

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 222**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20	(2006.01) C08J 3/075	(2006.01)
A61L 27/36	(2006.01) C08J 3/24	(2006.01)
A61L 27/52	(2006.01) C08L 89/00	(2006.01)
C08L 5/08	(2006.01)	
A61L 27/22	(2006.01)	
A61K 8/64	(2006.01)	
A61K 8/73	(2006.01)	
A61Q 19/08	(2006.01)	
C08B 37/08	(2006.01)	
C08H 1/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2014** **PCT/US2014/034789**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014** **WO14176158**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2014** **E 14725886 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 2988791**

54 Título: **Composición reticulada de seda-ácido hialurónico**

30 Prioridad:

22.04.2013 US 201313868010

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

28.02.2020

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.0%)
2525 Dupont Drive
Irvine, CA 92612, US

72 Inventor/es:

PAVLOVIC, ELIZABETA;
SERBAN, MONICA A.;
YU, XIAOJIE y
MANESIS, NICHOLAS J.

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 745 222 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

Composición reticulada de seda-ácido hialurónico

5 Antecedentes

La presente invención se refiere a un método para elaborar un material de relleno dérmico, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 El ácido hialurónico (HA) (sinónimo de “hialurón” o “hialuronato”) es un glucosaminoglicano que se produce de manera natural que se ha usado como un constituyente de un material de relleno dérmico para la reducción de arrugas y la voluminización de tejidos. El hialuronano es glicosaminoglicano aniónico no sulfatado ampliamente distribuido a lo largo de los tejidos conjuntivo, epitelial y nervioso. El ácido hialurónico polimérico puede tener un peso molecular de varios millones de Daltons. Una persona normalmente tiene aproximadamente 15 gramos de hialuronano en su cuerpo, aproximadamente un tercio de lo cual se degrada cada día por enzimas endógenas y radicales libres en unas pocas horas o días y se reemplaza por ácido hialurónico recién sintetizado por el cuerpo.

La seda es una proteína natural (no sintética) elaborada de fibras de fibroína de alta resistencia con propiedades mecánicas similares a, o mejores que, muchas de las fibras de alta resolución sintéticas. La seda también es estable a temperaturas fisiológicas en un amplio intervalo de pH, y es insoluble en la mayoría de disolventes acuosos y orgánicos. Como proteína, a diferencia del caso con la mayoría de, si no todos, los polímeros sintéticos, los productos de degradación (por ejemplo péptidos, aminoácidos) de seda son biocompatibles. La seda no se deriva de mamíferos y porta mucha menos carga biológica que otros biomateriales naturales comparables (por ejemplo, colágeno derivado de bovino o porcino). La seda, término tal como generalmente se conoce en la técnica, significa un producto de fibra filamentoso secretado por un organismo tal como un gusano de seda o una araña. Las sedas pueden elaborarse por determinados insectos tales como, por ejemplo, gusanos de seda *Bombyx mori* y arañas *Nephila clavipes*. Existen muchas variantes de seda natural. La fibroína se produce y secreta por dos glándulas de seda de un gusano de seda. Cuando la fibroína abandona las glándulas, se recubre con sericina, una sustancia similar a la goma. La seda de araña se produce como un único filamento que carece de la proteína inmunogénica sericina.

La seda se ha usado en aplicaciones biomédicas. La especie de gusanos de seda *Bombyx mori* produce una fibra de seda (una “bava”) y usa la fibra para construir su capullo. La bava tal como se produce incluye dos filamentos de fibroína o hilos que están envueltos con un recubrimiento de la proteína antigénica gomosa sericina. La sericina de las fibras de seda recolectadas para elaborar textiles, suturas y ropa no se extrae o se reduce o sólo se reduce en una menor medida, y normalmente la seda sigue teniendo al menos del 10% al 26% en peso de sericina. La retención del recubrimiento de sericina protege los frágiles filamentos de fibroína de deshilacharse durante la elaboración de textiles. Por tanto, la seda de grado textil generalmente se elabora de fibras de fibroína de seda recubiertas con sericina. La seda de gusanos de seda de grado médico se usa o bien como sutura de seda virgen, en la que la sericina no se ha eliminado, o bien como una sutura de seda de la que se ha eliminado la sericina y reemplazado con un recubrimiento de cera o silicona para proporcionar una barrera entre la fibroína de seda y el tejido y las células del cuerpo. Por tanto, existe la necesidad de un dispositivo de seda implantable y biorreabsorbible con la sericina extraída que promueva el crecimiento de células.

La publicación en Bioconjugate Chemistry, 2010, 21, 240-247: Joem Y., *et al.*, *Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration*, comenta el uso de una HMDA reticulada particular para preparar un material de relleno dérmico de ácido hialurónico reticulado, y también divulga el uso de una variedad de reticulantes de ácido hialurónico y activadores hialurónicos que incluyen BDDE y EDC. La publicación en Carbohydrate Polymers, 2007, 70, 251-257: Jeon, O., *et al.*, *Mechanical properties and degradation behaviors of hyaluronic acid hydrogels cross-linked at various cross-linking densities*, comenta las propiedades del ácido hialurónico reticulado con una polietilenglicol-diamina (una PEG-diamina). La publicación en J. Am. Chem. Soc., 1955, 77 (14), 3908-3913: Schroeder W., *et al.*, *The aminoacid composition of Bombyx mori silk fibroin and of Tussah silk fibroin*, compara las composiciones de aminoácidos de la seda de dos especies de gusano de seda. La publicación de solicitud de patente estadounidense con n.º de publicación US 2010/0016886 A1: Lu, H., *High swell, long lived hydrogel sealant*; comenta la reacción de una amina de múltiples brazos (es decir, un polietilenglicol (PEG) de 9 brazos con un polisacárido (tales como ácido hialurónico) oxidado (es decir, para introducir grupos aldehído), útil para el aumento de tejidos o adhesivo/sellante de tejidos. El documento de patente estadounidense 6.903.199 concedida a Moon, T., *et al.*, *Crosslinked amide derivatives of hyaluronic acid and manufacturing method thereof*, comenta la reticulación del ácido hialurónico con un quitosano o con un ácido hialurónico desacetilado con grupos amida reactivos, usando (por ejemplo) EDC o NHS.

El documento de solicitud de patente internacional WO/2010/123945, Altman, G., *et al.*, *Silk fibroin hydrogels and uses thereof*, comenta los hidrogeles de seda elaborados, por ejemplo, digiriendo hidrogeles de seda desgomados elaborados, por ejemplo, digiriendo seda desgomada de *Bombyx mori* a 60°C durante 4 horas en bromuro de litio 9,3 M para obtener así una disolución de seda al 20%, una disolución de seda al 8% cuya gelificación se indujo usando 23RGD y/o etanol, que puede estar presente en un portador de ácido hialurónico. Altman comenta también

posibles usos como material de relleno dérmico y para promover el cierre de heridas, y un recubrimiento de hidrogel de seda sobre una malla de seda. Altman comenta también la seda reticulada a ácido hialurónico (véanse los párrafos [213] a [220], que usan diversos reticulantes).

El documento de solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO/2008/008857: Prestwich, G., *et al.*, *Thiolated macromolecules and methods for making and using thereof*, divulga un ácido hialurónico sustituido con éter de tioetilo elaborado mediante acoplamiento oxidante útil, por ejemplo, en el tratamiento de la artritis. El documento de solicitud de patente internacional con n.º de publicación WO/2008/008859: Prestwich, G., *et al.*, *Macromolecules modified with electrophilic groups and methods of making and using thereof*, divulga un ácido hialurónico derivado de haloacetato hecho reaccionar con ácido hialurónico modificado con tiol para elaborar un hidrogel, con diversos usos médicos. La publicación en *Biomacromolecules*, 2010, 11 (9), 2230-2237: Serban, M., *et al.*, *Modular elastic patches: mechanical and biological effects*, comenta cómo elaborar un parche elástico reticulando elastina, ácido hialurónico y seda, añadiendo un ácido hialurónico aminado (elaborado usando EDC) con una disolución de seda al 20% y elastina, en PBS con BS3 (suberato de bisulfosuccinimidilo como reticulante) a 37°C durante 12 horas. La publicación en *Biomaterials*, 2008, 29(10), 1388-1399: Serban, M., *et al.*, *Synthesis, characterization and chondroprotective properties of a hyaluronan thioethyl ether derivative*, comenta una disolución viscosa derivada de ácido 2-tioetileter-hialurónico útil para la viscosuplementación en el tratamiento de la artritis. El resumen menciona que puede usarse un ácido hialurónico previo con múltiples grupos tiol para la prevención de la adhesión. La publicación en *Methods*, 2008, 45, 93-98: Serban, M., *et al.*, *Modular extracellular matrices: solutions to the puzzle*, comenta el hidrogel reticulado de ácido hialurónico modificado con tiol útil como una matriz extracelular semisintética para el cultivo celular. La publicación en *Biomacromolecules*, 2007, 8(9), 2821-2828: Serban, M., *et al.*, *Synthesis of hyaluronan haloacetates and biology of novel cross linker free synthetic extracellular matrix hydrogels*, comenta la reticulación de los ácidos hialurónicos sustituidos con haloacetato hechos reaccionar con un ácido hialurónico sustituido con tiol para elaborar un hidrogel útil para el cultivo celular o la prevención de la adhesión o el recubrimiento de dispositivos médicos. La publicación en *Journal of Materials Chemistry*, 2009, 19, 6443-6450: Murphy A., *et al.*, *Biomedical applications of chemically modified silk fibroin*, es una revisión de métodos para elaborar conjugados de seda, incluyendo seda conjugada a los oligosacáridos, seda modificada y usos médicos. La publicación en *Biomacromolecules*, 2004, 5, 751-757: Sohn, S., *et al.*, *Phase behavior and hydration of silk fibroin*, comenta un estudio *in vitro* de seda de *Bombyx mori* usando estrés osmótico, determinando que se hidrata la seda I (seda α) pero no la seda II (lámina β , fibra de seda hilada). El documento de patente estadounidense 8.071.722 concedida a Kaplan, D., *et al.*, *Silk Biomaterials and methods of use thereof*, divulga películas de seda, el uso de 9-12m LiBr para disolver la seda extraída, añadiendo ácido hialurónico a una disolución de seda para elaborar fibras a partir de la composición. Véanse también, por ejemplo, los documentos de patente y de solicitud de patente de Kaplan 7.674.882; 8.178.656; 2010 055438 y 2011 223153. El documento de solicitud de patente estadounidense 2011 071239 por Kaplan, D., *et al.*, *pH induced silk gels and uses thereof*, divulga métodos para elaborar gel de fibroína de seda a partir de disolución de fibroína de seda, útil para recubrir un dispositivo médico usando implantes, como gel inyectable para rellenar un espacio libre de tejido, elaborar un gel de seda adhesivo (con o sin un ácido hialurónico), adherir el gel de seda adhesivo a un sujeto, por ejemplo, para su uso como bioadhesivo de heridas, un gel de seda multicapa. El documento de solicitud de patente estadounidense 2009 0202614 por Kaplan, D., *et al.*, *Methods for stepwise deposition of silk fibroin coatings*, comenta recubrimientos de seda estratificados, películas de seda elaboradas usando disoluciones de fibroína de seda que pueden incluir un ácido hialurónico útil, por ejemplo, como parches de curación de heridas, para recubrir un dispositivo médico implantable. El documento de patente estadounidense 4.818.291 concedida a Iwatsuki M., *et al.*, *Silk-fibroin and human-fibrinogen adhesive composition*, comenta un adhesivo quirúrgico útil en la reparación de tejidos elaborado como una mezcla de seda y fibrinógeno disueltos en LiBr.

El documento CN 102 836 465 se refiere a un procedimiento para preparar una composición de gel para su uso como material de relleno dérmico. El procedimiento incluye la etapa de reticular ácido hialurónico y seda usando un reticulante de epóxido múltiple tal como éter de diglicidilo y butanodiol.

Para aumentar el tiempo de residencia *in vivo*, pueden reticularse las cadenas lineales de ácido hialurónico con un reticulante molecular pequeño tal como, por ejemplo, la química del éter de diglicidilo y butanodiol (BDDE) o clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC). La reticulación del ácido hialurónico con BDDE se lleva a cabo normalmente a pH alto (>12) y a temperaturas de aproximadamente 50°C. Se ha informado que la constante de velocidad de degradación de HA aumenta aproximadamente en 100 veces cuando se aumenta tanto la temperatura como el pH desde 40 hasta 60°C y desde 7 hasta 11, respectivamente. Por tanto, existe la necesidad de reticulantes y químicas de reticulación para el ácido hialurónico que puedan usarse para reticular ácido hialurónico en condiciones más suaves. De manera adicional, existe la necesidad de una composición que comprenda seda unida a ácido hialurónico con usos médicos y cosméticos.

Sumario

La presente invención satisface estas necesidades y proporciona un método para elaborar una composición que comprende seda unida a ácido hialurónico, con usos médicos y cosméticos. Por ejemplo, la presente invención puede reticular ácido hialurónico en condiciones suaves, por ejemplo, usando como reticulante clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC).

Los geles de ácido hialurónico con aditivos presentan comportamientos moleculares que pueden usarse para dictar las propiedades del material a granel, tales como parámetros mecánicos y reológicos, estabilidad química, cito y biocompatibilidad y actividad biológica no encontrada en geles de ácido hialurónico puros; por tanto, pueden usarse para diferentes aplicaciones en comparación con los geles de ácido hialurónico puros. Se han inventado geles de ácido hialurónico en los que el ácido hialurónico se reticula con un fibroína de seda soluble en agua. Para obtener una disolución de fibroína de seda soluble en agua, la seda de los capullos de *Bombyx mori*, la sericina presente de manera natural en la seda de gusanos de seda, puede retirarse empapando la seda en una disolución básica caliente, y la seda con la sericina extraída puede elaborarse entonces para formar hilo. Posteriormente, el hilo puede digerirse (disolverse) en LiBr 9,3 M y dializarse, dando como resultado una disolución de agua MilliQ de SF soluble en agua en un estado desnaturalizado. La composición de aminoácidos de fibroínas de seda de *Bombyx mori* muestra una baja cantidad de ácido aspártico/ácido glutámico (grupos carboxílicos), una cantidad aún más baja de lisina (grupos amina) y una alta cantidad de serina (grupos hidroxilo). Aunque puede usarse BDDE, la química de EDC se usa preferentemente para reticular los geles debido a las condiciones de reacción suaves. Siendo el contenido de lisina de la fibroína de seda bajo, se usan también los reticulantes de diaminas HMDA o éster metílico de lisina para permitir la formación de enlaces de amida estables entre moléculas. De manera adicional, la formación de láminas beta de seda puede inducirse potencialmente con acelerantes (pH, temperatura, agitación con vórtex, sonicación, tratamiento con etanol, etc).

El montaje de mezclado usado para mezclar el ácido hialurónico y la fibroína de seda influye en la dispersión de la fibroína de seda dentro de la masa de ácido hialurónico. El mezclado rápido que crea un flujo turbulento, tal como el paso de jeringa a jeringa, favorece la agregación de moléculas de fibroína de seda y la formación de partículas más grandes (10-70 μ M) dentro del gel. Usando un flujo laminar lento, normalmente en un mezclador estático, se obtiene una dispersión uniforme de fibroína de seda con menos partículas (1-10 μ M). En general, la presencia de fibroína de seda reticulada en el gel de ácido hialurónico modifica las propiedades reológicas de los geles aumentando la hidrofobicidad y el G'. Este es el resultado del replegamiento de la fibroína de seda en láminas beta que interactúan entre sí cuando se añaden sales de tampón, formando fuertes conexiones entre las moléculas de fibroína de seda y dando como resultado una estructura similar a la red que se suma al efecto de la reticulación. Dado que las moléculas de fibroína de seda forman fuertes interacciones entre láminas beta que no se destruyen mediante calor, el ácido hialurónico reticulado con geles de fibroína de seda puede esterilizarse mediante esterilización en autoclave. La disminución de G' observada después de la esterilización en autoclave sólo es del 5 - 20% del valor G' original, frente a hasta el 60% para HA puro.

Dado que la fibroína de seda sólo contiene una pequeña cantidad de grupos COOH en forma de residuos de ácido aspártico y glutámico, la reticulación de ácido hialurónico-fibroína de seda puede potenciarse química o enzimáticamente. El ácido hialurónico puede conjugarse usando o bien la funcionalidad COOH de los residuos de ácido glucurónico o bien los grupos (CH₂)-OH de los residuos de N-acetilglucosamina en el ácido hialurónico. La fibroína de seda se funcionalizaría primero mediante química diazo en los residuos de tirosina para introducir funcionalidades COOH adicionales. Los motivos de adhesión (en forma de RGD o péptidos, gelatina, colágeno o fragmentos de colágeno) también pueden unirse químicamente a o bien el ácido hialurónico o bien la fibroína de seda. Además de los aminoácidos de fibroína de seda mencionados anteriormente adecuados para modificaciones químicas, hay un número significativo de residuos de serina que pueden modificarse químicamente (es decir, reacción con ácido cloroacético para introducir funcionalidades COOH). En un concepto, un motivo de adhesión puede injertarse químicamente en o bien la fibroína de seda o bien el ácido hialurónico, luego puede usarse una funcionalidad diferente o una segunda etapa de conjugación para unir covalentemente la fibroína de seda al ácido hialurónico.

La presente invención proporciona una composición y métodos para tratar un estado de la piel en un individuo que lo necesita, comprendiendo el método las etapas de administrar una composición divulgada en el presente documento en una región dérmica del individuo, en la que la administración mejora el estado de la piel. Los estados de la piel tratados mediante las composiciones divulgadas incluyen, sin limitación, aumentos, reconstrucciones, enfermedades, trastornos, defectos o imperfecciones de una parte, región o área del cuerpo. En un aspecto, un estado de la piel tratado mediante las composiciones divulgadas incluye, sin limitación, un aumento facial, una reconstrucción facial, una enfermedad facial, un trastorno facial, un defecto facial o una imperfección facial. En un aspecto, un estado de la piel tratado mediante las composiciones divulgadas incluye, sin limitación, deshidratación de la piel, una falta de elasticidad de la piel, rugosidad de la piel, una falta de firmeza de la piel, una línea de estiramiento o estría de la piel, palidez de la piel, cicatrices deprimidas dérmicas, una mejilla hundida, un labio delgado, un defecto retroorbital, un pliegue facial o una arruga.

Descripción

La presente invención se basa en el descubrimiento de métodos particulares para reticular seda con un ácido hialurónico y los usos para tal composición (la "composición"). Por ejemplo, la composición puede usarse como material de relleno dérmico y también junto con un aumento y reconstrucción de mama en el que se desea la voluminización del tejido blando y/o la regeneración del tejido o el crecimiento del tejido. De manera adicional, la composición puede usarse para ayudar a rellenar (es decir, voluminizar) cualquier espacio libre de tejido o bien

natural o bien provocado por un procedimiento quirúrgico que eliminó el tejido, mediante un tratamiento con corticosteroide, mediante una reacción inmunológica que da como resultado lipoatrofia, daño del tejido resultante de lesiones por impacto, o debido al tratamiento radiológico o con medicamento químico. De manera similar, la composición puede usarse como medio para reducir el tejido cicatricial como resultado de la vascularización y disolución activa del tejido cicatricial como un procedimiento o bien preventivo o bien postratamiento basado en la administración de células derivadas de grasa o células madre o células progenitoras viables al sitio.

En una realización, la composición puede comprender un componente celular tal como componentes celulares vivos o viables, y un componente de relleno que proporciona de manera eficaz volumen y soporte para la viabilidad y el crecimiento de las células y/u otros tejidos cuando la composición se inyecta en una región diana de un paciente.

La composición, cuando se inyecta en una región diana de un paciente, puede proporcionar un plazo relativamente largo, por ejemplo, superior a seis meses o más, de relleno o voluminización de tejido aumentado, en relación con una composición sustancialmente idéntica que no incluye un componente celular. La composición también puede proporcionar el soporte, la estructura y el espacio dentro del tejido para permitir el crecimiento y la regeneración de tejido. El componente celular en la composición puede proporcionar la producción o estimulación de citocinas y estimuladores intrínsecos del crecimiento y mantenimiento del tejido en el sitio de inyección.

El componente celular de la presente composición comprende preferiblemente células progenitoras derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células madre derivadas de tejido adiposo. En algunas realizaciones de la invención, se proporcionan métodos para rellenar y regenerar tejido usando tales composiciones de relleno y célula que incluyen células autólogas, por ejemplo, células madre adultas y/o células progenitoras autólogas derivadas de tejido adiposo. El componente celular de la composición puede proporcionar la regeneración de tejido a plazo relativamente largo cuando se combina con un componente de relleno después de que la composición se haya inyectado o implantado a un paciente.

El componente de relleno de las presentes composiciones generalmente comprende un material biocompatible que puede proporcionar un relleno de tejido sustancialmente inmediato o a corto plazo, y preferiblemente, un entorno propicio para el crecimiento de célula o tejido.

En algunas realizaciones, el componente de relleno es un material que absorbe agua y se expande una vez que se ha inyectado en el cuerpo, para proporcionar espacio para el crecimiento celular para potenciar la regeneración de tejido. El componente de relleno puede ser un material seleccionado del grupo que consiste en ácido hialurónico (HA), colágeno, ácido hialurónico/colágeno reticulados, hidrogeles y combinaciones de los mismos.

En un aspecto de la invención, el componente de relleno puede incluir además uno o más materiales o agentes adicionales que son componentes de una matrix extracelular natural o péptidos, derivados o análogos de moléculas de unión a integrina, que son capaces de optimizar la viabilidad de células implantadas y/o mantener el crecimiento celular durante un plazo relativamente largo o periodo de tiempo sostenido después de la inyección o implantación de la composición.

El componente de relleno puede comprender, por ejemplo, un material de hidrogel combinado con uno o más materiales beneficiosos, por ejemplo, moléculas de unión a integrina, derivados de unión a integrina o análogos de los mismos, o péptidos o análogos de péptido con el potencial para unirse a integrinas en la población de células inyectadas. Tales materiales pueden seleccionarse basándose en su capacidad para unirse a receptores de factores de crecimiento para estimular así el crecimiento celular, por ejemplo, las células adiposas inyectadas y/o la afluencia de progenitores o citocinas de tejido intrínsecos.

La reticulación de HA mediante la química de EDC implica el uso de reticulantes pequeños de amina múltiple, que forman enlaces amida con los grupos funcionales carboxílicos de las cadenas de HA. En una condición ideal, el EDC activa los grupos de ácido carboxílico de HA, y los grupos de ácido carboxílico activados reaccionan entonces con las aminas. La reticulación se realiza normalmente a pH de entre 4 y 7 y a temperaturas de entre 20 y 37°C, condiciones en las que la degradación de HA es mínima. Los reticulantes lineales de diamina como hexametildiamina (HMDA), lisina, éster metílico de lisina o éster etílico de lisina se han usado para reticular HA para diversas aplicaciones. Los aditivos de proteína con alto contenido en lisina tales como colágeno también pueden usarse. La reticulación de HA mediante la química de EDC sin el uso de un reticulante de amina múltiple da como resultado la formación de enlaces éster entre los grupos de ácido carboxílico y los grupos hidroxilo de HA. Los enlaces éster son muy lábiles y se hidrolizan fácilmente a altas temperaturas. Los hidrogeles de HA elaborados mediante reticulación de ésteres generalmente no son robustos y no pueden esterilizarse con vapor húmedo.

La presente invención incluye una composición que comprende una fase de gel que incluye un hidrogel que comprende una fibroína de seda unida covalentemente a un HA ("la composición").

La fibroína de seda usada para preparar la composición es un intermedio en el procedimiento de producción del hidrogel de seda y un precursor directo para el material de hidrogel. La fibroína de seda despolimerizada puede elaborarse a partir de capullos en bruto, seda previamente desgomada o cualquier otra seda parcialmente limpiada.

Esto puede incluir también material comúnmente denominado como “residuo” del procedimiento de devanado, es decir fragmentos cortos de seda en bruto o desgomada, la única precaución es que la seda debe limpiarse sustancialmente de sericina antes de elaborar la disolución de fibroína e inducir la formación del gel. Una fuente particular de seda en bruto es a partir del gusano de seda domesticado común *B. mori*, aunque pueden ser apropiadas otras varias fuentes de seda. Estas incluyen otras cepas de *Bombycidae* que incluyen *Antheraea pernyi*, *Antheraea yamamai*, *Antheraea mylitta*, *Antheraea assama* y *Philosamia cynthia ricini*, así como miembros productores de seda de las familias *Saturnidae*, *Thaumetopoeidae* y miembros productores de seda del orden *Araneae*. El material también puede obtenerse a partir de otras arañas, orugas o fuentes recombinantes.

Un hidrogel divulgado en el presente documento proporciona una fibroína de seda despolimerizada y/o fibroína de seda que está sustancialmente libre de sericina. Los métodos para realizar la extracción de sericina se han descrito en solicitud de patente estadounidense pendiente con n.º de serie 10/008.924, la publicación estadounidense n.º 2003/0100108, *Matrix for the production of tissue engineered ligaments, tendons and other tissue*. Esa solicitud se refiere a fibras de fibroína limpiadas que se hilan para producir hilos, usados para crear una matriz porosa y elástica adecuada como sustrato para aplicaciones que requieren una resistencia a la tracción muy alta, tales como ligamentos y tendones obtenidos por bioingeniería.

Los extractantes tales como disolución de urea, agua caliente, disoluciones de enzimas que incluyen papaína entre otras que se conocen en la técnica para eliminar la sericina de la fibroína también serían aceptables para la generación de la seda. También pueden usarse métodos mecánicos para la eliminación de sericina de la fibroína de seda. Esto incluye, pero no se limita a, ultrasonido, lavado químico abrasivo y flujo líquido. El aclarado después de la extracción se lleva a cabo preferiblemente con agitación vigorosa para eliminar sustancialmente cualquier contaminante iónico soluble, y en los residuos solubles presentes en la seda tal como se monitoriza a través de microscopía y mediciones electroquímicas de la disolución. Un criterio es que el extractante elimina de manera previsible y repetible el recubrimiento de sericina de la fuente de seda sin comprometer significativamente la estructura molecular de la fibroína. Por ejemplo, una extracción para la eliminación de la sericina puede evaluarse mediante la pérdida de masa, el análisis del contenido de aminoácidos y microscopía electrónica de barrido. A su vez, la degradación de la fibroína puede monitorizarse mediante análisis por FTIR, electroforesis en gel convencional de proteínas y microscopía electrónica de barrido.

En determinados casos, se ha reducido sustancialmente el contenido original de sericina (es decir, sericina residual $\leq 4\%$ (p/p) en la seda extraída final) de la seda utilizada para elaborar la composición. Alternativamente, pueden quedar concentraciones de sericina residual más altas en la seda tras la extracción o puede omitirse la etapa de extracción. En aspectos preferidos de esta realización, la fibroína de seda con sericina reducida tiene, por ejemplo, sericina residual de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 4% (p/p). En los aspectos más preferidos de esta realización, la fibroína de seda con la sericina reducida tiene, por ejemplo, sericina residual de aproximadamente el 1% al 3% (p/p).

En determinados casos, la seda utilizada para la generación de un hidrogel de seda está completamente libre de su contenido original de sericina. Tal como se usa en el presente documento, el término “completamente libre (es decir, la terminología “que consiste en”) significa que la sustancia no puede detectarse o su presencia no puede confirmarse dentro del intervalo de detección del instrumento o procedimiento que está usándose.

La seda soluble en agua o disuelta puede prepararse mediante una digestión de 4 horas a 60°C de fibroína de seda pura a una concentración de 200 g/l en una disolución acuosa de bromuro de litio 9,3 M para formar una concentración de seda del 20% (p/v). Este procedimiento puede realizarse por otros medios siempre que den un grado de disociación similar al proporcionado por una digestión de 4 horas a 60°C de fibroína de seda pura a una concentración de 200 g/l en una disolución acuosa de bromuro de litio 9,3 M. El objetivo principal de esto es crear moléculas de fibroína de seda disociadas de manera uniforme y repetible para asegurar propiedades de disolución de fibroína y, posteriormente, propiedades de dispositivo similares. Una disolución de seda sustancialmente menos disociada puede tener la cinética de gelificación alterada dando como resultado propiedades de gel final distintas. El grado de disociación puede indicarse mediante espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) o difracción de rayos X (XRD) y otras modalidades que midan cuantitativa y cualitativamente la estructura de la proteína. De manera adicional, se puede confirmar que los dominios de cadena pesada y ligera del dímero de la fibroína de seda han permanecido intactos tras el tratamiento y disolución de la seda. Esto puede lograrse mediante métodos tales como electroforesis de proteína en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) estándar que evalúa el peso molecular de los dominios de fibroína de seda independientes.

Los parámetros de sistema que pueden modificarse en la disolución de seda inicial incluyen, pero no se limitan a, tipo de disolvente, concentración de seda, temperatura, presión y adición de fuerzas mecánicas perturbadoras. Los tipos de disolventes distintos de bromuro de litio acuoso pueden incluir, pero no se limitan a, disoluciones acuosas, disoluciones de alcohol, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol, y hexafluoroacetona, 1-butil-3-metilimidazolio. Estos disolventes pueden potenciarse además mediante la adición de urea o especies iónicas que incluyen bromuro de litio, cloruro de calcio, tiocianato de litio, cloruro de zinc, sales de magnesio, tiocianato de sodio, y otros haluros de litio y calcio serían útiles para tal aplicación. Estos disolventes pueden modificarse también a través del ajuste del pH mediante la adición de compuestos o bien ácidos o bien básicos.

La reticulación también puede conseguirse sin reticulantes exógenos utilizando grupos reactivos en las moléculas que van a conjugarse. Los métodos para reticular químicamente las moléculas de péptido se conocen generalmente en la técnica, y se describe un número de agentes hetero y homobifuncionales en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.355.023, 4.657.853, 4.676.980, 4.925.921 y 4.970.156, e Immuno Technology Catalogue and Handbook, Pierce Chemical Co. (1989), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Tal conjugación, incluyendo la reticulación, debe realizarse de manera que no afecte sustancialmente a la función deseada del oligómero de péptido o de la entidad conjugada al mismo, incluyendo los agentes terapéuticos, y restos capaces de unirse a sustancias de interés.

Sera evidente para el experto en la técnica que pueden usarse reticulantes alternativos para unir péptidos, por ejemplo, el uso de reticulantes químicos de proteínas. Por ejemplo, el reticulante homobifuncional tal como diclorhidrato de disuccinimidil-suberimidato; diclorhidrato de dimetil-adipimidato; 1,5,-2,4-dinitrobenzono o reticulantes heterobifuncionales tales como N-hidroxisuccinimidil-2,3-dibromopropionato; clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida; y succinimidil-4-[n-maleimidometil]-ciclohexan-1-carboxilato.

Una composición divulgada en el presente documento es normalmente biodegradable, bioerosionable y/o biorreabsorbible. En una realización, una fibroína de seda reticulada con un hidrogel de ácido hialurónico divulgado en el presente documento tiene una estructura de proteína que hace al hidrogel resistente a la biodegradación, bioerosión y/o biorreabsorción. En aspectos de esta realización, un hidrogel es resistente a la biodegradación, bioerosión y/o biorreabsorción durante, por ejemplo, entre aproximadamente 10 días y aproximadamente 180 días. En un aspecto preferido de esta realización, un hidrogel es resistente a la biodegradación, bioerosión y/o biorreabsorción durante, por ejemplo, de aproximadamente 30 días a aproximadamente 90 días. En el aspecto más preferido de esta realización, un hidrogel es resistente a la biodegradación, bioerosión y/o biorreabsorción durante, por ejemplo, de aproximadamente 20 días a 90 días.

En aún otra realización, un hidrogel de fibroína de seda divulgado en el presente documento tiene una estructura de proteína que incluye sustancialmente regiones de giro β y cadena β . En otro aspecto de esta realización, un hidrogel tiene una estructura de proteína que incluye, por ejemplo, entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 100% de regiones de giro β y cadena β . En un aspecto preferido de esta realización, un hidrogel tiene una estructura de proteína que incluye, por ejemplo, entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 70% de regiones de giro β y cadena β . En el aspecto más preferido de esta realización, un hidrogel tiene una estructura de proteína que incluye, por ejemplo, entre aproximadamente el 30% y aproximadamente el 50% de regiones de giro β y cadena β .

En aún otra realización, un hidrogel de fibroína de seda divulgado en el presente documento tiene una estructura de proteína que está sustancialmente libre de regiones de hélice α y espiral aleatoria. En aspectos de esta realización, un hidrogel tiene una estructura de proteína que incluye, por ejemplo, entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 50% de regiones de hélice α y espiral aleatoria. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel tiene una estructura de proteína que incluye, por ejemplo, entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 40% de regiones de hélice α y espiral aleatoria. En los aspectos más preferidos de esta realización, un hidrogel tiene una estructura de proteína que incluye, por ejemplo, entre aproximadamente el 15% y aproximadamente el 35% de regiones de hélice α y espiral aleatoria.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, un hidrogel de fibroína de seda que tiene dureza. La dureza se refiere a diversas propiedades de un objeto en la fase sólida que le otorga alta resistencia a diversas clases de cambio de forma cuando se aplica una fuerza. La dureza se mide usando un durómetro y es un valor sin unidades que oscila desde cero hasta 100. La capacidad o incapacidad de un hidrogel para comprimirse fácilmente afectará a su idoneidad para la aplicación en diferentes papeles de reemplazo de tejidos, es decir, el cumplimiento mecánico como hueso, grasa, tejido conjuntivo. La dureza también afectará a la capacidad de un hidrogel para triturarse de manera eficaz, siendo la razón que un material duro puede triturarse de manera más fácil y consistente. La dureza también afectará a la capacidad de extrusión, ya que un material blando puede comprimirse ligeramente más fácilmente durante la inyección para empaquetarse con otras partículas o cambiar de forma para pasar a través de un cilindro o una aguja de una jeringa.

En una realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza baja. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza de, por ejemplo, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza de, por ejemplo, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30. En los aspectos más preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza de, por ejemplo, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35.

En una realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza media. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza de, por ejemplo, aproximadamente 40 a aproximadamente 65. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza de, por ejemplo, aproximadamente 30 a aproximadamente 55. En los aspectos más preferidos de esta realización, un

hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza de, por ejemplo, aproximadamente 45 a aproximadamente 60.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una dureza alta. En aspectos de esta realización, un hidrogel de seda muestra una dureza de, por ejemplo, entre aproximadamente 65 y aproximadamente 95. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de seda muestra una dureza de, por ejemplo, entre aproximadamente 70 y aproximadamente 90. En los aspectos más preferidos de esta realización, un hidrogel de seda muestra una dureza de, por ejemplo, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 85.

En una realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra alta resistencia a la deformación. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una resistencia a la deformación de, por ejemplo, aproximadamente el 100% a aproximadamente el 85%. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una resistencia a la deformación de, por ejemplo, aproximadamente el 95% a aproximadamente el 80%. En los aspectos más preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra una resistencia a la deformación de, por ejemplo, aproximadamente el 93% a aproximadamente el 78%.

Un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de elasticidad. El módulo de elasticidad o coeficiente de elasticidad se refiere a la capacidad de un material de hidrogel para resistir a la deformación, o, por el contrario, la tendencia de un objeto para deformarse de manera no permanente cuando se le aplica una fuerza. El módulo de elasticidad de un objeto se define como la pendiente de su curva tensión-deformación en la región de deformación elástica: $\lambda = \text{tensión/deformación}$, en la que λ es el módulo de elasticidad en Pascales; la tensión es la fuerza que provoca la deformación dividida por el área a la que se aplica la fuerza; y la deformación es la razón de cambio provocado por la tensión con respecto al estado original del objeto. Especificando cómo se miden las tensiones, incluyendo las direcciones, se permiten definir muchos tipos de módulos de elasticidad. Los tres módulos de elasticidad principales son módulo de tracción, módulo de cizalladura y módulo de compresibilidad.

El módulo de tracción (E) o módulo de Young es la respuesta de un objeto a la deformación lineal, o la tendencia de un objeto para deformarse a lo largo de un eje cuando se aplican fuerzas opuestas a lo largo de ese eje. Se define como la proporción de la tensión de tracción con respecto a la deformación por tracción. A menudo se le denomina simplemente como el módulo de elasticidad. El módulo de cizalladura o módulo de rigidez se refiere a la tendencia a la cizalladura de un objeto (la deformación de la forma a volumen constante) cuando se le aplican fuerzas opuestas. Se define como la tensión de cizalladura con respecto a la deformación por cizalladura. El módulo de cizalladura es parte de la derivación de la viscosidad. El módulo de cizalladura está relacionado con la deformación de un sólido cuando experimenta una fuerza paralela a una de sus superficies mientras su cara opuesta experimenta una fuerza opuesta (tal como fricción). El módulo de compresibilidad (K) describe la elasticidad volumétrica o la resistencia de un objeto a la compresión uniforme, y es la tendencia de un objeto a deformarse en todas las direcciones cuando se carga de manera uniforme en todas las direcciones. Se define como la tensión volumétrica con respecto a la deformación volumétrica, y es la inversa de la compresibilidad. El módulo de compresibilidad es una extensión del módulo de Young a tres dimensiones.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de tracción y/o cizalladura. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de tracción de, por ejemplo, aproximadamente 1 MPa a aproximadamente 30 GPa. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de tracción de, por ejemplo, aproximadamente 5 MPa a aproximadamente 25 GPa. En los aspectos más preferidos de esta realización, por ejemplo, un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de tracción de aproximadamente 20 MPa a aproximadamente 15 GPa.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de compresibilidad. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de compresibilidad de, por ejemplo, aproximadamente 5 GPa a aproximadamente 100 GPa. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de compresibilidad de, por ejemplo, aproximadamente 10 GPa a aproximadamente 90 GPa. En los aspectos más preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un módulo de compresibilidad de, por ejemplo, aproximadamente 25 GPa a aproximadamente 85 GPa.

Un hidrogel de fibroína de seda muestra alta resistencia a la tracción. La resistencia a la tracción tiene tres puntos definitorios diferentes de tensión máxima. El límite elástico se refiere a la tensión a la que la deformación del material cambia desde deformación elástica hasta deformación plástica, provocando que se deforme de manera permanente. La resistencia máxima a la tracción se refiere a la tensión máxima que un material puede resistir cuando se le somete a tensión, compresión o cizalladura. Es la tensión máxima en la curva tensión-deformación. La resistencia a la rotura se refiere a la coordenada de tensión en la curva tensión-deformación en el punto de rotura, o cuando el material se fragmenta.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra alto límite elástico, alta resistencia máxima a la tracción y/o alta resistencia a la rotura en relación con otras clases de polímeros. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un límite elástico de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 MPa a aproximadamente 500 MPa. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un límite elástico de, por ejemplo, aproximadamente 5 MPa a aproximadamente 400 MPa. En los aspectos

más preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda muestra un límite elástico de, por ejemplo, aproximadamente 20 MPa a aproximadamente 300 MPa.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, un hidrogel de fibroína de seda que tiene transparencia y/o translucidez. La transparencia (también denominada pelucidad o diafanidad) es la propiedad física que permite a la luz pasar a través de un material, mientras que la translucidez (también denominada translucencia o traslucidez) sólo permite a la luz pasar a través de manera difusa. La propiedad contraria es la opacidad. Los materiales transparentes son claros, mientras que los translúcidos no puede verse a su través de manera clara. Los hidrogeles de fibroína de seda divulgados en el presente documento pueden, o no pueden, mostrar propiedades ópticas tales como transparencia y translucidez. En determinados casos, por ejemplo, en el relleno de línea superficial, sería una ventaja tener un hidrogel opaco. En otros casos, tales como en el desarrollo de una lente o un "humor" para rellenar el ojo, sería una ventaja tener un hidrogel translúcido. Estas propiedades pueden modificarse afectando a la distribución estructural del material de hidrogel. Los factores usados para controlar las propiedades ópticas de un hidrogel incluyen, sin limitación, concentración de fibroína de seda, cristalinidad del gel y homogeneidad del hidrogel.

Cuando la luz se encuentra con un material, puede interactuar con él de varias maneras diferentes. Estas interacciones dependen de la naturaleza de la luz (su longitud de onda, frecuencia, energía, etc.) y la naturaleza del material. Las ondas de luz interactúan con un objeto mediante alguna combinación de reflexión y transmitancia con refracción. Como tal, un material ópticamente transparente permite la transmisión de mucha de la luz que le llega, siendo reflejada poca luz. Los materiales que no permiten la transmisión de la luz se denominan ópticamente opacos o simplemente opacos.

En una realización, un hidrogel de fibroína de seda es ópticamente transparente. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, entre aproximadamente el 75% y aproximadamente el 100% de la luz. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, entre aproximadamente el 80% y aproximadamente el 90% de la luz. En los aspectos más preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, entre aproximadamente el 85% y aproximadamente el 90% de la luz.

En otra realización, un hidrogel de fibroína de seda es ópticamente opaco. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, entre aproximadamente 5% y aproximadamente 75% de la luz. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 70% de la luz. En los aspectos más preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite, por ejemplo, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 65% de la luz.

En una realización, un hidrogel de fibroína de seda es ópticamente translúcido. En aspectos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite de manera difusa, por ejemplo, entre aproximadamente el 75% y aproximadamente el 100% de la luz. En algunos aspectos preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite de manera difusa, por ejemplo, entre aproximadamente el 80% y aproximadamente el 95% de la luz. En algunos de los aspectos más preferidos de esta realización, un hidrogel de fibroína de seda transmite de manera difusa, por ejemplo, entre aproximadamente el 85% y aproximadamente el 95% de la luz.

Después de la formación de un hidrogel descrito en el presente documento, el hidrogel puede tratarse adicionalmente. Por ejemplo, para eliminar especies potenciadoras y volverse más completo, el hidrogel formado puede extraerse frente a un disolvente, tal como, por ejemplo, agua, en condiciones de temperatura y presión ambiente durante tres días con cinco cambios de agua. El hidrogel puede extraerse frente a agua ultrapura de un volumen al menos 100 veces el del gel. Más específicamente, por ejemplo, pueden situarse los geles en abundancia de agua purificada y cambiarse el aclarado a las horas 12, 24 y 48 con 15 ml de gel por 1,5 l de agua. El número de aclarados y proporciones de volumen implicados pueden alterarse mientras el hidrogel resultante esté sustancialmente libre de potenciador de gelificación residual.

Una composición divulgada en el presente documento puede formularse usando restricciones de tratamiento de material tales como concentración de seda y concentración de solución salina para diseñar una longevidad del material *in vivo*. En un ejemplo, un hidrogel de seda puede diseñarse para una persistencia de cinco semanas a seis semanas *in vivo* usando un gel de seda al 1%-3% (p/v) con portador de solución salina al 25%-50% (v/v). En otro ejemplo, un hidrogel de seda puede diseñarse para una persistencia de dos meses a tres meses *in vivo* usando un gel de seda al 3%-5% (p/v) con solución salina al 20%-40% (v/v). En otro ejemplo, un hidrogel de seda puede diseñarse para una persistencia de 5-6 meses usando un gel de seda al 4-6% (p/v) con solución salina al 20-40% (v/v). En otro ejemplo, un hidrogel de seda puede diseñarse para una persistencia de 7-10 meses usando un gel de seda al 6-8% (p/v) con solución salina al 20-30% (v/v). La persistencia de estos materiales también puede aumentarse o disminuirse aumentando o disminuyendo el tamaño de partícula, respectivamente.

El contenido salino de emulsión de gel y la concentración de seda de gel pueden usarse para modificar el perfil mecánico de los materiales de gel de seda para aplicaciones particulares. Por ejemplo, una emulsión de gel con una concentración de gel de seda de aproximadamente el 1% (p/v) a aproximadamente el 5% (p/v) con lubricante al 5%-

95% (por ejemplo, solución salina/PBS al 5%-95% (p/v)) puede ser útil como material de relleno dérmico, agente de carga, agente de camuflaje, material de relleno intramuscular o sub-Q, o vector de administración farmacéutico. Una emulsión de gel con una concentración de gel de seda de, por ejemplo, aproximadamente el 5% (p/v) a aproximadamente el 8% (p/v) con fluido lubricante a del 0% a aproximadamente el 30% puede ser útil en defectos óseos o defectos de cartílago.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, una composición que comprende una fase de gel que incluye un hidrogel que comprende un polímero de matriz. Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden comprender además un hidrogel que comprende uno o más polímeros de matriz además de partículas de hidrogel que comprenden fibroína de seda, o un hidrogel que comprende uno o más polímeros de matriz y fibroína de seda. Tal como se usa en el presente documento, el término "polímero de matriz" se refiere a un polímero que puede formar parte de y/o funcionar como polímero de matriz extracelular y sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Los ejemplos no limitativos de un polímero de matriz incluyen un glicosaminoglicano tal como sulfato de condroitina, dermatán sulfato, queratán sulfato, hialuronano; una lubricina; un polisacárido y una proteína elástica (tal como proteína de seda, resilina, polipéptidos similares a resilina (RLP), elastina (incluyendo tropoelastina, fibrilina y fibulina), polipéptidos similares a elastina (ELP), gluten (incluyendo gliadina y glutenina), abductina, biso y colágeno). Los ejemplos no limitativos de una sal farmacéuticamente aceptable de un polímero de matriz incluyen sales de sodio, sales de potasio, sales de magnesio, sales de calcio y combinaciones de las mismas. Los polímeros de matriz útiles en las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento se describen en, por ejemplo, Piron y Tholin, Polysaccharide Crosslinking, Hydrogel Preparation, Resulting Polysaccharides(s) and Hydrogel(s), uses Thereof, publicación de patente estadounidense 2003/0148995; Lebreton, Cross-Linking of Low and High Molecular Weight Polysaccharides Preparation of Inyectable Monophase Hydrogels; Lebreton, Viscoelastic Solutions Containing Sodium Hyaluronate and Hydroxypropyl Methyl Cellulose, Preparation and Uses, publicación de patente estadounidense 2008/0089918; Lebreton, Hyaluronic Acid-Based Gels Including Lidocaine, publicación de patente estadounidense 2010/0028438; y Polysaccharides and Hydrogels thus Obtained, publicación de patente estadounidense 2006/0194758; y Di Napoli, Composition and Method for Intradermal Soft Tissue Augmentation, publicación de patente internacional WO 2004/073759, cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad en el presente documento.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, una composición que comprende un hialuronano. Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido hialurónico" es sinónimo de "HA", "ácido hialurónico", y "hialuronato" se refiere a un polímero de glicosaminoglicano aniónico no sulfatado que comprende unidades de disacárido, que incluyen en sí monómeros de ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina, unidos juntos a través de enlaces glicosídicos β -1,4 y β -1,3 alternantes y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. El hialuronano puede purificarse a partir de fuentes animales y no animales. El tamaño de los polímeros de hialuronano puede oscilar desde aproximadamente 5.000 Da hasta aproximadamente 20.000.000 Da. Cualquier hialuronano es útil en las composiciones divulgadas en el presente documento con la condición de que el hialuronano mejora el estado de la piel, tal como, por ejemplo, hidratación o elasticidad. Los ejemplos no limitativos de sales de hialuronano farmacéuticamente aceptables incluyen hialuronano de sodio, hialuronano de potasio, hialuronano de magnesio, hialuronano de calcio y combinaciones de los mismos.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, una composición que comprende un polímero de matriz reticulado. Tal como se usa en el presente documento, el término "reticulado/a" se refiere a los enlaces intermoleculares que unen las moléculas individuales de polímero, o cadenas de monómero, para formar una estructura más estable tal como un gel. Como tal, un polímero de matriz reticulado tiene al menos un enlace intermolecular que une al menos una molécula individual de polímero con otra. Los polímeros de matriz divulgados en el presente documento pueden reticularse usando agentes de reticulación de dialdehídos y disulfuros que incluyen, sin limitación, agentes de reticulación multifuncionales basados en PEG, sulfonas de divinilo, éteres de diglicidilo y bis-epóxidos. Los ejemplos no limitativos de agentes de reticulación de hialuronano incluyen sulfona de divinilo (DVS), éter de diglicidilo y 1,4-butanodiol (BDDE), 1,2-bis(2,3-epoxipropoxi)etileno (EGDGE), 1,2,7,8-diepoxioctano (DEO), biscarbodiimida (BCDI), éter de pentaeritritol y tetraglicidilo (PETGE), dihidrazida adípica (ADH), bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS), hexametilendiamina (HMDA), 1-(2,3-epoxipropil)-2,3-epoxiciclohexano o combinaciones de los mismos.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, una composición que comprende un polímero de matriz reticulado que tiene un grado de reticulación. Tal como se usa en el presente documento, el término "grado de reticulación" se refiere al porcentaje de unidades monoméricas de polímero de matriz que están unidas a un agente de reticulación, tal como, por ejemplo, las unidades monoméricas de disacárido del hialuronano. Por tanto, una composición que tiene un polímero de matriz reticulado con un grado de reticulación del 4% significa que, en promedio, hay cuatro moléculas de reticulación por cada 100 unidades monoméricas. Manteniendo igual cualquier otro parámetro, cuanto mayor sea el grado de reticulación, más duro se vuelve el gel. Los ejemplos no limitativos de grado de reticulación incluyen de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 15%.

En una realización, una composición comprende un hialuronano no reticulado en la que el hialuronano no reticulado comprende una combinación tanto de hialuronano de alto peso molecular como de hialuronano de bajo peso molecular en una proporción de aproximadamente 20:1, aproximadamente 15:1, aproximadamente 10:1,

aproximadamente 5:1, aproximadamente 1:1, aproximadamente 1:5 aproximadamente 1:10, aproximadamente 1:15 o aproximadamente 1:20.

En otra realización, una composición comprende un hialuronano no reticulado en la que el hialuronano no reticulado comprende una combinación tanto de hialuronano de alto peso molecular como de hialuronano de bajo peso molecular, en diversas proporciones. Tal como se usa en el presente documento, el término "hialuronano de alto peso molecular" se refiere a un polímero de hialuronano que tiene un peso molecular de 1.000.000 Da o mayor. Los ejemplos no limitativos de un hialuronano de alto peso molecular incluyen un hialuronano de aproximadamente 1.500.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 2.000.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 2.500.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 3.000.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 3.500.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 4.000.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 4.500.000 Da y un hialuronano de aproximadamente 5.000.000 Da. Tal como se usa en el presente documento, el término "hialuronano de bajo peso molecular" se refiere a un polímero de hialuronano que tiene un peso molecular de menos de 1.000.000 Da. Los ejemplos no limitativos de un hialuronano de bajo peso molecular incluyen un hialuronano de aproximadamente 200.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 300.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 400.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 500.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 600.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 700.000 Da, un hialuronano de aproximadamente 800.000 Da y un hialuronano de aproximadamente 900.000 Da.

En otros aspectos de esta realización, una composición comprende un hialuronano reticulado en la que el hialuronano reticulado tiene un peso molecular medio de, por ejemplo, aproximadamente 1.000.000 Da, aproximadamente 1.500.000 Da, aproximadamente 2.000.000 Da, aproximadamente 2.500.000 Da, aproximadamente 3.000.000 Da, aproximadamente 3.500.000 Da, aproximadamente 4.000.000 Da, aproximadamente 4.500.000 Da o aproximadamente 5.000.000 Da. En aún otros aspectos de esta realización, una composición comprende un hialuronano reticulado en la que el hialuronano reticulado tiene un peso molecular medio de, por ejemplo, al menos 1.000.000 Da, al menos 1.500.000 Da, al menos 2.000.000 Da, al menos 2.500.000 Da, al menos 3.000.000 Da, al menos 3.500.000 Da, al menos 4.000.000 Da, al menos 4.500.000 Da o al menos 5.000.000 Da. En todavía otros aspectos de esta realización, una composición comprende un hialuronano reticulado en la que el hialuronano reticulado tiene un peso molecular medio de, por ejemplo, aproximadamente 1.000.000 Da a aproximadamente 5.000.000 Da, de aproximadamente 1.500.000 Da a aproximadamente 5.000.000 Da, de aproximadamente 2.000.000 Da a aproximadamente 5.000.000 Da, de aproximadamente 2.500.000 Da a aproximadamente 5.000.000 Da, de aproximadamente 2.000.000 Da a aproximadamente 3.000.000 Da, de aproximadamente 2.500.000 Da a aproximadamente 3.500.000 Da o de aproximadamente 2.000.000 Da a aproximadamente 4.000.000 Da.

En otros aspectos de esta realización, una composición comprende un hialuronano no reticulado en la que el hialuronano no reticulado tiene un peso molecular medio de, por ejemplo, aproximadamente 1.000.000 Da, aproximadamente 1.500.000 Da, aproximadamente 2.000.000 Da, aproximadamente 2.500.000 Da, aproximadamente 3.000.000 Da, aproximadamente 3.500.000 Da, aproximadamente 4.000.000 Da, aproximadamente 4.500.000 Da o aproximadamente 5.000.000 Da. En aún otros aspectos de esta realización, una composición comprende un hialuronano no reticulado en la que el hialuronano no reticulado tiene un peso molecular medio de, por ejemplo, al menos 1.000.000 Da, al menos 1.500.000 Da, al menos 2.000.000 Da, al menos 2.500.000 Da, al menos 3.000.000 Da, al menos 3.500.000 Da, al menos 4.000.000 Da, al menos 4.500.000 Da o al menos 5.000.000 Da. En todavía otros aspectos de esta realización, una composición comprende un hialuronano no reticulado en la que el hialuronano no reticulado tiene un peso molecular medio de, por ejemplo, aproximadamente 1.000.000 Da a aproximadamente 5.000.000 Da, de aproximadamente 1.500.000 Da a aproximadamente 5.000.000 Da, de aproximadamente 2.000.000 Da a aproximadamente 5.000.000 Da, de aproximadamente 2.500.000 Da a aproximadamente 5.000.000 Da, de aproximadamente 2.000.000 Da a aproximadamente 3.000.000 Da, de aproximadamente 2.500.000 Da a aproximadamente 3.500.000 Da o de aproximadamente 2.000.000 Da a aproximadamente 4.000.000 Da. En aspectos adicionales, una composición comprende un hialuronano no reticulado en la que el hialuronano no reticulado tiene un peso molecular medio de, por ejemplo, mayor que 2.000.000 Da y menor que aproximadamente 3.000.000 Da, mayor que 2.000.000 Da y menor que aproximadamente 3.500.000 Da, mayor que 2.000.000 Da y menor que aproximadamente 4.000.000 Da, mayor que 2.000.000 Da y menor que aproximadamente 4.500.000 Da, mayor que 2.000.000 Da y menor que aproximadamente 5.000.000 Da.

Una composición divulgada en el presente documento comprende una fase de gel que incluye un componente o una partícula de hidrogel de fibroína de seda y un componente o una partícula de hidrogel de polímero de matriz. En aspectos de esta realización, la cantidad en porcentaje de hidrogel de fibroína de seda presente en una composición en relación con el hidrogel de polímero de matriz es de desde aproximadamente el 0,1% (v/v) hasta aproximadamente el 25% (v/v). En aspectos de esta realización, la cantidad en porcentaje de hidrogel de polímero de matriz presente en una composición en relación con el hidrogel de fibroína de seda es de desde aproximadamente el 99,9% (v/v) hasta aproximadamente el 75% (v/v). En aspectos de esta realización, la proporción de hidrogel de fibroína de seda con respecto al hidrogel de polímero de matriz en la fase de gel de una composición comprende, por ejemplo, aproximadamente el 0,1% (v/v) de hidrogel de fibroína de seda y aproximadamente el 99,9% (v/v) de hidrogel de polímero de matriz, aproximadamente el 1% (v/v) de hidrogel de fibroína de seda y aproximadamente el 99% (v/v) de hidrogel de polímero de matriz, aproximadamente el 5% (v/v) de

hidrogel de fibroína de seda y aproximadamente el 95% (v/v) de hidrogel de polímero de matriz, aproximadamente el 10% (v/v) de hidrogel de fibroína de seda y aproximadamente el 90% (v/v) de hidrogel de polímero de matriz, aproximadamente el 15% (v/v) de hidrogel de fibroína de seda y aproximadamente el 85% (v/v) de hidrogel de polímero de matriz, aproximadamente el 20% (v/v) de hidrogel de fibroína de seda y aproximadamente el 80% (v/v) de hidrogel de polímero de matriz o aproximadamente el 25% (v/v) de hidrogel de fibroína de seda y aproximadamente el 75% (v/v) de hidrogel de polímero de matriz.

Una composición divulgada en el presente documento puede comprender una fase de gel en la que el componente de hidrogel de fibroína de seda y el componente de hidrogel de polímero de matriz se tratan por separado. Los materiales de hidrogel tratados resultantes, por ejemplo, partículas de hidrogel de ambos tipos, se mezclan luego juntas, tal como, por ejemplo, después de una etapa de molienda y/o después de la rehomogeneización en una fase de portador, para formar la composición final. Además, un polímero de matriz puede mezclarse inicialmente con una disolución de fibroína de seda despolimerizada, produciéndose la posterior polimerización sólo después de la terminación de la etapa de mezclado para formar un hidrogel compuesto integrado de polímero de matriz/fibroína de seda. De manera similar, la fibroína de seda y los polímeros de matriz pueden unirse juntos para formar un compuesto de hidrogel que luego se trata posteriormente en la fase de gel de la composición. Tal unión puede producirse mediante un método habitual de reticulación o mediante la unión del polímero de matriz al hidrogel de fibroína de seda a través de un grupo de unión peptídico divulgado en el presente documento, tal como, por ejemplo, una "cola" peptídica de cinco aminoácidos y una molécula sintética. Tal como se divulga en el presente documento, una composición puede comprender una fase de gel que comprende tanto los componentes de hidrogel tratados por separado así como las partículas de los compuestos de hidrogel.

Como ejemplo no limitativo, una disolución que comprende de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 30% de fibroína de seda despolimerizada puede mezclarse con de aproximadamente 6 mg/g a aproximadamente 30 mg/g de hialuronano que tiene un grado de reticulación de desde el 0 hasta aproximadamente el 17% en la que el porcentaje en peso del componente de la fibroína de seda es desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 75%. Como otro ejemplo no limitativo, las partículas de hidrogel que comprenden desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 8% de fibroína de seda se mezclan con partículas de hidrogel que comprenden de aproximadamente 6 mg/g hasta aproximadamente 30 mg/g de hialuronano que tiene un grado de reticulación de desde el 0 hasta aproximadamente el 17% en las que el porcentaje en peso del componente de la fibroína de seda es desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 75%. Como aún otro ejemplo no limitativo, una composición de hidrogel que comprende partículas de hidrogel que comprenden desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 8% de fibroína de seda mezclada junto con una fase de portador (de aproximadamente el 20% (v/v) hasta aproximadamente el 50% (v/v)) se mezcla con una composición de hidrogel que comprende partículas de hidrogel que comprenden de aproximadamente 6 mg/g hasta aproximadamente 30 mg/g de hialuronano que tiene un grado de reticulación de desde el 0 hasta aproximadamente el 17% en la que el porcentaje en peso del componente de la fibroína de seda es desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 75%.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, una composición que comprende un componente o una partícula de hidrogel de fibroína de seda y un componente o una partícula de hidrogel de polímero de matriz que tiene opacidad. La opacidad es la medición de la impenetrabilidad a la radiación electromagnética o de otras clases, especialmente luz visible. Un objeto opaco no es transparente (que permite que toda la luz pase a través) ni translúcido (que permite que pase algo de luz a través). En determinadas aplicaciones, sería una ventaja tener una composición opaca. Por ejemplo, en aplicaciones en las que una composición divulgada en el presente documento se administra a una región superficial, una composición opaca proporciona coloración y apariencia de piel suprayacente.

En una realización, una composición que comprende un hidrogel de fibroína de seda y una matriz polimérica es ópticamente opaca. En aspectos de esta realización, una composición que comprende un hidrogel de fibroína de seda y una matriz polimérica transmite, por ejemplo, de aproximadamente el 5% de la luz a aproximadamente el 70% de la luz. En algunos aspectos preferidos de esta realización, una composición que comprende un hidrogel de fibroína de seda y una matriz polimérica transmite, por ejemplo, de aproximadamente el 10% de la luz a aproximadamente el 65% de la luz. En los aspectos más preferidos de esta realización, una composición que comprende un hidrogel de fibroína de seda y una matriz polimérica transmite, por ejemplo, de aproximadamente el 15% de la luz a aproximadamente el 60% de la luz.

En aspectos de esta realización, una composición que comprende un hidrogel de fibroína de seda y una matriz polimérica muestra, por ejemplo, de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 100% de reducción en el efecto Tyndall. En algunos aspectos preferidos de esta realización, una composición que comprende un hidrogel de fibroína de seda y una matriz polimérica muestra, por ejemplo, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 95% de reducción en el efecto Tyndall. En los aspectos más preferidos de esta realización, una composición que comprende un hidrogel de fibroína de seda y una matriz polimérica muestra, por ejemplo, de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 90% de reducción en el efecto Tyndall.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, una composición divulgada en el presente

documento que muestra una viscosidad dinámica. La viscosidad es la resistencia de un líquido al corte o al flujo provocada por o bien la tensión de corte o bien la tensión de tracción. La viscosidad describe la resistencia interna de un líquido al flujo provocada por fricción intermolecular ejercida cuando las capas los líquidos intentan deslizarse por cualquier otra y puede pensarse como una medida de la fricción del líquido. Cuanto menos viscoso es el líquido, mayor es su facilidad de movimiento (fluidez).

La viscosidad puede definirse de dos maneras; viscosidad dinámica (μ , aunque a veces se usa η) o viscosidad cinemática (ν). La viscosidad dinámica, también conocida como viscosidad absoluta o compleja, es la fuerza tangencial por área unitaria requerida para mover un plano horizontal con respecto a otro a velocidad unitaria cuando se mantiene una distancia unitaria aparte por el líquido. La unidad física del SI de la viscosidad dinámica es el Pascal-segundo (Pa·s), que es idéntico a $\text{N}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}$. La viscosidad dinámica puede expresarse como $\tau = \mu \, dvx/dz$, en la que τ = tensión de corte, μ = viscosidad dinámica y dvx/dz es el gradiente de velocidad a lo largo del tiempo. Por ejemplo, si un líquido con una viscosidad de un Pa·s se sitúa entre dos placas, y una placa se empuja lateralmente con una tensión de corte de un Pascal, se mueve una distancia igual al grosor de la capa entre las placas en un segundo. También se usa la viscosidad dinámica simbolizada por, se mide con diversos tipos de reómetros, dispositivos usados para medir la manera en la que un líquido, una suspensión o suspensión espesa fluye en respuesta a las fuerzas aplicadas.

La viscosidad cinemática (ν) es la razón de viscosidad dinámica con respecto a la densidad, una cantidad en la que ninguna fuerza está implicada y se define tal como sigue: $\nu = \mu/\rho$, en la que μ es la viscosidad dinámica y ρ es la densidad con la unidad del SI de kg/m^3 . La viscosidad cinemática se mide normalmente mediante un viscosímetro capilar de vidrio cuando tiene una unidad del SI de m^2/s .

La viscosidad de un líquido es altamente dependiente de la temperatura y para que o bien la viscosidad dinámica o bien la viscosidad cinemática sean significativas, debe indicarse la temperatura de referencia. Para los valores de viscosidad divulgados en el presente documento, una viscosidad dinámica se mide a 1 Pa con una geometría de cono/plano de $2^\circ/40$ cm y a una temperatura de 20°C . Los ejemplos de la viscosidad dinámica de diversos líquidos a 20°C es tal como sigue: el agua es aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ Pa·s, la sangre es aproximadamente $3-4 \times 10^{-3}$ Pa·s, el aceite vegetal es aproximadamente $60-85 \times 10^{-3}$ Pa·s, el aceite de motor SE 30 es aproximadamente 0,2 Pa·s, la glicerina es aproximadamente 1,4 Pa·s, el sirope de arce es aproximadamente 2-3 Pa·s, la miel es aproximadamente 10 Pa·s, el sirope de chocolate es aproximadamente 10-25 Pa·s, la mantequilla de cacahuete es aproximadamente 150-250 Pa·s, la manteca es aproximadamente 1.000 Pa·s, la manteca vegetal es aproximadamente 1.200 Pa·s y el alquitrán es aproximadamente 30.000 Pa·s.

En aspectos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento muestra una viscosidad dinámica de, por ejemplo, aproximadamente 10 Pa·s a aproximadamente 1.200 Pa·s. En algunos aspectos preferidos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento muestra una viscosidad dinámica de, por ejemplo, aproximadamente 20 Pa·s a aproximadamente 1.100 Pa·s. En los aspectos más preferidos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento muestra una viscosidad dinámica de, por ejemplo, aproximadamente 30 Pa·s a aproximadamente 1.000 Pa·s.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, una composición divulgada en el presente documento que es inyectable. Tal como se usa en el presente documento, el término "inyectable" se refiere a un material que tiene las propiedades necesarias para administrar la composición a una región de la piel de un individuo usando un dispositivo de inyección con una aguja fina. Tal como se usa en el presente documento, el término "aguja fina" se refiere a una aguja que es de calibre 27 o menor. La inyectabilidad de una composición divulgada en el presente documento puede lograrse dimensionando las partículas de hidrogel tal como se comentó anteriormente.

En un aspecto de esta realización, una composición divulgada en el presente documento puede inyectarse a través de una aguja fina. En otros aspectos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento puede inyectarse a través de una aguja de, por ejemplo, aproximadamente calibre 27, aproximadamente calibre 30, o aproximadamente calibre 32. En aún otros aspectos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento puede inyectarse a través de una aguja de, por ejemplo, calibre 27 o menor, calibre 30 o menor, o calibre 32 o menor. En todavía otros aspectos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento puede inyectarse a través de una aguja de, por ejemplo, aproximadamente calibre 27 a aproximadamente calibre 32.

En aspectos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento puede inyectarse con una fuerza de extrusión de aproximadamente 60 N a aproximadamente 5 N o menos. En algunos aspectos preferidos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento puede inyectarse con una fuerza de extrusión de aproximadamente 55 N a aproximadamente 10 N o menos. En los aspectos más preferidos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento puede inyectarse con una fuerza de extrusión de aproximadamente 50 N a aproximadamente 15 N o menos.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, una composición divulgada en el presente documento que muestra cohesión. La cohesión o atracción cohesiva, fuerza cohesiva o fuerza de compresión es

una propiedad física de un material, provocada por la atracción intermolecular entre moléculas similares dentro del material que actúa para unir a las moléculas. Una composición debe ser suficientemente cohesiva para mantenerse localizada en el sitio de administración. De manera adicional, en determinadas aplicaciones, una cohesión suficiente es importante para que una composición mantenga su forma, y por tanto su funcionalidad, en el caso de ciclos de carga mecánica. Como tal, en una realización, una composición muestra una fuerte atracción cohesiva, a la par con agua. En otra realización, una composición muestra baja atracción cohesiva. En aún otra realización, una composición muestra suficiente atracción cohesiva para mantenerse localizada en el sitio de administración. En todavía otra realización, una composición muestra suficiente atracción cohesiva para mantener su forma. En una realización adicional, una composición muestra suficiente atracción cohesiva para mantener su forma y su funcionalidad.

En aspectos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento tiene una fuerza de compresión de aproximadamente 10 gramos-fuerza a aproximadamente 3000 gramos-fuerza. En algunos aspectos preferidos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento tiene una fuerza de compresión de aproximadamente 20 gramos-fuerza a aproximadamente 2000 gramos-fuerza. En lo más preferido de esta realización, una composición divulgada en el presente documento tiene una fuerza de compresión de aproximadamente 30 gramos-fuerza a aproximadamente 1000 gramos-fuerza.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, un método para tratar un estado de tejido blando de un individuo administrando una composición divulgada en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a reducir o eliminar en un individuo un síntoma cosmético o clínico de un estado de tejido blando caracterizado por una imperfección, un defecto, una enfermedad y/o un trastorno de tejido blando; o retrasar o prevenir en un individuo la aparición de un síntoma cosmético o clínico de un estado caracterizado por una imperfección, un defecto, una enfermedad y/o un trastorno de tejido blando. Por ejemplo, el término "tratar" puede significar reducir un síntoma de un estado caracterizado por un defecto, una enfermedad y/o un trastorno de tejido blando en, por ejemplo, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100%. La eficacia de un compuesto divulgado en el presente documento para tratar un estado caracterizado por un defecto, una enfermedad y/o un trastorno de tejido blando puede determinarse observando uno o más síntomas cosméticos o clínicos y/o indicadores fisiológicos asociados con el estado. Una mejora en un defecto, una enfermedad y/o un trastorno de tejido blando puede indicarse también mediante una necesidad reducida de una terapia concurrente. Los expertos en la técnica conocerán los síntomas o indicadores apropiados asociados con un defecto, una enfermedad y/o un trastorno de tejido blando específico y conocerán cómo determinar si un individuo es un candidato para el tratamiento con un compuesto o una composición divulgada en el presente documento.

Se administra una composición o un compuesto a un individuo. Un individuo es normalmente un ser humano. Normalmente, cualquier individuo que es un candidato para un procedimiento convencional para tratar un estado de tejido blando es un candidato para un método divulgado en el presente documento. Además, las composiciones y los métodos divulgados actualmente pueden aplicarse a individuos que busquen un aumento de tamaño pequeño/moderado, un cambio de forma o una alteración del contorno de una región o parte del cuerpo, que puede no ser técnicamente posible o estéticamente aceptable con la tecnología existente de implantes de tejido blando. La evaluación antes de la operación normalmente incluye la historia clínica y el examen físico además del consentimiento informado exhaustivo divulgando todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento.

La composición y los métodos divulgados en el presente documento son útiles para tratar un estado de tejido blando. Un estado de tejido blando incluye, sin limitación, una imperfección, un defecto, una enfermedad y/o un trastorno de tejido blando. Los ejemplos no limitativos de un estado de tejido blando incluyen imperfección, defecto, enfermedad y/o trastorno de mama, tal como, por ejemplo, un aumento de mama, una reconstrucción de mama, mastopexia, micromastia, hipoplasia torácica, síndrome de Poland, defectos debidos a complicaciones del implante como contracción y/o ruptura capsular; una imperfección, un defecto, una enfermedad o un trastorno facial, tal como, por ejemplo, un aumento facial, una reconstrucción facial, síndrome de Parry-Romberg, lupus eritematoso profundo, cicatrices deprimidas dérmicas, mejillas hundidas, labios delgados, imperfecciones o defectos nasales, imperfecciones o defectos retroorbitales, un pliegue, una línea y/o arruga facial como una línea glabellar, una línea nasolabial, una línea perioral, y/o una línea de marioneta, y/u otras deformidades de contorno o imperfecciones de la cara; una imperfección, un defecto, una enfermedad o un trastorno del cuello; una imperfección, un defecto, una enfermedad y/o un trastorno de la piel; otras imperfecciones, defectos, enfermedades y/o trastornos de tejido blando, tales como, por ejemplo, un aumento o una reconstrucción de la parte superior del brazo, parte inferior del brazo, mano, hombro, espalda, torso incluyendo abdomen, nalgas, parte superior de la pierna, parte inferior de la pierna incluyendo pantorrillas, pie incluyendo almohadilla grasa plantar, ojo, genitales, u otra parte, región o área del cuerpo, o una enfermedad o trastorno que afecta a estas partes, regiones o áreas del cuerpo; incontinencia urinaria, incontinencia fecal, otras formas de incontinencia; y enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE).

La cantidad de una composición usada con cualquiera de los métodos tal como se divulga en el presente documento se determinará normalmente basándose en la alteración y/o mejora deseada, la reducción y/o eliminación deseada de un síntoma de estado de tejido blando, el efecto clínico y/o cosmético deseado por el individuo y/o médico, y la parte o región del cuerpo que va a tratarse. La eficacia de la administración de la composición puede manifestarse

mediante una o más de las siguientes medidas clínicas y/o cosméticas: forma de tejido blando alterada y/o mejorada, tamaño de tejido blando alterado y/o mejorado, contorno de tejido blando alterado y/o mejorado, función del tejido alterada y/o mejorada, soporte de crecimiento de tejido y/o nueva deposición de colágeno, injerto sostenido de la composición, satisfacción y/o calidad de vida mejorada del paciente, y uso disminuido de material implantable extraño.

Por ejemplo, para procedimientos de aumento de mama, la eficacia de las composiciones y los métodos puede manifestarse mediante una o más de las siguientes medidas clínicas y/o cosméticas: tamaño de mama aumentado, forma de mama alterada, contorno de mama alterado, injerto sostenido, reducción en el riesgo de contracción capsular, tasa disminuida de formación de quistes liponecróticos, satisfacción y/o calidad de vida del paciente mejorada, y uso disminuido de implantes de mama.

Como otro ejemplo, la eficacia de las composiciones y los métodos para tratar un tejido blando facial puede manifestarse mediante una o más de las siguientes medidas clínicas y/o cosméticas: tamaño, forma y/o contorno aumentado de un rasgo facial como tamaño, forma y/o contorno aumentado de una región del labio, la mejilla o el ojo; tamaño, forma y/o contorno alterado de un rasgo facial como tamaño, forma y/o contorno alterado una forma de la región del labio, la mejilla o el ojo; reducción o eliminación de una arruga, pliegue o línea en la piel; resistencia a una arruga, un pliegue o una línea en la piel; rehidratación de la piel; elasticidad aumentada para la piel; reducción o eliminación de una rugosidad de la piel; firmeza de la piel aumentada y/o mejorada; reducción o eliminación de líneas de estiramiento o estrías; tono, resplandor, brillo y/o luminosidad de la piel aumentado y/o mejorado; color de la piel aumentado y/o mejorado, reducción o eliminación de la palidez de la piel; injerto sostenido de la composición; efectos secundarios disminuidos; satisfacción y/o calidad de vida del paciente mejorada.

La cantidad de una composición usada con cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento será normalmente una cantidad terapéuticamente eficaz. Tal como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" es sinónimo de "cantidad eficaz", "dosis terapéuticamente eficaz" y/o "dosis eficaz", y se refiere a la cantidad de compuesto que provocará la respuesta biológica, cosmética o clínica que el médico está buscando en un individuo que lo necesita. Como ejemplo no limitativo, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para lograr una o más de las medidas clínicas y/o cosméticas divulgadas en el presente documento. La cantidad eficaz apropiada que va a administrarse para una aplicación particular de los métodos divulgados puede determinarla los expertos en la técnica, usando la guía proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede extrapolarse de ensayos *in vitro* e *in vivo* tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Un experto en la técnica reconocerá que el estado del individuo puede monitorizarse a lo largo del transcurso de la terapia y que la cantidad eficaz de una composición divulgada en el presente documento que se administra puede ajustarse en consecuencia.

En aspectos de esta realización, la cantidad de una composición administrada es, por ejemplo, 0,01 g, 0,05 g, 0,1 g, 0,5 g, 1 g, 5 g, 10 g, 20 g, 30 g, 40 g, 50 g, 60 g, 70 g, 80 g, 90 g, 100 g, 150 g ó 200 g. En otros aspectos de esta realización, la cantidad de una composición administrada es, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 g a aproximadamente 0,1 g, de aproximadamente 0,1 g a aproximadamente 1 g, de aproximadamente 1 g a aproximadamente 10 g, de aproximadamente 10 g a aproximadamente 100 g, o de aproximadamente 50 g a aproximadamente 200 g. En aún otros aspectos de esta realización, la cantidad de una composición administrada es, por ejemplo, 0,01 ml, 0,05 ml, 0,1 ml, 0,5 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml, 60 ml, 70 g, 80 ml, 90 ml, 100 ml, 150 ml ó 200 ml. En otros aspectos de esta realización, la cantidad de una composición administrada es, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 ml a aproximadamente 0,1 ml, de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 1 ml, de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, de aproximadamente 10 ml a aproximadamente 100 ml, o de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 200 ml.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, administrar una composición divulgada en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, el término "administrar" significa cualquier mecanismo de administración que proporciona una composición divulgada en el presente documento a un individuo que potencialmente da como resultado un resultado beneficioso clínica, terapéutica o experimentalmente. El mecanismo de administración actual usado para administrar una composición a un individuo puede determinarlo un experto habitual en la técnica teniendo en cuenta factores que incluyen, sin limitación, el tipo de estado cutáneo, la localización del estado cutáneo, la causa del estado cutáneo, la gravedad del estado cutáneo, el grado de alivio deseado, la duración del alivio deseado, la composición particular usada, la tasa de excreción de la composición particular usada, la farmacodinámica de la composición particular usada, la naturaleza de los otros compuestos incluidos en la composición particular usada, la vía particular de administración, las características particulares, la historia clínica y los factores de riesgo del individuo, tales como, por ejemplo, edad, peso, salud general y similares, o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto de esta realización, una composición divulgada en el presente documento se administra a una región de la piel de un individuo mediante inyección.

La vía de administración de la composición administrada a un paciente individual se determinará normalmente basándose en el efecto cosmético y/o clínico deseado por el individuo y/o médico y la parte o región del cuerpo que va a tratarse. Una composición divulgada en el presente documento puede administrarse mediante cualquier medio conocido por expertos habituales en la técnica incluyendo, sin limitación, jeringa con aguja, catéter, de manera

tópica o mediante implante quirúrgico directo. La composición divulgada en el presente documento puede administrarse a una región de la piel tal como, por ejemplo, una región dérmica o una región hipodérmica. Además, una composición divulgada en el presente documento puede administrarse una vez o a lo largo de una pluralidad de veces. Finalmente, la programación usada seguirá las normas asistenciales de calidad.

Para un procedimiento de reemplazo de tejido blando de mama, la vía de administración puede incluir las vías axilares, periareolares y/o inframamarias. Alternativamente o además, una composición puede administrarse a través de un enfoque subpectoral endoscópico transaxilar. Para un procedimiento de reemplazo de tejido blando facial, la vía de administración puede ser las vías frontales, temporales, cigomáticas, perioculares, mandibulares, periorales o de mentón. En procedimientos de incontinencia urinaria, la vía de administración puede incluir las vías transuretrales o periuretrales. Alternativamente o además, la administración puede administrarse a través de una vía anterógrada. Las vías comentadas en el presente documento no excluyen el uso de vías múltiples para lograr el efecto clínico deseado.

Los aspectos de la presente invención proporcionan, en parte, una región dérmica. Tal como se usa en el presente documento, el término “región dérmica” se refiere a la región de piel que comprende la unión epidérmica-dérmica y la dermis incluyendo la dermis superficial (región papilar) y la dermis profunda (región reticular). La piel se compone de tres capas principales: la epidermis, que proporciona impermeabilización y sirve como una barrera contra la infección; la dermis, que sirve como localización para los apéndices de piel; y la hipodermis (capa adiposa subcutánea). La epidermis no contiene vasos sanguíneos, y se nutre mediante difusión de la dermis. El principal tipo de células que constituyen la epidermis son queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merckels.

La dermis es la capa de piel de debajo de la epidermis que consiste en tejido conjuntivo y amortigua el cuerpo de la tensión y la deformación. La dermis está conectada firmemente a la epidermis mediante una membrana basal. También alberga muchas terminaciones mecanorreceptoras/nerviosas que proporcionan el sentido del tacto y el calor. Contiene los folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, glándulas apocrinas, vasos linfáticos y vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos en la dermis proporcionan la nutrición y la eliminación de residuos de sus propias células así como del estrato basal de la epidermis. La dermis se divide estructuralmente en dos áreas: un área superficial adyacente a la epidermis, denominada región papilar, y un área profunda más gruesa conocida como región reticular.

La región papilar se compone de tejido conjuntivo areolar suelto. Se llama así por sus proyecciones en forma de dedos llamadas papilas que se extienden a lo largo de la epidermis. Las papilas proporcionan a la dermis de una superficie “irregular” que se interdigita con la epidermis, fortaleciendo la conexión entre las dos capas de piel. La región reticular se encuentra profunda en la región papilar y normalmente es mucho más gruesa. Se compone de tejido conjuntivo irregular denso, y recibe su nombre de la concentración densa de fibras colagenosas, elásticas y reticulares que se entrelazan a lo largo de la misma. Estas fibras de proteína le dan a la dermis sus propiedades de fuerza, extensibilidad y elasticidad. También se localizan dentro de la región reticular las raíces del pelo, las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas, los receptores, las uñas y los vasos sanguíneos. La tinta de tatuaje se mantiene en la dermis. Las estrías del embarazo también se localizan en la dermis.

La hipodermis se encuentra debajo de la dermis. Su fin es unir la región dérmica de la piel al hueso y músculo subyacentes así como suministrarle vasos sanguíneos y nervios. Consiste en tejido conjuntivo suelto y elastina. Los principales tipos de células son fibroblastos, macrófagos y adipocitos (la hipodermis contiene el 50% de la grasa corporal). La grasa sirve como almohadillado y aislamiento para el cuerpo.

En un aspecto de esta realización, una composición divulgada en el presente documento se administra a una región de la piel de un individuo mediante inyección en una región dérmica o una región hipodérmica. En aspectos de esta realización, una composición divulgada en el presente documento se administra a una región dérmica de un individuo mediante inyección en, por ejemplo, una región de unión epidérmica-dérmica, una región papilar, una región reticular o cualquier combinación de las mismas.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan, en parte, un método para tratar un estado de tejido blando de un individuo, comprendiendo el método las etapas de administrar una composición divulgada en el presente documento a un sitio del estado de tejido blando del individuo, en la que la administración de la composición mejora el estado de tejido blando, tratándose así el estado de tejido blando. En aspectos de esta realización, un estado de tejido blando es un estado de tejido de mama, un estado de tejido facial, un estado de cuello, un estado cutáneo, un estado de la parte superior del brazo, un estado de la parte inferior del brazo, un estado de la mano, un estado del hombro, un estado de la espalda, un estado del torso incluyendo un estado abdominal, un estado del glúteo, un estado de la parte superior de la pierna, un estado de la parte inferior de la pierna incluyendo un estado de la pantorrilla, un estado del pie incluyendo un estado de la almohadilla grasa plantar, un estado del ojo, un estado genital o un estado que afecta a cualquier otra parte, región o área del cuerpo.

Otros aspectos de la presente memoria descriptiva divulgan, en parte, un método para tratar un estado cutáneo que comprende la etapa de administrar a un individuo que padece un estado cutáneo una composición divulgada en el

presente documento, en la que la administración de la composición mejora el estado cutáneo, tratándose así el estado cutáneo. En un aspecto de esta realización, un estado cutáneo es un método para tratar la deshidratación de la piel que comprende la etapa de administrar a un individuo que padece deshidratación de la piel una composición divulgada en el presente documento, en la que la administración de la composición rehidrata la piel, tratándose así la deshidratación de la piel. En otro aspecto de esta realización, un método para tratar una falta de elasticidad de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece de una falta de elasticidad de la piel una composición divulgada en el presente documento, en la que la administración de la composición aumenta la elasticidad de la piel, tratándose así una falta de elasticidad de la piel. En aún otro aspecto de esta realización, un método para tratar la rugosidad de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece rugosidad de la piel una composición divulgada en el presente documento, en la que la administración de la composición disminuye la rugosidad de la piel, tratándose así la rugosidad de la piel. En todavía otro aspecto de esta realización, un método para tratar una falta de firmeza de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece una falta de firmeza de la piel una composición divulgada en el presente documento, en la que la administración de la composición hace que la piel se vuelva más tensa, tratándose así una falta de firmeza de la piel.

En un aspecto adicional de esta realización, un método para tratar una línea de estiramiento o estría de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece una línea de estiramiento o estría de la piel una composición divulgada en el presente documento, en la que la administración de la composición reduce o elimina la línea de estiramiento o estría de la piel, tratándose así una línea de estiramiento o estría de la piel. En otro aspecto de esta realización, un método para tratar la palidez de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece de palidez de la piel una composición divulgada en el presente documento, en la que la administración de la composición aumenta el tono o la luminosidad de la piel, tratándose así la palidez de la piel. En otro aspecto de esta realización, un método para tratar arrugas de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo que padece arrugas de la piel una composición divulgada en el presente documento, en la que la administración de la composición reduce o elimina las arrugas de la piel, tratándose así las arrugas de la piel. En aún otro aspecto de esta realización, un método para tratar las arrugas de la piel comprende la etapa de administrar a un individuo una composición divulgada en el presente documento, en la que la administración de la composición hace que la piel se vuelva resistente a las arrugas de la piel, tratándose así las arrugas de la piel.

Los aspectos de la presente memoria descriptiva proporcionan, en parte, la administración de una composición divulgada en el presente documento en la que tal administración promueve la nueva deposición de colágeno. Las composiciones que comprenden un componente o una partícula de hidrogel de fibroína de seda y un componente o una partícula de hidrogel de polímero de matriz apoyan el crecimiento del tejido y la nueva deposición de colágeno (ejemplo 21).

En una realización, la administración de una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hidrogel de polímero de matriz tal como se divulga en el presente documento aumenta la nueva deposición de colágeno. En aspectos de esta realización, la administración de una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hidrogel de polímero de matriz tal como se divulga en el presente documento aumenta la nueva deposición de colágeno en aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o aproximadamente el 100%, en relación a la misma o similar composición que comprende el componente de hidrogel de polímero de matriz, pero carece del componente de hidrogel de fibroína de seda. En otros aspectos de esta realización, la administración de una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hidrogel de polímero de matriz tal como se divulga en el presente documento aumenta la nueva deposición de colágeno en al menos el 25%, al menos el 50%, al menos el 75%, al menos el 100%, al menos el 125%, al menos el 150%, al menos el 175%, al menos el 200%, al menos el 225%, al menos el 250%, al menos el 275% o al menos el 300%, en relación a la misma o similar composición que comprende el componente de hidrogel de polímero de matriz, pero carece del componente de hidrogel de fibroína de seda. En aún otros aspectos de esta realización, la administración de una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hidrogel de polímero de matriz tal como se divulga en el presente documento aumenta la nueva deposición de colágeno en de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 100%, de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 150%, de aproximadamente el 100% a aproximadamente el 200%, de aproximadamente el 150% a aproximadamente el 250%, de aproximadamente el 200% a aproximadamente el 300%, de aproximadamente el 350% a aproximadamente el 450%, de aproximadamente el 400% a aproximadamente el 500%, de aproximadamente el 550% a aproximadamente el 650%, de aproximadamente el 600% a aproximadamente el 700%, en relación a la misma o similar composición que comprende el componente de hidrogel de polímero de matriz, pero carece del componente de hidrogel de fibroína de seda.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones representativas ahora contempladas, pero no deben interpretarse como que limitan la fibroína de seda purificada y el método para purificar tales fibroínas de seda, los hidrogeles que comprenden tal fibroína de seda con o sin un péptido anfifílico y los métodos para elaborar hidrogeles que comprenden tal fibroína de seda y el uso de hidrogeles de fibroína de seda en una variedad de usos médicos

divulgados, que incluyen, sin limitación, materiales de relleno para espacios de tejido, plantillas para la reconstrucción o regeneración de tejido, andamios para células en aplicaciones de diseño por ingeniería en tejidos y para modelos de enfermedad, un recubrimiento superficial para mejorar la función del dispositivo médico o como plataforma para la administración de fármacos.

Ejemplo 1

Preparación de una disolución de fibroína de seda soluble en agua

Se preparó una disolución de LiBr 9,3 M disolviendo lentamente 77,54 g de LiBr en 76,28 ml de agua MilliQ. Se mantuvo la disolución de LiBr a 60°C. Se sumergieron lentamente 24 g de hilo de seda de gusano de seda de punto extraídos con sericina en la disolución de LiBr. Se incubaron las disoluciones de LiBr y seda en un horno a 60°C durante 6 horas. Luego se cargó la disolución en un casete de diálisis MWCO 3,5 KDa y se dializó frente a agua MilliQ en un vaso de precipitados de 4 l a temperatura ambiente durante 72 horas, cambiando el agua a 1 hora, 4 horas, 12 horas y luego dos veces al día.

Ejemplo 2

Gel reticulado del 80% de HA-el 20% de fibroína de seda elaborado usando química de EDC y HMDA

Se añadieron 1,2 ml de una disolución en agua MilliQ de fibroína de seda (SF) al 7% en peso y 20 mg del reticulante de diamina HMDA.2HCl a 13,8 ml de agua MilliQ. Se añadieron 336 mg de ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular a la disolución. Se dejó hidratar la mezcla durante 60 minutos y se homogeneizó pasando 30 veces de jeringa a jeringa. Se mezclaron 576 mg de tampón MES con 321,6 mg de EDC y 72,9 mg de sulfonHS en 5 ml de agua MilliQ. Se mezcló la disolución de reactivos con la disolución de HA/SF pasando 30 veces entre jeringas. Se transfirió la mezcla a viales de vidrio y se dejaron reaccionar durante la noche a 4°C. Se dimensionó el tamaño del gel usando una malla de 100 μ m y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió el gel con el tamaño dimensionado a un tubo de diálisis de membrana de éster de celulosa MWCO 20 KDa y se dializó frente a 1 X PBS durante 8 días a temperatura ambiente, cambiando el tampón dos veces al día. Después de la diálisis, se dimensionó el tamaño del gel usando una malla de 60 μ m, se dispensó en jeringas COC de 1 ml, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se esterilizó con calor húmedo durante 5 minutos a 128°C.

Ejemplo 3

Gel del 80% de HA-el 20% de fibroína de seda reticulado usando química de EDC y éster metílico de lisina

Se añadieron 1,2 ml de una disolución en agua MilliQ de fibroína de seda (SF) al 7% en peso y 24,4 mg de éster metílico de lisina a 13,8 ml de agua MilliQ. Se añadieron 336 mg de ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular a la disolución. Se dejó hidratar la mezcla durante 60 minutos y se homogeneizó pasando 30 veces de jeringa a jeringa. Se mezclaron 576 mg de tampón MES con 321,6 mg de EDC y 72,9 mg de sulfonHS en 5 ml de agua MilliQ. Se mezcló la disolución de reactivos con la disolución de HA/SF pasando 30 veces entre jeringas. Se transfirió la mezcla a viales de vidrio y se dejaron reaccionar durante la noche a 4°C. Se dimensionó el tamaño del gel usando una malla de 100 μ m y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió el gel con el tamaño dimensionado a un tubo de diálisis de membrana de éster de celulosa MWCO 20 KDa y se dializó frente a 1 X PBS durante 8 días a temperatura ambiente, cambiando el tampón dos veces al día. Después de la diálisis, se dimensionó el tamaño del gel usando una malla de 60 μ m, se dispensó en jeringas COC de 1 ml, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se esterilizó con calor húmedo durante 5 minutos a 128°C.

Ejemplo 4

Gel del 80% HA-el 20% SF reticulado usando BDDE

Se añadieron 2,4 ml de una disolución en agua MilliQ de fibroína de seda (SF) al 7% en peso y 1,25 ml de una disolución en agua MilliQ de NaOH 1 N a 1,35 ml de agua MilliQ. Se añadieron 494 mg de HA de HMW a la disolución de SF/NaOH y se dejó hidratar durante 60 minutos y se homogeneizó pasando 30 veces de jeringa a jeringa. Se añadieron 85 mg de BDDE a la mezcla y se pasó 30 veces entre jeringas. Se curó la mezcla en un baño de agua a 50°C durante 2 horas. Se neutralizó el gel añadiendo 135 μ l de HCl al 37% y 4,86 ml de PBS y se pasó 30 veces entre jeringas. Se añadieron 7,5 ml de PBS al gel y se dejó que el gel se hinchara durante la noche a 4°C. La concentración final de HA/SF del gel fue de aproximadamente el 5% en peso. Se dimensionó el tamaño del gel usando una malla de 100 μ m y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Se transfirió el gel con el tamaño dimensionado a un tubo de diálisis de membrana de éster de celulosa MWCO 20 KDa y se dializó frente a 1 X PBS durante 8 días a temperatura ambiente, cambiando el tampón dos veces al día. Después de la diálisis, se dimensionó el tamaño del gel usando una malla de 60 μ m, se dispensó en jeringas COC de 1 ml, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y se esterilizó con calor húmedo durante 5 minutos a 128°C.

Ejemplo 5

Reología del gel de HA-SF

- 5 Se usó un reómetro de placas paralelas oscilatorias (Anton Paar Physica MCR 301) para medir las propiedades reológicas de los geles. Se usó un diámetro de placa de 25 mm a una altura de espacio de 1 mm. Se realizaron las mediciones a una temperatura constante de 25°C. Cada medida consistió en un barrido de frecuencias desde 1 hasta 10 Hz a una deformación constante del 2% y un aumento logarítmico de la frecuencia seguido por un barrido de deformaciones desde el 1 hasta el 300% a una frecuencia constante de 5 Hz con un aumento logarítmico en la deformación. Se obtienen el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') del barrido de deformaciones a una deformación al 1 %.

Tabla 1. Módulos de almacenamiento y pérdida de los geles obtenidos en los ejemplos 2 a 4

Identificación del ejemplo	Módulo de almacenamiento G' (Pa)	Módulo de pérdida G'' (Pa)
Ejemplo 2	672	21
Ejemplo 3	998	35
Ejemplo 4	268	114

Ejemplo 6

Fuerza de extrusión del gel de HA-SF

- 20 Se midió la fuerza requerida para extruir los geles a través de agujas de calibre 30 usando un Instron 5564 y un software Bluehill 2. Se extruyeron los geles de una jeringa COC de 1 ml a través de una aguja TSK de 30G½. Se empujó el émbolo a una velocidad de 100 mm/min durante 11,35 mm, y se registró la fuerza de extrusión.

Tabla 2. Fuerza de extrusión de los geles obtenidos en los ejemplos 1 y 2

Identificación del ejemplo	Fuerza de extrusión (N)
Ejemplo 1	100
Ejemplo 2	98

Ejemplo 7

Endotoxina bacteriana

- 30 Se sometieron a prueba los geles para determinar el contenido de endotoxinas bacterianas realizando una prueba de lisado de amebocitos de Limulus (LAL) usando un sistema Charles River Endosafe®-PTS™. Se cargaron 4 gotas de 25 µl en los cartuchos con licencia de la FDA con una sensibilidad de 0,005 UE/ml y se insertó el cartucho en el Endosafe®-PTS™.

Tabla 3. Concentración de endotoxinas bacterianas de los geles obtenidos en los ejemplos 1 y 2

Identificación del ejemplo	Endotoxina bacteriana (UE/ml)
Ejemplo 1	<5
Ejemplo 2	<5

Ejemplo 8

Uso de una composición de material de relleno dérmico para tratar un defecto facial de la mejilla

- 40 Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos divulgados en el presente documento para tratar un defecto facial de la mejilla. Una mujer de 28 años de edad se presenta con una cara delgada. Ella sentía que su cara parecía vieja, triste y amargada debido a la menor plenitud de su contorno de la mejilla. La evaluación antes de la operación de la persona incluye la historia clínica y el examen físico además de un exhaustivo consentimiento informado que divulga todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que es una candidata para el tratamiento de tejido blando usando las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento. Una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hialuronano se administra de manera subcutánea y bajo un sistema musculoponeurótico superficial en las regiones de las mejillas; aproximadamente 15 ml de la composición en las mejillas izquierda y derecha. Se monitoriza el individuo durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa el tejido de las mejillas y determina que el tratamiento fue exitoso. Tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento porque ella parecía más joven. Aproximadamente un mes después del procedimiento, la mujer indica que su calidad de vida ha mejorado.

Ejemplo 9

Uso de una composición de material de relleno dérmico para tratar arrugas

Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos divulgados en el presente documento para tratar arrugas. Una mujer de 55 años de edad se presenta con arrugas alrededor de las zonas de los ojos y las mejillas. La evaluación antes de la operación de la persona incluye la historia clínica y el examen físico además de un exhaustivo consentimiento informado que divulga todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que es una candidata para el tratamiento de tejido blando usando las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento. Una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hialuronano se administra de manera subcutánea y bajo un sistema musculoaponeurótico superficial en las regiones del párpado superior y la mejilla; aproximadamente 1,5 ml de la composición en las regiones izquierdas y derechas del párpado superior y la mejilla. Se monitoriza el individuo durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa las regiones faciales y determina que el tratamiento fue exitoso. Tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento porque ella parecía más joven. Aproximadamente un mes después del procedimiento, la mujer indica que su calidad de vida ha mejorado.

Ejemplo 10

Uso de una composición de material de relleno dérmico para tratar un defecto de mama

Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos divulgados en el presente documento para tratar un defecto de mama. Una mujer de 32 años de edad se presenta con quejas de que las porciones internas de sus implantes de mama son visibles, lo que acentúa la apariencia "huesuda" de su esternón. Además, ella sentía que sus mamas estaban muy separadas. La evaluación antes de la operación de la persona incluye la historia clínica y el examen físico además de un exhaustivo consentimiento informado que divulga todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que es una candidata para el tratamiento de tejido blando usando las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento. Una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hialuronano se administra de manera subcutánea sobre el esternón de manera lateral y sobre la porción interna de la mama de manera bilateral, 15 ml en la derecha y 10 ml en la izquierda. La composición se administra en forma de lágrima para aumentar la razón del área superficial frente al volumen. Se monitoriza el individuo durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa las mamas y determina que el tratamiento fue exitoso. Tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento. Aproximadamente un mes después del procedimiento, la mujer indica que su calidad de vida ha mejorado.

Ejemplo 11

Uso de una composición de material de relleno dérmico para un aumento de mama

Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos divulgados en el presente documento para un aumento de mama. Una mujer de 28 años de edad se presenta con micromastia o hipoplasia de mama. La evaluación antes de la operación de la persona incluye la historia clínica y el examen físico además de un exhaustivo consentimiento informado que divulga todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que es una candidata para el tratamiento de tejido blando usando las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento. Una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hialuronano se administra de manera subcutánea usando las vías axilares, periareolares e inframamarias de manera bilateral, 90 ml en la derecha y 145 ml en la izquierda. La composición se administra en forma de lágrima para aumentar la razón del área superficial frente al volumen. Se monitoriza el individuo durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa las mamas y determina que el tratamiento fue exitoso. Tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento. Aproximadamente un mes después del procedimiento, la mujer indica que su calidad de vida ha mejorado.

Ejemplo 12

Trasplante de tejido adiposo para un trastorno de mama

Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos divulgados en el presente documento para tratar un trastorno de mama. Una mujer de 29 años de edad se presenta con una deformidad tuberosa de mama bilateral. La evaluación antes de la operación de la persona incluye la historia clínica y el examen físico además de un exhaustivo consentimiento informado que divulga todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que es una candidata para el tratamiento de tejido blando usando las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento. Una composición que comprende un componente de hidrogel de fibroína de seda y un componente de hialuronano se administra de manera subcutánea en múltiples planos mediante vías axilares, periareolares e inframamarias de manera bilateral, 180 ml en la derecha

y 170 ml en la izquierda. La composición se administra en forma de lágrima para aumentar la razón del área superficial frente al volumen. Se monitoriza el individuo durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa las mamas y determina que el tratamiento fue exitoso. Tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento. Aproximadamente un mes después del procedimiento, la mujer indica que su calidad de vida ha mejorado.

En conclusión, debe entenderse que aunque los aspectos de la presente memoria descriptiva se han descrito con referencia a las diversas realizaciones, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los ejemplos específicos divulgados son sólo ilustrativos de los principios del objeto de estudio divulgado en el presente documento. Por tanto, debe entenderse que el objeto de estudio divulgado no está limitado de ninguna manera a una metodología, un protocolo y/o un reactivo, etc. particular descrito en el presente documento. Como tal, pueden realizarse diversas modificaciones o cambios a o configuraciones alternativas del objeto de estudio divulgado según las enseñanzas en el presente documento sin apartarse del espíritu de la presente memoria descriptiva. Por último, la terminología usada en el presente documento se emplea sólo con el fin de describir las realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente mediante las reivindicaciones. Por consiguiente, la presente invención no se limita a eso precisamente tal como se muestra y describe.

Se describen determinadas realizaciones de esta invención en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones de estas realizaciones descritas serán evidentes para los expertos habituales en la técnica tras leer la descripción anterior. El inventor espera que los expertos en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se practique de otra manera a la específicamente descrita en el presente documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes del objeto de estudio enumerado en las reivindicaciones adjuntas en el presente documento tal como se permite por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones posibles de los mismos se abarca por la invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o de otra manera se contradiga claramente por el contexto.

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la invención divulgada en el presente documento no deben interpretarse como limitaciones. Cada miembro del grupo puede referirse o reivindicarse de manera individual o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en el presente documento. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo pueden incluirse en, o eliminarse de, un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produzca tal inclusión o eliminación, se considera que la memoria descriptiva contiene el grupo modificado, cumpliéndose así la descripción escrita de todos los grupos de Markush usados en las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción y así sucesivamente, usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones, deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa que el elemento, parámetro o término así calificado abarca un intervalo de más o menos el diez por ciento por encima y por debajo del valor del elemento, parámetro o término indicado. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas buscadas para obtenerse mediante la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos informados y aplicando técnicas de redondeo habituales. A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se informan de manera tan precisa como es posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, contiene de manera inherente determinados errores que necesariamente resultan de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

Los términos "un", "una", "el/la" y referentes similares usados en el contexto de describir la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. La enumeración de los intervalos de valores en el presente documento pretende servir simplemente como un método abreviado para referirse de manera individual a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerara de manera individual en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento pretenden simplemente iluminar mejor la invención y no plantear una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otra manera. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

5 Las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento pueden estar limitadas además en las reivindicaciones usando el lenguaje de consiste en o consiste esencialmente en. Cuando se usa en las reivindicaciones, ya sea como presentado o añadido por enmienda, el término de transición “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en las reivindicaciones. El término de transición “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a los materiales o las etapas especificados y aquellos que no afectan de manera material a la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s). Las realizaciones de la invención así reivindicadas se describen de manera inherente o expresamente y se permiten en el presente documento.

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para elaborar un material de relleno dérmico, comprendiendo el procedimiento:
5 (a) activar un ácido hialurónico usando un agente de acoplamiento de carbodiimida, y
(b) reticular el ácido hialurónico activado a la seda usando un reticulante de amina múltiple.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el reticulante de amina múltiple es 3-[3-(3-aminopropoxi)-2,2-bis(3-amino-propoximetil)-propoxi]propilamina (4AA).
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el reticulante de amina múltiple es un reticulante de diamina.
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que el reticulante de diamina se selecciona del grupo que consiste en una hexametilendiamina (HMDA), una lisina, un éster metílico de lisina y un éster etílico de lisina.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el agente de acoplamiento de carbodiimida es una carbodiimida soluble en agua.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que el agente de acoplamiento de carbodiimida soluble en agua es 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC).
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de usar un agente de activación junto con el agente de acoplamiento de carbodiimida.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el agente de activación es un agente de activación soluble en agua.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el agente de acoplamiento soluble en agua es una N-hidroxisuccinimida (NHS) o una N-hidroxisulfosuccinimida (sulfoNHS).
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la seda se encuentra en disolución acuosa cuando se reticula con ácido hialurónico.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la seda es una fibroína de seda.
- 40 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la fibroína de seda comprende fibroína de seda monocatenaria.
13. Método cosmético para tratar un estado de tejido blando en un individuo que lo necesita, comprendiendo el método la etapa de administrar un material de relleno dérmico obtenible mediante el método según la reivindicación 1 en una región de la piel seleccionada de una región dérmica y una región hipodérmica del individuo, en el que la administración mejora el estado de tejido blando.
- 45 14. Método cosmético según la reivindicación 13, en el que el estado de tejido blando es aumento de mama o reconstrucción de mama y comprende la etapa de administrar el material de relleno dérmico según la reivindicación 1 con tejido adiposo.
- 50 15. Material de relleno dérmico obtenible mediante el método según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento terapéutico de estados de tejido blando, en el que los estados de tejido blando incluyen una imperfección, un defecto, una enfermedad y un trastorno de tejido blando.