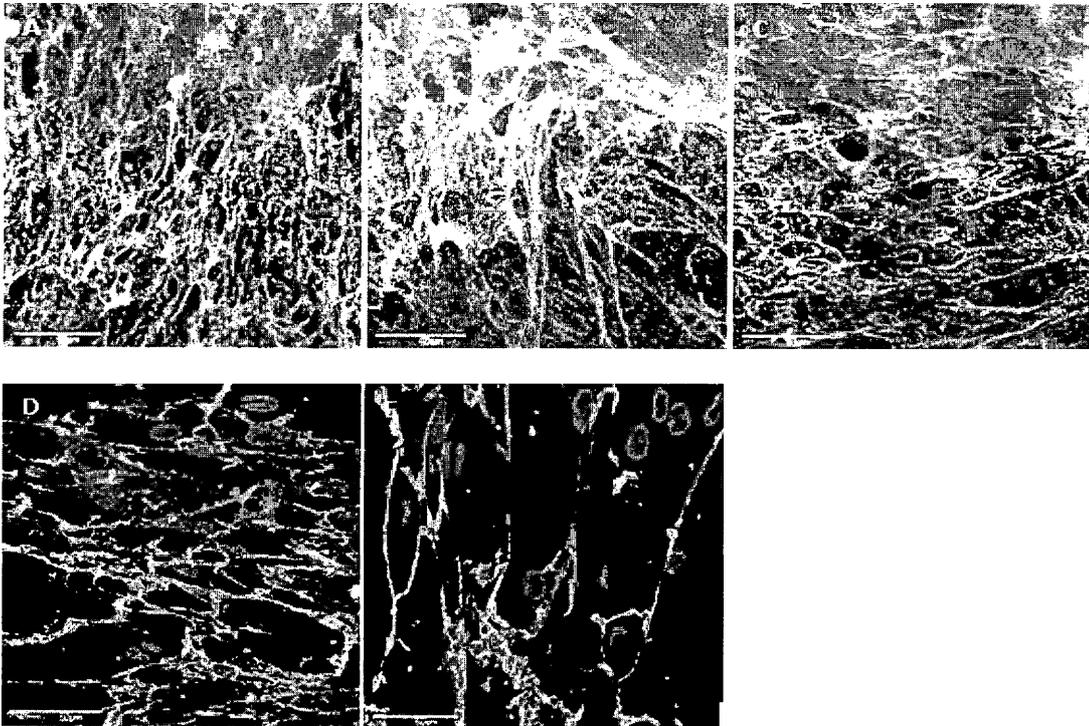


Figura 1:

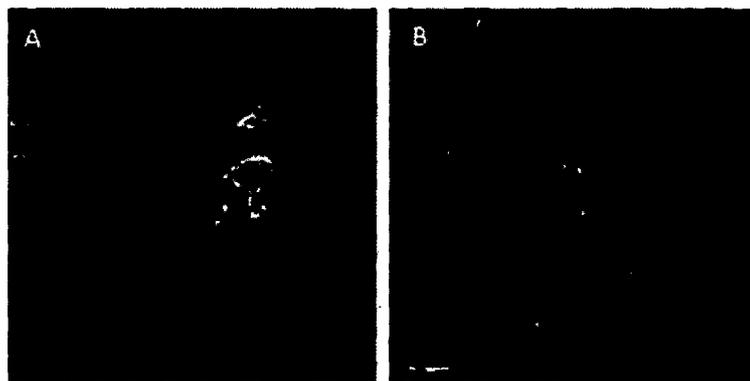


Figura 2:

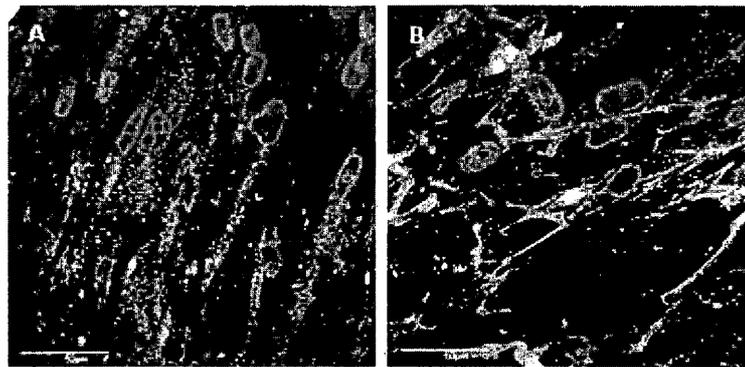


Figura 3:

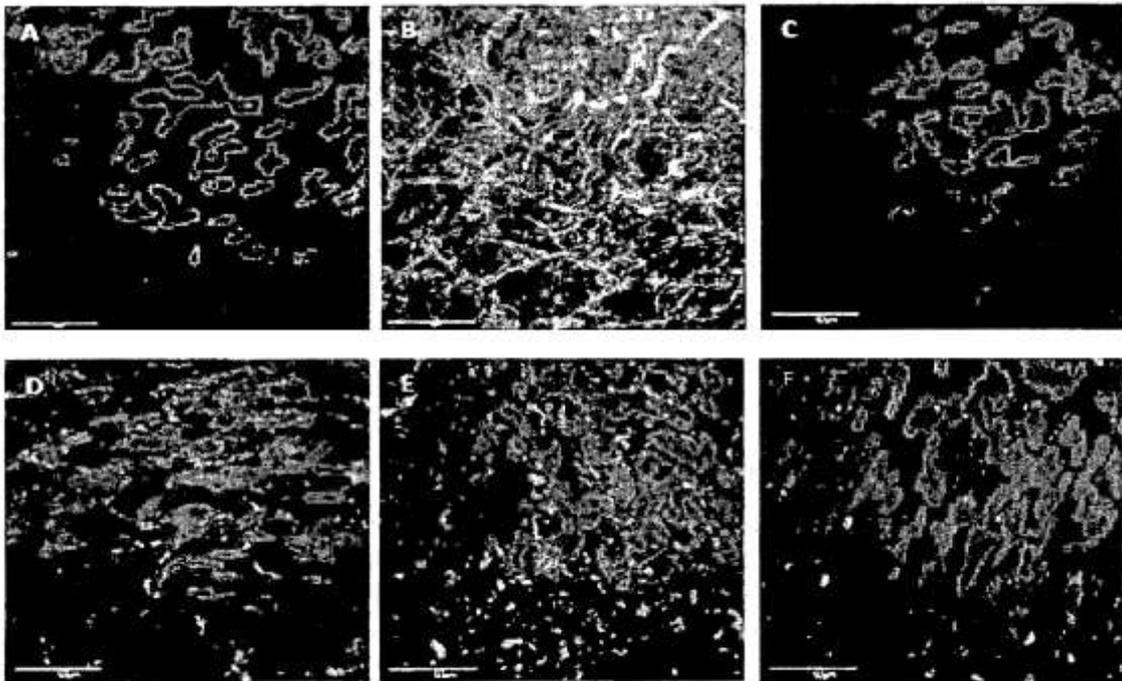


Figura 4:

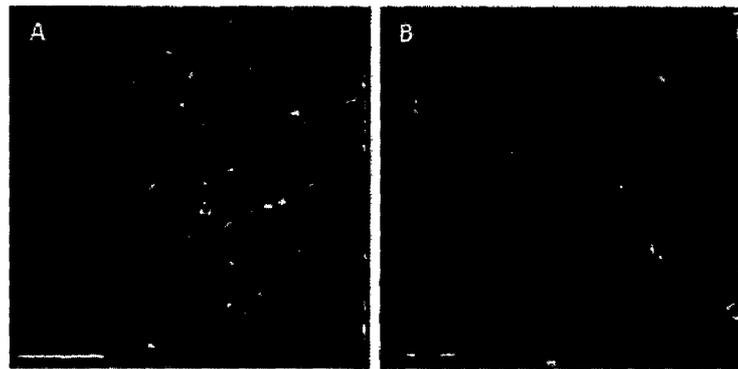


Figura 5:

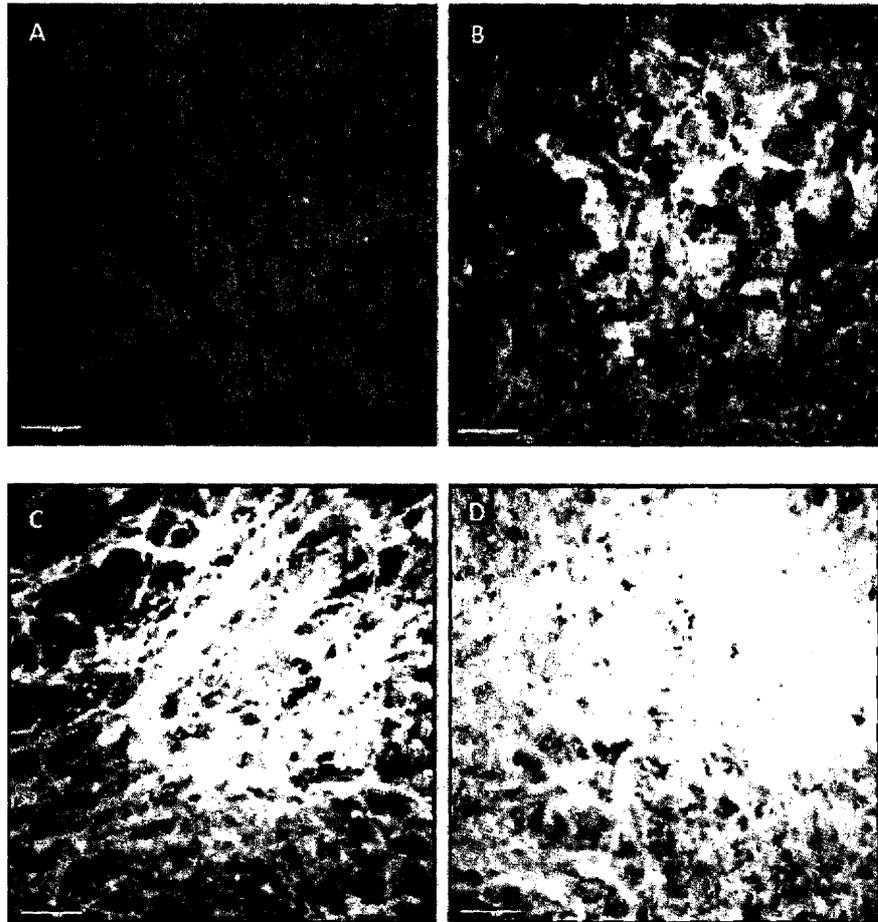


Figura 6:

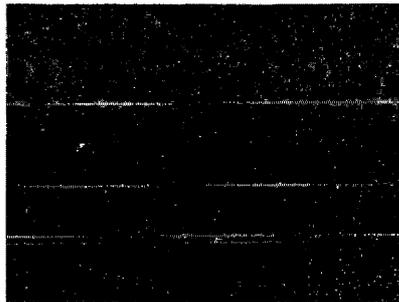
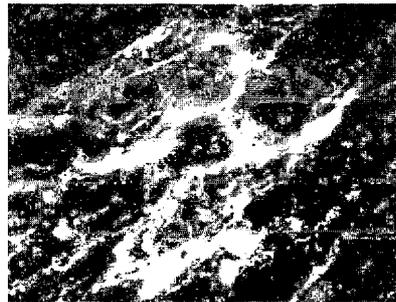


Figura 7:A)



B)

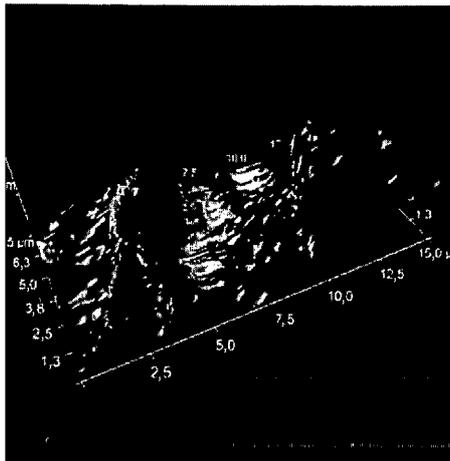
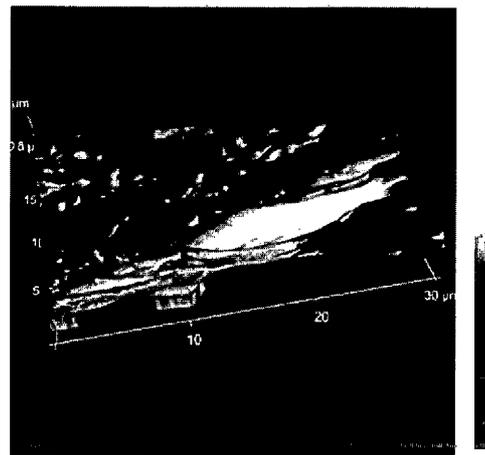


Figura 8:A)



B)

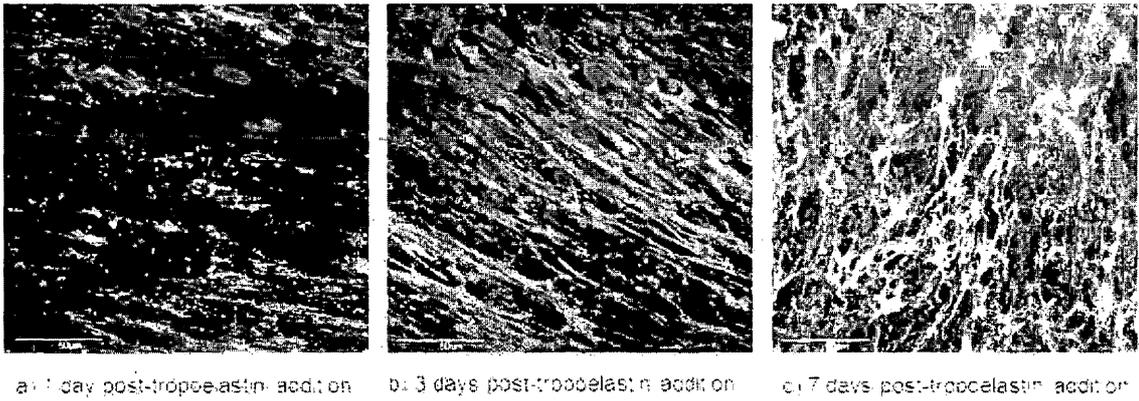


Figura 9.

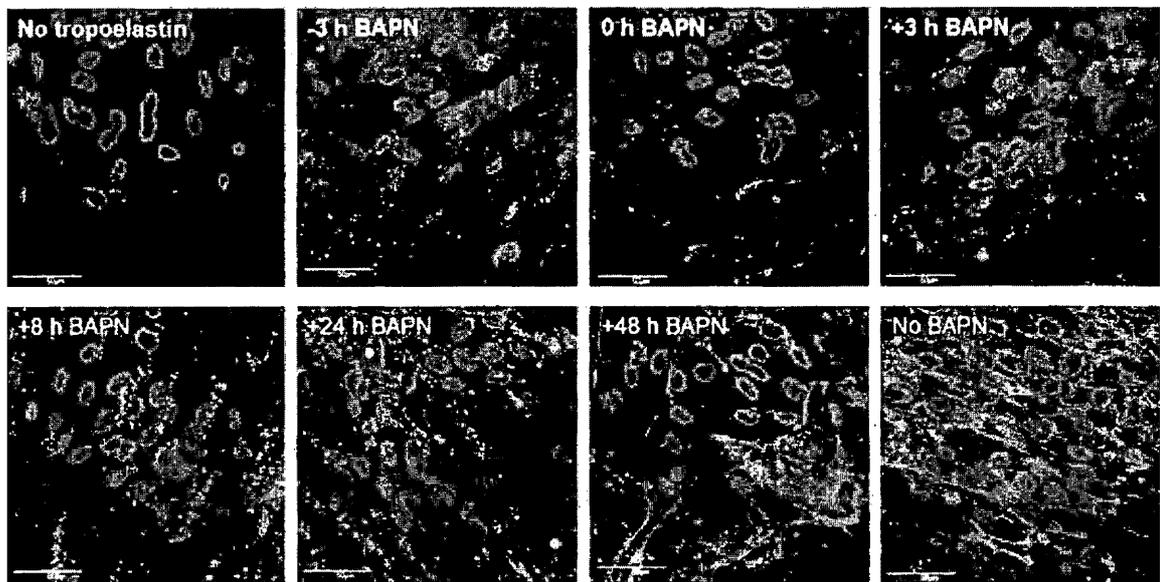
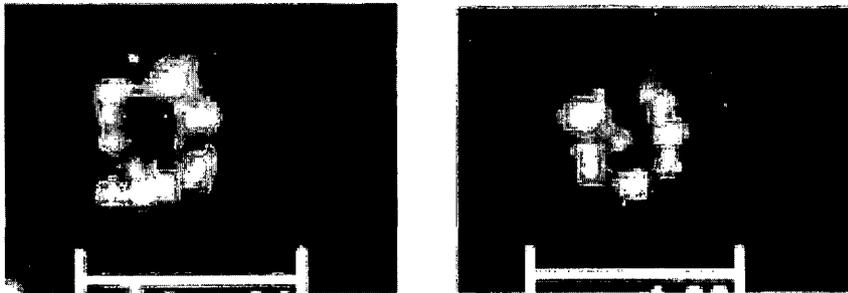


Figura 10.

Figura 11 A)



B)

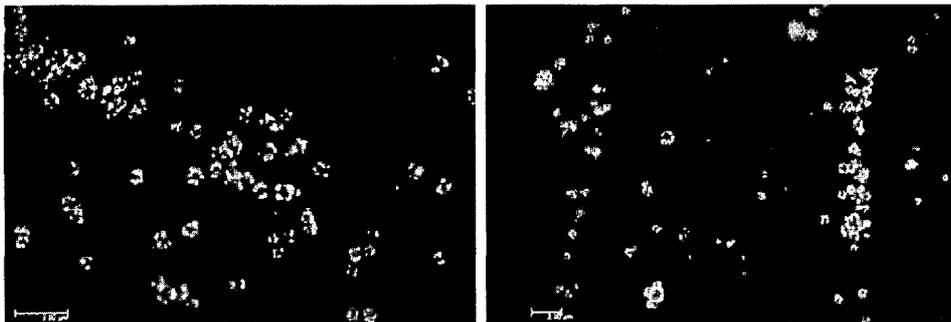


Figura 12:

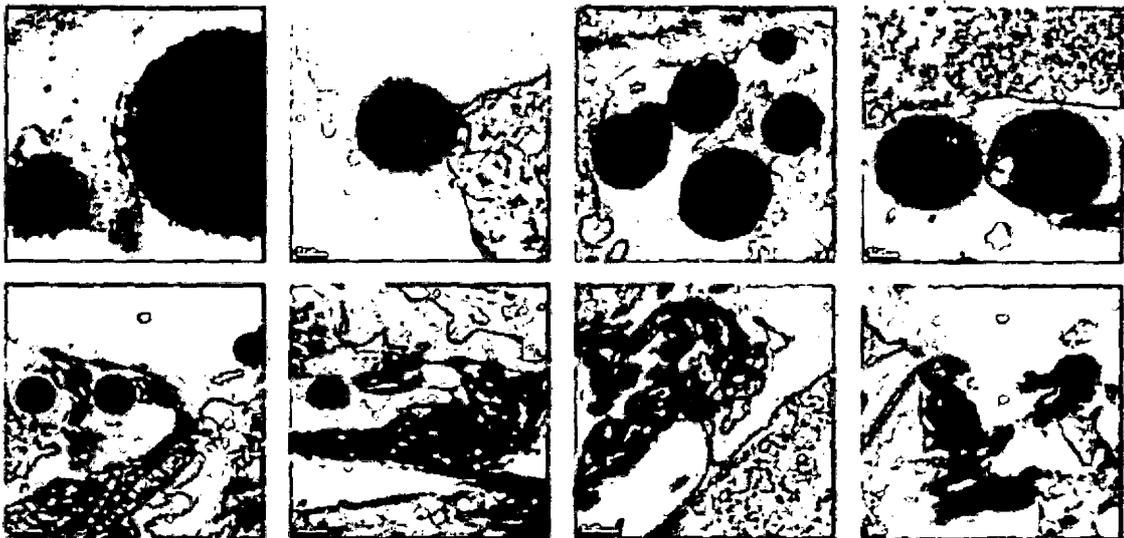
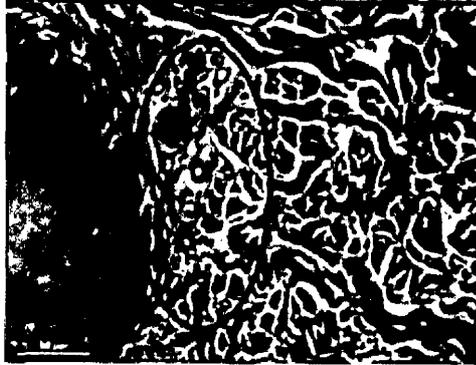
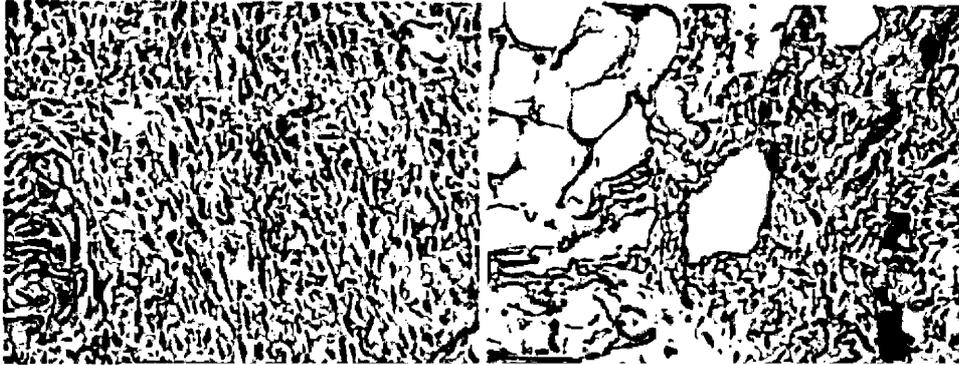


Figura 13 Piel de cerdo normal



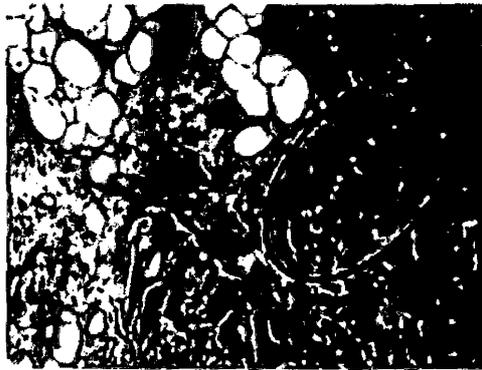
Control



Ensayo A



Ensayo B



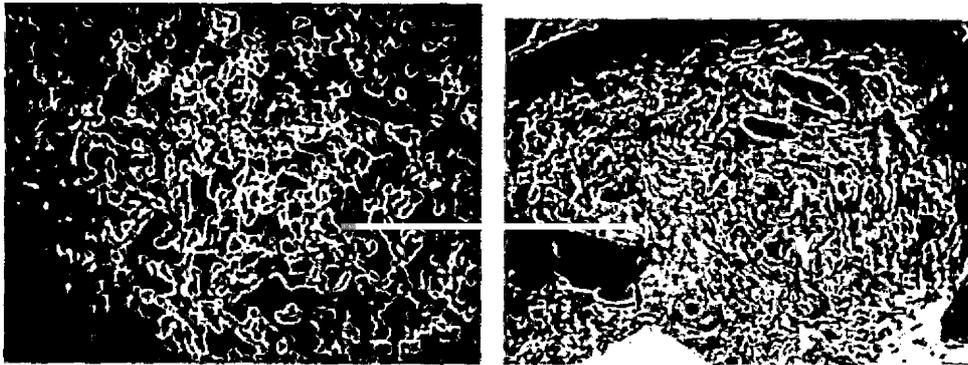


Figura 14: A)

B)