

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 582**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
C08L 89/06 (2006.01)
A61L 27/26 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C08H 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2019** **PCT/IL2019/050492**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.11.2019** **WO19211854**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2019** **E 19725422 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024** **EP 3787702**

54 Título: **Rellenos dérmicos y aplicaciones de los mismos**

30 Prioridad:

03.05.2018 US 201862666267 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

73 Titular/es:

COLLPLANT LTD. (100.0%)
4 Oppenheimer Stree, Weizmann Sciences Park,
P.O.B. 4132
Rehovot 7670104, IL

72 Inventor/es:

SHOSEYOV, ODED;
ORR, NADAV;
SEROR MAKNOUZ, JASMINE y
ZARKA, REVITAL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 989 582 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

Rellenos dérmicos y aplicaciones de los mismos

5 Campo de la divulgación

En el presente documento se divulgan rellenos dérmicos fotoiniciados y doblemente reticulados que comprenden colágeno humano procedente plantas y armazones que promueven el crecimiento celular, así como métodos para usar los rellenos dérmicos, en algunos casos, para el aumento de tejido blando.

10

Antecedentes

15

Los colágenos son las principales proteínas responsables de la integridad estructural de los vertebrados y muchos otros organismos multicelulares. El colágeno comprende el componente principal del tejido conjuntivo y la proteína más abundante en los mamíferos, comprendiendo aproximadamente el 30 % de la proteína que se encuentra en el cuerpo. La pérdida o el deterioro del colágeno puede tener lugar como resultado del envejecimiento o una lesión (Olsen *et al.*, Adv Drug Deliv Rev. 28 de noviembre de 2003; 55(12):1547-67).

20

Un aspecto común del envejecimiento es el desarrollo de líneas, líneas finas o arrugas. Se han usado tratamientos que implican el uso de colágeno extraído de tejido para reducir o eliminar líneas, líneas finas o arrugas. Se han usado tratamientos similares para reducir las cicatrices.

25

El colágeno también es un componente de los tendones. La tendinopatía, una lesión común generalmente asociada con los deportes y las actividades físicas, está asociada con la degeneración y la disposición desordenada de las fibras de colágeno del tendón. La curación de los tendones lesionados requiere una actividad orquestada de células específicas y una presencia prolongada de factores de crecimiento (GF) relevantes en las proximidades de la lesión. La tendinopatía es hoy en día el principal motivo de consulta por una queja musculoesquelética (Kaux *et al.* (Jan. 2011) J. Sport. Sci. Med. Enero:238-253). La tendinopatía se refiere a una diversidad de afecciones dolorosas que se desarrollan en y alrededor de los tendones y ligamentos que probablemente surgen de un desequilibrio entre los cambios patológicos debido al uso excesivo del tendón y las respuestas regenerativas consecuentes (Andres *et al.* (2008) Clin. Orthop. Relat. Res. 466:1539-1554). La tendinopatía está asociada con la degeneración y la disposición desordenada del colágeno (Maffulli *et al.* (2003) Clin. Sport. Med. 22:675-692), a veces asociada con micro desgarros de fibras, aumento de la vascularidad y presencia de una inflamación leve (Khan *et al.* (1999) Sport. Med. 27(6):393-408). Desde el punto de vista clínico, se caracteriza por la aparición de rigidez del tendón, dolor relacionado con la actividad, disminución de la funcionalidad y, a veces, hinchazón localizada (Kaux 2011; Andres 2008). Las fibras de colágeno presentan compresiones desiguales e irregulares, aflojamiento y una mayor ondulación en lugar del aspecto ajustado, paralelo y agrupado normal (Maffulli 2003). Dado que la población se mantiene activa a edades más avanzadas, se espera que la tasa de incidencia de lesiones tendinosas aumente en las próximas décadas. Existe una amplia diversidad de tratamientos para la tendinopatía, incluyendo fisioterapia, tratamientos farmacológicos y combinaciones de los mismos, sin embargo, los resultados clínicos no son satisfactorios y la reaparición de los síntomas es común (Kaux 2011). La inyección de plasma rico en plaquetas (PRP) autólogo para el tratamiento de la tendinopatía recibió una amplia atención en las últimas décadas (Delong *et al.* (2016) Curr. Orthopaedic Pract. 22:514-523; Kaux *et al.* (2012) Wound Repair Regen. 20:748-756; Yuan *et al.* (2013) Muscles. Ligaments Tendons J. 3(3):139-49; Di Matteo *et al.* (2015) Musculoskelet. Surg. 99(1):1-9). El PRP es la fracción plasmática de la sangre que contiene una alta concentración de plaquetas. Tras la inyección en el sitio lesionado, las plaquetas liberan diversos tipos de factores de crecimiento (GF) que se cree que promueven el proceso de curación. Entre los factores de crecimiento asociados a PRP se han informado el factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas (PDEGF), los factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF), los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y los factores de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Delong 2016; Yuan 2013; Harrison *et al.* (2011) Am. J. Sports Med. 39(4):729-734). Muchos estudios *in vitro* y modelos *in vivo* muestran que los tratamientos con PRP mejoran la expresión de colágeno y la producción de matriz extracelular, estimulan la angiogénesis y aumentan la migración, diferenciación y proliferación celular, lo que favorece la curación de lesiones tendinosas (Yuan 2013; Kajikawa *et al.* (2008) J. Cell. Physiol. 215(3):837-845; Zhang *et al.* (2010) Am. J. Sports Med. 38(12):2477-2486). Sin embargo, las evidencias clínicas claras de la eficacia del tratamiento con PRP son limitadas (Delong 2016; Yuan 2013; Moraes *et al.* (2014)).

60

El colágeno sirve como el componente predominante y el determinante estructural-mecánico primario de la matriz extracelular (ECM) de la mayoría de los tejidos [véanse, por ejemplo, Kadler K. Birth Defects Res C Embryo Today. 2004; 72:1-11; Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. J Cell Sci. 2007; 120:1955-1958.; Kreger ST. Biopolymers. 2010 93(8): 690-707]. El tropocolágeno consiste típicamente en tres hélices levógiras (normalmente dos hélices idénticas y una tercera hélice distinta) de procolágeno que se unen para formar un tropocolágeno de triple hélice dextrógiro, lo que da lugar a la formación de fibrillas.

65

La conformación y la mayoría de las propiedades del colágeno natural están determinadas por el dominio de triple hélice que compone más del 95 % de la molécula. Este dominio consiste en tres cadenas alfa, conteniendo cada una

aproximadamente 1.000 aminoácidos, enrolladas en forma de cuerda para formar una estructura de triple hélice ajustada. La triple hélice está enrollada de tal manera que los enlaces peptídicos que unen aminoácidos adyacentes están enterrados dentro del interior de la molécula, de modo que las moléculas de colágeno son resistentes al ataque de proteasas, tal como la pepsina.

El colágeno de tipo I representa el colágeno fibrilar prototípico y es el tipo de colágeno principal en la mayoría de los tejidos, incluyendo hueso, tendón, piel, aorta y pulmón. Las fibras de colágeno de tipo I proporcionan una gran resistencia a la tracción y una extensibilidad limitada. La forma molecular más abundante del colágeno tipo I es un heterotrímero compuesto por dos cadenas alfa diferentes [$\alpha 1(I)$]₂ y $\alpha 2(I)$ (Inkinen, Connective Tissue Formation in Wound Healing an Experimental Study, Academic Dissertation, septiembre de 2003. University of Helsinki, Faculty of Science, Department of Biosciences, Division of Biochemistry).

En todas las moléculas de colágeno fibrilar, las tres cadenas polipeptídicas están construidas a partir de un triplete repetitivo Gly-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido pero frecuentemente son los aminoácidos prolina e hidroxiprolina. El colágeno es particularmente rico en los residuos de aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, y la secuencia proteica de una cadena de colágeno a menudo tiene una secuencia de aminoácidos repetitiva. El procolágeno se modifica mediante la adición de grupos hidroxilo en residuos de prolina y lisina. Estas reacciones de hidroxilación son catalizadas, respectivamente, por prolil-4-hidroxilasa y lisil-hidroxilasa. A continuación, los grupos hidroxilo de los residuos de lisina se glucosilan y, posteriormente, se forma la triple hélice.

Una característica importante de los colágenos formadores de fibrillas es que se sintetizan como procolágenos precursores que contienen propéptidos de extensión globulares de los extremos N y C. La biosíntesis del procolágeno es un proceso complejo que implica una serie de modificaciones postraduccionales diferentes, incluyendo la hidroxilación de prolina y lisina, la glucosilación ligada a N y ligada a O y la formación de enlaces disulfuro tanto intracatenarios como intercatenarios. Las enzimas que realizan estas modificaciones actúan de forma coordinada para garantizar el plegamiento y el ensamblaje de una molécula de triple hélice correctamente alineada y térmicamente estable.

Las cadenas polipeptídicas triconstituyentes se ensamblan dentro del retículo endoplasmático rugoso (RER) para formar procolágeno. A medida que la cadena polipeptídica se transloca de manera cotraduccional a través de la membrana del retículo endoplasmático (RE), se produce la hidroxilación dependiente de prolil-4-hidroxilasa (P4H) de los residuos de prolina y lisina dentro de la región de repetición Gly-X-Y. La estabilidad de la estructura de triple hélice final del colágeno depende en gran medida de la hidroxilación mediada por P4H de las cadenas de colágeno. La lisil hidroxilasa (LH, EC 1.14.11.4), la galactosiltransferasa (EC 2.4.1.50) y la glucosiltransferasa (EC 2.4.1.66) son enzimas implicadas en las modificaciones postraduccionales de los colágenos. Modifican secuencialmente los residuos de lisilo en posiciones específicas a residuos de hidroxilisilo, galactosilhidroxilisilo y glucosilgalactosilhidroxilisilo. Estas estructuras son exclusivas de los colágenos y esenciales para su actividad funcional (Wang *et al.* (2002) *Matrix Biology*, 21(7): 559-566). Una sola enzima humana, la lisil hidroxilasa 3 (LH3) puede catalizar las tres etapas consecutivas en la formación de carbohidratos ligados a hidroxilisina (Wang *et al.* (2002) *Matrix Biology*, 21(7): 559-566). Una vez que la cadena polipeptídica se transloca completamente al lumen del retículo endoplasmático, las tres cadenas pro-alfa se asocian a través de sus propéptidos C para formar una molécula trimérica donde la región de repetición Gly-X-Y forma un punto de nucleación en su extremo C, lo que garantiza la alineación correcta de las cadenas. A continuación, la región Gly-X-Y se pliega en una dirección C a N para formar una triple hélice (Khoshnoodi *et al.* (2006) *J. Biol. Chem.* 281:38117-38121).

La relación temporal entre la modificación de la cadena polipeptídica y la formación de la triple hélice es crucial, ya que la hidroxilación de los residuos de prolina es necesaria para garantizar la estabilidad de la triple hélice a temperatura corporal, una vez formada, la triple hélice ya no sirve como sustrato para la enzima de hidroxilación. Los propéptidos C (y en menor medida los propéptidos N) mantienen el procolágeno soluble durante su paso fuera de la célula (Bulleid *et al.* (2000) *Biochem. Soc. Transact.*, 28(4): 350-353). Después o durante la secreción de moléculas de procolágeno en la matriz extracelular, los propéptidos son eliminados por las proteinasas N y C del procolágeno, lo que desencadena el autoensamblaje espontáneo de las moléculas de colágeno en fibrillas (Hulines, 2002, *J. Struct. Biol.* Enero-febrero; 137(1-2):2-10). La eliminación de los propéptidos por las proteinasas N y C del procolágeno reduce la solubilidad del procolágeno en >10.000 veces y es necesaria para iniciar el autoensamblaje del colágeno en fibras a 37 °C. Los telopéptidos cortos, que son los restos que no son de triple hélice de los propéptidos del extremo N y C que quedan después de la digestión con las proteinasas N/C, son cruciales para este proceso de ensamblaje. Estos péptidos actúan para asegurar el registro covalente correcto de las moléculas de colágeno dentro de la estructura de fibrillas y reducen la concentración crítica para el autoensamblaje (Bulleid *et al.* (2000) *Biochem. Soc. Transact.*, 28(4): 350-353) a través de sus aldehídos reticulables.

El colágeno natural está generalmente presente en el tejido conectivo como moléculas de colágeno que contienen telopéptidos empaquetadas una al lado de la otra en forma de fibrillas. Cada tramo longitudinal está compuesto por moléculas alineadas en disposiciones de extremo a extremo con ligeros espacios longitudinales escalonados con respecto al siguiente tramo longitudinal adyacente lateralmente sucesivo. De esta manera, se generan huecos entre las regiones de los extremos enfrentados de las moléculas sucesivas en un tramo longitudinal determinado y están delimitados por los lados escalonados de las moléculas en los tramos longitudinales paralelos adyacentes lateralmente

a los mismos.

La dispersión y solubilización del colágeno animal natural se puede lograr usando diversas enzimas proteolíticas que alteran los enlaces intermoleculares y eliminan los telopéptidos no helicoidales inmunógenos sin afectar a la estructura de triple hélice básica y rígida, que imparte las características deseadas del colágeno (véanse las Pat. de EE. UU. N.º 3.934.852; 3.121.049; 3.131.130; 3.314.861; 3.530.037; 3.949.073; 4.233.360 y 4.488.911 para métodos generales para preparar colágeno soluble purificado). El atelocolágeno soluble resultante se puede purificar posteriormente mediante precipitación repetida a pH bajo y fuerza iónica alta, seguida de lavado y resolubilización a pH bajo. No obstante, la preparación soluble típicamente está contaminada con cadenas de colágeno reticuladas que disminuyen la homogeneidad de la preparación de proteína.

Debido a sus características únicas y su perfil diverso en las funciones del cuerpo humano, el colágeno ha sido seleccionado de una diversidad de materiales biocompatibles para su uso en la reparación tisular para apoyar la integridad estructural, inducir la infiltración celular y promover la regeneración tisular. Entre los 5 tipos principales de colágeno, el colágeno de tipo I es la forma más abundante de colágeno en el cuerpo humano.

El colágeno de tipo I puede autoensamblarse en un hidrogel fibrilar capaz de soportar células tisulares a través de sitios de adhesión bioactivos. La adición de grupos de metacrilato al colágeno crea metacrilato de colágeno (CMA), que es más resistente a la degradación (Gaudet *et al.* Biointerphases (2012) 7:25-33). La tiolación del colágeno puede mejorar la cohesión y la mucoadhesión y afecta a la capacidad de hinchamiento (Duggan *et al.*, Eur. J. Pharm. Biopharm. (Abril de 2015) 91:75-81).

Las propiedades únicas del colágeno han contribuido a su uso en productos de medicina regenerativa. El colágeno proporciona biomateriales con características necesarias para una gran variedad de aplicaciones, incluyendo las farmacéuticas (compresas hemostáticas, esponjas, apósitos cicatrizantes), médicas (prótesis tales como válvulas cardíacas, tendones y ligamentos, sustitutos de la piel, agentes de relleno), odontológicas (implantes de encías/enfermedades de las encías) y cosméticas (aditivo, agente antiarrugas, microcontenedor para sustancias perfumadas). Los productos a base de colágeno fabricados en todos los mercados mencionados anteriormente requieren grandes cantidades de materias primas de colágeno para su producción.

Los colágenos humanos y de origen animal, tales como los de cadáveres o fuentes animales (bovinos, porcinos o equinos), y los productos a base de colágeno se han usado para su aplicación, inyección, implante e ingestión oral. Los usos incluyen el premoldeo en formas deseadas para la reparación o el reemplazo parcial de estructuras óseas o cartilaginosas dañadas, inyecciones en articulaciones dañadas e inyecciones como rellenos dérmicos.

El uso de colágeno de origen animal (incluido el colágeno de origen humano) es problemático debido a los posibles riesgos de contaminación por agentes infecciosos no convencionales. Si bien los riesgos derivados de la contaminación bacteriana o vírica se pueden controlar por completo, los priones son menos controlables y presentan riesgos considerables para la salud. Estos agentes infecciosos, que parecen tener una naturaleza similar a la de las proteínas, están implicados en el desarrollo de la encefalopatía animal degenerativa (enfermedad del temblor ovino, encefalopatía espongiiforme bovina) y la encefalopatía humana (enfermedad de Creutzfeld-Jacob, síndrome de Gerstmann-Straussler y enfermedad del kuru). Otras enfermedades (p. ej., el síndrome de inmunodeficiencia adquirida [SIDA], la hepatitis, la rabia, algunos cánceres) también pueden transmitirse al receptor. Debido al largo tiempo que transcurre antes de la aparición de las encefalopatías y algunas de las otras enfermedades, es difícil realizar controles formales. (Véanse, generalmente, Castrow *et al.* (1983) J. Am. Acad. Dermatol. 9(6):889-93; Siegle *et al.* (1984) Arch. Dermatol. 120(2):183-187).

Además, en algunos pacientes, el tratamiento con colágeno humano o animal desencadena respuestas inmunitarias celulares o humores, incluyendo alergias. Además, la calidad del colágeno generalmente disminuye con la edad del cadáver u organismo de origen o puede disminuir en función de otros factores. Además, el proceso de extracción provoca daños estructurales significativos que comprometen sus funciones biológicas y mecánicas (Stein *et al.* (2009) Biomacromolecules 10(9):2640-2645; Shilo *et al.* (2013) Tissue Eng. Parte A 19(13-14):1519-1526; Shoseyov *et al.* (2013) Tiss. Eng. Parte A 19(13-14):1527).

Se conocen en la técnica plantas que expresan cadenas de colágeno (véanse, p. ej., el documento WO 2005/035442; Pat. de EE. UU. 6.617.431; Pub. de EE. UU. 2002/0098578; Pub. de EE. UU. 2002/0142391; Merle *et al.* (2002) FEBS Letters 515: 114-118; Ruggiero *et al.* (3 de marzo de 2000) FEBS Lett. 469(1):132-6). Aunque dichas plantas se pueden usar para producir cadenas de colágeno así como colágeno, dichas cadenas están hidroxiladas incorrectamente y, por lo tanto, el autoensamblaje de las mismas, ya sea en plantas o no, conduce a un colágeno que es inherentemente inestable. Por ejemplo, aunque las plantas son capaces de sintetizar proteínas que contienen hidroxiprolina, la prolil hidroxilasa, que es responsable de la síntesis de hidroxiprolina en las células vegetales, exhibe una especificidad de secuencia de sustrato relativamente laxa en comparación con la P4H de mamífero y, por lo tanto, la producción de colágeno que contiene hidroxiprolina solo en la posición Y de los tripletes Gly-X-Y requiere la expresión conjunta de los genes de colágeno y P4H en las plantas (Olsen *et al.* (2003) Adv. Drug Deliv. Rev., 55(12): 1547-1567).

El procesamiento de "colágeno insoluble" de origen animal con proteasas de origen vegetal, tales como ficina y/o

papaína, también se conoce en la técnica (Pat. de EE. UU. N.º 4.597.762, 5.670.369, 5.316.942, 5.997.895 y 5.814.328).

Un intento de producir colágenos humanos que dependan de la maquinaria de hidroxilación presente de forma natural en las plantas dio como resultado un colágeno que es deficiente en hidroxilación de prolina (Merle *et al.* (2002) FEBS Letters 515: 114-118). Dicho colágeno se derrite o pierde su estructura de triple hélice a temperaturas inferiores a 30 °C. La expresión conjunta de colágeno y prolil-hidroxilasa da como resultado un colágeno hidroxilado estable que es biológicamente relevante para aplicaciones a temperaturas corporales (Merle *et al.* (2002) FEBS Letters 515: 114-118).

Las hidroxilisinas de un colágeno humano expresado en tabaco forman menos del 2 % de las hidroxilisinas encontradas en un colágeno bovino (0,04 % de residuos/1,88 % de residuos). Esto sugiere que la lisil hidroxilasa endógena vegetal es incapaz de hidroxilar suficientemente las lisinas en el colágeno.

Los recientes desarrollos en tecnología han dado como resultado el desarrollo de un sistema para la purificación de colágeno de tipo I humano sin tratar (rhColágeno) (COLLPLANT™, Israel; también disponible en SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, EE. UU.) introduciendo en plantas de tabaco, cinco genes humanos que codifican colágeno de tipo I heterotrimérico [véanse, por ejemplo, Stein H. (2009) Biomacromolecules 10:2640-5; Yaari *et al.* (2013) Tiss. Eng. Parte A 19(13/14): 1502-1506; Willard *et al.* (2013) Tiss. Eng. Parte A 19(13/14): 1507-1518; Shilo *et al.* (2013) Tiss. Eng. Parte A 19(13/14): 1519-1526; Shoseyov *et al.* (2013) Tissue Eng. Parte A 19:1527-1533; y Shoseyov *et al.* (Ene./Feb. de 2014) Bioengineered 5:1, 1-4]. La proteína se purifica hasta homogeneidad mediante un proceso industrial rentable que aprovecha las propiedades únicas del colágeno. Véanse también los documentos WO 2006/035442, WO 2009/053985.

En comparación con el colágeno extraído de tejido, que puede desnaturalizarse parcialmente y despojarse de los dominios de unión celular, el colágeno humano de tipo I de origen vegetal tiene una estructura más consistente y una mayor cantidad de dominios de unión celular (Shoseyov *et al.* (Ene./Feb. de 2014) Bioengineered 5:1, 1-4; Majumdar *et al.* (2015) J. Biomed. Mater. Res. Parte B: Appl. Biomater. 104B: 300-307). El rhColágeno puede formar matrices y armazones tridimensionales (3D) funcionales, con aplicaciones en la fabricación aditiva (AM, por sus siglas en inglés), un proceso en el que se fabrica un objeto 3D de manera estratificada usando un modelo informático de los objetos, mediante bioimpresión 3D. Además, el rhColágeno generalmente carece de los problemas de inmunogenicidad y transferencia de enfermedades del colágeno extraído de tejido.

Existen métodos para producir colágeno en una planta expresando al menos un tipo de cadena alfa de colágeno y permitiendo su acumulación en un compartimento subcelular desprovisto de actividad P4H endógena (Pat. de EE. UU. 8.455.717), así como métodos para generar atelocolágeno a partir de un colágeno que comprende telopéptido humano procedente de células no animales mediante tratamiento con una proteasa (Pat. de EE. UU. 8.759.487).

El colágeno de tipo I y el rhColágeno se consideran candidatos para su uso como componente principal de un material de construcción en bioimpresión 3D. Se han usado armazones de diversos tipos para aplicaciones cosméticas y reconstructivas.

Además, ha habido un aumento en el uso de rellenos dérmicos para el aumento de tejidos blandos, p. ej., la reducción de arrugas. Un método posible para el uso de rellenos dérmicos incluye la inyección de un material de relleno dérmico polimerizable en el área deseada, seguido por el contorneado o moldeado del relleno en la conformación deseada. La polimerización y reticulación del material mediante uno de diversos métodos puede transformar los monómeros en el material inyectado para formar polímeros y cadenas, que pueden formar redes, conservando la conformación moldeada deseada. Existen varios métodos para formar polímeros y reticular polímeros. Un método implica reactivos que reaccionan a la luz y reacciones inducidas por la luz que crean especies reactivas en una solución monomérica. Véanse, p. ej., la Pat. de EE. UU. 9.795.711; Pat. de EE. UU. 8.945.624; Pat. de EE. UU. 6.352.710; y Pub. de EE. UU. 2009/0324722, así como Elisseeff *et al.* (marzo de 1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 3104-3107.

Los documentos WO 2013/106715 y WO 2013/067293 describen hidrogeles que comprenden agua y un componente de ácido hialurónico reticulado con un componente de colágeno, para el aumento de tejido blando.

La Pub. de EE. UU. 2009/0093755 describe formulaciones reticuladas de ácido hialurónico y colágeno y su uso como implantes para rellenar huecos y defectos de tejido blando.

El documento WO 2016/057603 describe un método de fabricación de un sistema macroscópico de biopolímero que comprende dos biopolímeros, al menos parcialmente reticulados, incluyendo ácido hialurónico y colágeno, y su uso como rellenos dérmicos.

La Pub. de EE. UU. 2010/0055184 describe hidrogeles poliméricos que comprenden una red semiinterpenetrante de un polímero reticulado y agua y un polímero soluble en agua de ácido hialurónico y colágeno y su uso en el aumento de tejido blando.

El documento WO 2010/053918 describe hidrogeles poliméricos que comprenden elastina reticulada y que comprenden además colágeno y/o ácido hialurónico y su uso en el relleno dérmico y la expansión tisular.

El documento US 2007/186312 describe plantas productoras de colágeno y métodos para generar y usar las mismas. Más particularmente, un enfoque para generar plantas capaces de producir altos niveles de cadenas de colágeno hidroxilado que son capaces de formar fibras de colágeno de tipo I de triple hélice naturales.

El documento US 2006/100138 describe composiciones de colágeno adecuadas para su uso en diversos procedimientos de aumento de tejido.

I. Gaudet y D. Schreiber (Biointerphases 2012) 7:25) describen la caracterización del colágeno de tipo I con metacrilato como un hidrogel fotoactivo dinámico.

El documento WO200/08019 describe formulaciones de polímeros para la administración de agentes bioactivos.

Sin embargo, al menos algunos de estos enfoques continúan centrándose en colágenos de origen tisular o polímeros diferentes de colágeno (p. ej., poli(alcohol vinílico), ácido hialurónico o polietilenglicol). Además, el uso de colágeno extraído de tejido está limitado debido a su sensibilidad a la temperatura y fuerza iónica que impulsa la formación espontánea de gel a temperaturas superiores a 20 °C, en condiciones fisiológicas [véase, por ejemplo, PureCol, Advanced BioMatrix, Inc.]. La formación típica de gel dependiente de la temperatura de colágenos extraídos de tejido dificulta significativamente la fluidez precisa. Mantener los colágenos a baja temperatura hasta la aplicación es una posible solución para este fenómeno pero implica una limitación técnica grave. Otra solución es el uso de gelatina, la forma desnaturalizada de colágeno que no se vuelve gelatinosa en estas condiciones. Sin embargo, la gelatina carece de las interacciones genuinas entre tejido y célula del colágeno natural y, por lo tanto, se pierden funciones biológicas cruciales. Además, la viscosidad hace que sea más difícil inyectarlo debajo de la dermis usando agujas de calibre fino y también hace que sea más difícil esparcirlo y moldearlo en cavidades más pequeñas.

El documento WO 2018/225076, del presente cesionario, describe formulaciones a base de colágeno para su uso en la fabricación aditiva de objetos tridimensionales que contienen colágeno.

Por lo tanto, existe una demanda de, y sería altamente deseable y ventajoso tener, rellenos dérmicos inyectables mejorados con propiedades reológicas y mecánicas ajustables, y métodos y usos de los mismos.

Sumario

Cualquier referencia a la invención que proporcione un método de tratamiento debe interpretarse como una referencia a composiciones para su uso en dicho método.

La presente invención proporciona una solución polimerizable que comprende:

(i) un colágeno humano recombinante (rhColágeno) de tipo 1 de origen vegetal reticulable; (ii) un fotoiniciador y (iii) un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos; para su uso en un método terapéutico de aumento de tejido que comprende:

(a) introducir una solución polimerizable en el espacio tisular debajo de una epidermis y (b) aplicar luz a la superficie de la epidermis superficial a dicho espacio para inducir la polimerización.

La presente invención proporciona además un uso no terapéutico de una solución polimerizable que comprende:

(i) un colágeno humano recombinante (rhColágeno) de tipo 1 de origen vegetal reticulable; (ii) un fotoiniciador; y (iii) un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos, en donde dicho uso no terapéutico es en un método cosmético de aumento de tejido que comprende:

(a) introducir una solución polimerizable en el espacio tisular debajo de una epidermis; y ((b) aplicar luz a la superficie de la epidermis superficial a dicho espacio para inducir la polimerización.

Descripción detallada

En un aspecto, se divulga en el presente documento un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende:

- (a) un colágeno humano de origen vegetal; y
- (b) un ácido hialurónico reticulado;

en donde el colágeno humano de origen vegetal está reticulado con el ácido hialurónico reticulado.

En un aspecto relacionado, el colágeno humano de origen vegetal comprende

- (a) colágeno humano recombinante de tipo 1 (rhColágeno); o
- (b) el ácido hialurónico reticulado comprende ácido hialurónico reticulado y no reticulado; o
- (c) una combinación de los mismos.

En un aspecto relacionado; el agente de reticulación que une el ácido hialurónico reticulado difiere del agente de reticulación que une el colágeno humano de origen vegetal con el ácido hialurónico reticulado; o la relación de ácido hialurónico reticulado con el colágeno humano de origen vegetal comprende un intervalo entre 4:1 y 1:2; o una combinación de los mismos. En un aspecto relacionado adicional, el agente de reticulación que reticula el ácido hialurónico y el agente de reticulación que reticula el colágeno humano de origen vegetal se seleccionan independientemente de 1,4-butanodiol diglicidil éter (BBDE), metyoduro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC), [Indique otros posibles agentes de reticulación].

Se divulga en el presente documento, en un aspecto, un método para preparar un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende colágeno humano de origen vegetal reticulado con ácido hialurónico reticulado, que comprende las etapas de

- (a) reticular ácido hialurónico;
- (b) neutralizar el ácido hialurónico reticulado;
- (c) neutralizar el colágeno humano de origen vegetal;
- (d) mezclar el ácido hialurónico reticulado neutralizado con el colágeno humano de origen vegetal neutralizado;
- (e) la adición de ácido hialurónico de menor peso molecular (MW HA);
- (f) reticular la mezcla de ácido hialurónico reticulado y colágeno humano de origen vegetal; y
- (g) dializar el relleno dérmico de colágeno humano de origen vegetal-ácido hialurónico reticulado doblemente reticulado.

En un aspecto relacionado, el colágeno humano de origen vegetal comprende colágeno humano recombinante de tipo 1 (rhColágeno); o el agente de reticulación que une el ácido hialurónico reticulado de la etapa (a) difiere del agente de reticulación que une el colágeno humano de origen vegetal con el ácido hialurónico reticulado de la etapa (e); o una combinación de los mismos. En un aspecto relacionado, la relación de ácido hialurónico reticulado con el colágeno humano de origen vegetal comprende un intervalo entre 4:1 y 1:2; o el agente de reticulación que reticula el ácido hialurónico y el agente de reticulación que reticula el colágeno humano de origen vegetal se seleccionan independientemente de 1,4-butanodiol diglicidil éter (BBDE), metyoduro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC); o una combinación de los mismos.

Además, se divulga en el presente documento, en un aspecto, un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende:

- (a) introducir una solución polimerizable en el espacio tisular, en donde la solución polimerizable comprende:

- (i) un colágeno humano de origen vegetal reticulable;
- (ii) un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos; y
- (iii) un fotoiniciador; y

- (b) aplicar luz a la superficie de la epidermis superficial a dicho espacio para inducir la polimerización.

En un aspecto relacionado, los componentes de la solución polimerizable se introducen en el espacio tisular de forma independiente aproximadamente en la misma ubicación y aproximadamente al mismo tiempo, en donde el colágeno humano de origen vegetal reticulable y el fotoiniciador se introducen juntos e independientemente de dicho ácido hialurónico (HA) o derivado modificado del mismo, dicho poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, dicho polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o dicho modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o dicho derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o dicho derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o dicho derivado modificado de la

misma, carboximetilcelulosa o dicho derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o dicho derivado modificado de la misma, o dicha combinación de los mismos, se introducen en el espacio tisular de forma independiente aproximadamente al mismo tiempo. En otro aspecto relacionado, el método incluye además una etapa de moldeo o esculpido de la solución polimerizable o los componentes de la solución polimerizable, en una configuración deseada en el espacio tisular, en donde dicha etapa es concomitante con, o posterior a, la etapa de aplicación de luz.

En otro aspecto relacionado, los componentes de la solución polimerizable se introducen en el espacio tisular juntos como una mezcla, en donde el colágeno humano de origen vegetal reticulable y el fotoiniciador se introducen junto con dicho ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, o dicho poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, o dicho polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, o dicha celulosa oxidada (OC) o dicho derivado modificado de la misma, o dichas microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o dicho derivado modificado de las mismas, o dicho fosfato de tricalcio (TCP) o dicho derivado modificado del mismo, o dicha hidroxiapatita de calcio (CaHA) o dicho derivado modificado de la misma, o dicha carboximetilcelulosa o dicho derivado modificado de la misma, o dicha nanocelulosa cristalina (CNC) o dicho derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto relacionado, los componentes de la solución polimerizable se introducen en el espacio tisular de forma independiente entre sí, en donde el colágeno humano de origen vegetal reticulable y el fotoiniciador se introducen juntos e independientemente de ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, o dicho poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, o dicho polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, o dicha celulosa oxidada (OC) o dicho derivado modificado de la misma, o dichas microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o dicho derivado modificado de las mismas, o dicho fosfato de tricalcio (TCP) o dicho derivado modificado del mismo, o dicha hidroxiapatita de calcio (CaHA) o dicho derivado modificado de la misma, o dicha carboximetilcelulosa o dicho derivado modificado de la misma, o dicha nanocelulosa cristalina (CNC) o dicho derivado modificado de la misma, o dicha combinación de los mismos.

En otro aspecto relacionado, después de la introducción en el espacio tisular, el método incluye además una etapa de moldeo o esculpido de la solución polimerizable o los componentes de la solución polimerizable, en una configuración deseada en el espacio tisular, en donde dicha etapa es concomitante con, o posterior a, la etapa de aplicación de luz.

En otro aspecto relacionado, el método no es terapéutico, y la etapa de moldeo o esculpido reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o una combinación de los mismos.

En otro aspecto relacionado,

(a) el colágeno humano de origen vegetal reticulable es colágeno humano recombinante de tipo 1 con metacrilato o tiolato (rhcolágeno); o

(b) el derivado modificado de ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprende un derivado con metacrilato o tiolato; o

(c) el ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprenden un ácido hialurónico (HA) reticulado, poli(alcohol vinílico) (PVA) reticulado, polietilenglicol (PEG) reticulado, celulosa oxidada (OC) reticulada, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado, fosfato de tricalcio (TCP) reticulado, hidroxiapatita de calcio (CaHA) reticulada, carboximetilcelulosa reticulada o nanocelulosa cristalina (CNC) reticulada; o

(d) una combinación de (a) y (b), o (a) y (c).

En un aspecto relacionado adicional, cuando se selecciona MA-rhColágeno, y se selecciona ácido hialurónico o un derivado del mismo, o ácido hialurónico reticulado, la relación de HA con respecto a MA-rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En el presente documento se divulga, en un aspecto, un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende introducir un relleno dérmico doblemente reticulado en el espacio tisular, en donde el relleno dérmico doblemente reticulado comprende:

(a) un colágeno humano de origen vegetal; y

(b) un ácido hialurónico (HA) reticulado o un derivado reticulado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) reticulado o un derivado reticulado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) reticulado o un derivado reticulado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) reticulada o un derivado reticulado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado o un derivado reticulado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) reticulado o un derivado reticulado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) reticulada o un derivado reticulado modificado de la misma, carboximetilcelulosa reticulada o un derivado reticulado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) reticulada o un derivado reticulado modificado de la misma, o una combinación de los mismos;

en donde el colágeno humano de origen vegetal está reticulado con el ácido hialurónico (HA) reticulado o un derivado reticulado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) reticulado o un derivado reticulado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) reticulado o un derivado reticulado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) reticulada o un derivado reticulado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado o un derivado reticulado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) reticulado o un derivado reticulado modificado del mismo, hidroxapatita de calcio (CaHA) reticulada o un derivado reticulado modificado de la misma, carboximetilcelulosa reticulada o un derivado reticulado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) reticulada o un derivado reticulado modificado de la misma.

En un aspecto relacionado, el colágeno humano de origen vegetal es colágeno humano recombinante de tipo 1 (rhcolágeno), o un derivado con MA o con tiolato del mismo; o el derivado modificado de ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprende un derivado con metacrilato o tiolato; o una combinación de los mismos.

En otro aspecto relacionado, cuando se selecciona HA reticulado, la relación de HA reticulado con respecto al colágeno humano de origen vegetal es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En un aspecto relacionado, el método no es terapéutico y reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o una combinación de los mismos.

En el presente documento se divulga, en un aspecto, una solución polimerizable o no polimerizable para su uso en el aumento de tejido, en donde

(a) la solución polimerizable comprende un colágeno humano de origen vegetal reticulable y un fotoiniciador para inducir la polimerización antes de, de manera concomitante con, la aplicación de luz visible, o

(b) la solución no polimerizable comprende un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende un colágeno humano de origen vegetal y un ácido hialurónico reticulado o un PVA reticulado, o un PGE reticulado, o una OC reticulada, en donde el colágeno humano de origen vegetal está reticulado con el ácido hialurónico reticulado o el PVA reticulado, o un PGE reticulado, o una OC reticulada;

y dicho uso comprende inyectar dicha solución polimerizable o no polimerizable en un espacio tisular debajo de una epidermis, seguido de moldear o esculpir la solución polimerizable o no polimerizable en una configuración deseada para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices.

En un aspecto relacionado, el colágeno humano de origen vegetal reticulable tiene metacrilato o tiolato; o la solución polimerizable comprende además un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, o un derivado modificado fotopolimerizable del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, o un derivado modificado fotopolimerizable del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, o un derivado modificado fotopolimerizable del mismo, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, o un derivado modificado fotopolimerizable de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, o un derivado modificado fotopolimerizable del mismo, hidroxapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, o un derivado modificado fotopolimerizable de la misma, una carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, o un derivado modificado fotopolimerizable de la misma, una nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o un derivado modificado fotopolimerizable de la misma, o una combinación de los mismos, en donde, opcionalmente, el derivado del mismo comprende un derivado con metacrilato o tiolato; o una combinación de los mismos.

En otro aspecto relacionado, el aumento de tejido se requiere como resultado de cualquier afección médica o dental (implantes de encías/enfermedad de las encías). En un aspecto relacionado adicional, el aumento de tejido reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o una combinación de los mismos.

En el presente documento se divulga, en un aspecto, un método para inducir un armazón promotor del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende introducir una solución en el espacio tisular, comprendiendo la solución:

- (a) un colágeno humano de origen vegetal; y
- (b) al menos un factor de crecimiento o fuente del mismo;

en donde dicho método promueve la curación o el reemplazo de un tejido que comprende colágeno.

En un aspecto relacionado, el colágeno de origen vegetal comprende colágeno humano recombinante de tipo 1 (rhColágeno); o la fuente del al menos un factor de crecimiento comprende un plasma o un plasma rico en plaquetas; o el tejido que comprende colágeno comprende piel; o cualquier combinación de los mismos.

En otro aspecto, el método no es terapéutico y el almacén promotor del crecimiento celular rellena el espacio tisular reduciendo líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o una combinación de los mismos.

5 Se divulga en el presente documento, en un aspecto, una solución para su uso induciendo un almacén promotor del crecimiento celular, comprendiendo la solución un colágeno humano de origen vegetal y al menos un factor de crecimiento o fuente del mismo, en donde el uso comprende inyectar dicha solución en un espacio tisular debajo de una epidermis y en donde dicho uso es para promover la curación o el reemplazo debido a la degradación o lesión de un tejido cutáneo que comprende colágeno.

10 En un aspecto relacionado, el colágeno de origen vegetal comprende colágeno humano recombinante de tipo 1 (rhColágeno); o la fuente del al menos un factor de crecimiento comprende un plasma o un plasma rico en plaquetas; o el tejido que comprende colágeno comprende piel; o cualquier combinación de los mismos.

15 En otro aspecto relacionado, el rhColágeno comprende un derivado de metacrilato o tiol del mismo.

20 En un aspecto relacionado, la solución usada en el método comprende además un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos, y un fotoiniciador para inducir la polimerización antes de, de manera concomitante con, la aplicación de luz visible; o un ácido hialurónico reticulado o un PVA reticulado, o un PGE reticulado, o una OC reticulada, en donde el colágeno humano de origen vegetal está reticulado con el ácido hialurónico reticulado o el PVA reticulado, o un PGE reticulado, o una OC reticulada.

25 En un aspecto relacionado, el método no es terapéutico y el almacén promotor del crecimiento celular rellena el espacio tisular reduciendo líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o una combinación de los mismos.

30 En el presente documento se divulga una solución para su uso induciendo un almacén promotor del crecimiento celular, comprendiendo la solución un colágeno humano de origen vegetal y al menos un factor de crecimiento o fuente del mismo, en donde el uso comprende inyectar dicha solución en un espacio tisular debajo de una epidermis y en donde dicho uso es para promover la curación o el reemplazo debido a la degradación o lesión de un tejido que comprende colágeno.

35 En un aspecto relacionado, la fuente del al menos un factor de crecimiento comprende un plasma o un plasma rico en plaquetas; o el colágeno de origen vegetal comprende colágeno humano recombinante de tipo 1 (rhColágeno); o el tejido que comprende colágeno comprende piel; o una combinación de los mismos.

40 En otro aspecto relacionado, la solución para su uso comprende además un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos, y un fotoiniciador para inducir la polimerización antes de, de manera concomitante con, la aplicación de luz visible; o un ácido hialurónico reticulado o un PVA reticulado, o un PGE reticulado, o una OC reticulada, en donde el colágeno humano de origen vegetal está reticulado con el ácido hialurónico reticulado o el PVA reticulado, o un PGE reticulado, o una OC reticulada.

50 Se divulga en el presente documento, en un aspecto, un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende: (a) introducir una solución polimerizable en el espacio tisular, en donde la solución polimerizable comprende: (i) un colágeno humano de origen vegetal reticulado; y (ii) un fotoiniciador; y aplicar luz a la superficie de la epidermis superficial a dicho espacio para inducir la polimerización.

55 En un aspecto relacionado, la solución polimerizable incluye además una etapa de moldear o esculpir la solución polimerizable en una configuración deseada en el espacio tisular, en donde dicha etapa es concomitante con, o posterior a, la etapa de aplicación de luz.

60 En otro aspecto relacionado, el método no es terapéutico, y la etapa de moldeo o esculpido reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o una combinación de los mismos.

65 En otro aspecto relacionado, el colágeno humano de origen vegetal reticulado es colágeno humano recombinante de tipo 1 con metacrilato o tiolato (rhcolágeno).

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente

descripción y de los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

5 Las figuras 1a-1d ilustran la construcción de diversos casetes de expresión y vectores usados previamente para transformar plantas de prueba. Todas las secuencias codificantes sintetizadas como parte del estudio se optimizaron para su expresión en tabaco. La figura 1a muestra un esquema de clonación de la cadena alfa I de colágeno de tipo I o la cadena alfa 2 de colágeno de tipo II en un vector de expresión vegetal de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención; la figura 1b muestra un esquema de clonación de la enzima prolil-4-hidroxilasa (P4H) en un vector de expresión vegetal de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención; la figura 1c muestra un esquema de clonación de proteinasa C o proteinasa N en un vector de expresión vegetal de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención; la figura 1d muestra un esquema de clonación de lisil hidroxilasa 3 (LH3) en un vector de expresión vegetal de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

10 La figura 2 ilustra diversos enfoques de cotransformación usados previamente. Cada casete de expresión está representado por el nombre corto de la secuencia codificante. Las secuencias codificantes se especifican en la Tabla 1. Cada cotransformación se realizó mediante dos vectores binarios pBINPLUS. Cada rectángulo representa un único vector pBINPLUS que lleva uno, dos o tres casetes de expresión. El promotor y los terminadores se especifican en el Ejemplo 1.

15 La figura 3 es un cribado de PCR múltiple anterior de transformantes que muestra plantas que fueron positivas para colágeno alfa 1 (fragmento de 324 pb) o colágeno alfa 2 (fragmento de 537 pb), o ambos.

20 La figura 4 es un análisis de transferencia de Western anterior de plantas transgénicas generadas por las cotransformaciones 2, 3 y 4. Las proteínas solubles totales se extrajeron de los cotransformantes de tabaco n.º 2, n.º 3 y n.º 4 y se ensayaron con anticuerpo anti colágeno I (n.º AB745 de Chemicon Inc.). Los marcadores de tamaño fueron n.º SM0671 de Fermentas Inc. W.T. es un tabaco de tipo natural. Las bandas de colágeno positivas son visibles en plantas que son positivas por PCR para el colágeno de tipo I alfa 1 o alfa 2, o ambos. La banda de control positiva de 500 ng de colágeno de tipo I de placenta humana (n.º CC050 de Chemicon Inc., extraída de placenta humana por digestión con pepsina) representa aproximadamente el 0,3 % de las proteínas solubles totales (aproximadamente 150 µg) en las muestras de las plantas transgénicas. La banda más grande, de aproximadamente 140 kDa en la muestra de colágeno humano, es un procolágeno con su propéptido C, tal como se detectó mediante el anticuerpo anti propéptido del extremo carboxi de colágeno de tipo I (n.º MAB1913 de Chemicon Inc.). La banda más pequeña, de aproximadamente 120 kDa en la muestra de colágeno humano, es un colágeno sin propéptidos. Debido a su composición inusual, las proteínas ricas en prolina (incluyendo los colágenos) migran sistemáticamente en geles de poliacrilamida como bandas con una masa molecular superior a la esperada. Por lo tanto, las cadenas de colágeno sin propéptidos con un peso molecular de aproximadamente 95 kDa migran como una banda de aproximadamente 120 kDa.

25 La figura 5 es un análisis de transferencia de Western anterior de una planta transgénica generada por la cotransformación n.º 8 (que lleva señales de apoplasto fusionadas traduccionalmente a las cadenas de colágeno). Las proteínas solubles totales se extrajeron de hojas de tabaco transgénico y se ensayaron con el anticuerpo anti colágeno I (n.º AB745 de Chemicon Inc.). La banda de colágeno alfa 2 positiva es visible en la planta 8-141. El colágeno de tipo I de placenta humana (n.º CC050 de Chemicon Inc.) sirvió como control.

30 Las figuras 6a y 6b ilustran el ensamblaje de triple hélice de colágeno y la estabilidad térmica según lo calificado previamente por tratamiento térmico y digestión con tripsina o pepsina. En la figura 6a, la proteína soluble total del tabaco 2-9 (que expresa solo col alfa1 y no P4H) y 3-5 (que expresa tanto col alfa 1+2 como subunidades alfa y beta de P4H humana) se sometieron a tratamiento térmico (15 minutos a 38 °C o 43 °C) seguido de digestión con tripsina (20 minutos a temperatura ambiente [TA]) y se ensayaron con el anticuerpo anti colágeno I en un procedimiento de transferencia de Western. Los controles positivos fueron muestras de 500 ng de colágeno humano I + proteínas solubles totales de tabaco w.t. En la figura 6b, las proteínas solubles totales se extrajeron del tabaco transgénico 13-6 (que expresa las cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno I, señaladas con flechas, subunidades alfa y beta de P4H humana y LH3 humana) y se sometieron a un tratamiento térmico (20 minutos a 33 °C, 38 °C o 42 °C), se enfriaron inmediatamente en hielo para evitar el reensamblaje de la triple hélice y se incubaron con pepsina durante 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C) seguido de pruebas con anticuerpo anti colágeno I ((n.º AB745 de Chemicon Inc.) en un procedimiento estándar de transferencia de Western. El control positivo fue una muestra de 50 ng de colágeno I humano (n.º CC050 de Chemicon Inc., extraído de placenta humana mediante digestión con pepsina) que se añadió a las proteínas solubles totales extraídas del tabaco de tipo natural (w.t., wt).

35 La figura 7 ilustra un análisis de transferencia Northern anterior realizado en tabaco de tipo natural. Las transferencias se analizaron con ADNc de P4H de tabaco.

40 La figura 8 es un análisis de transferencia de Western anterior de plantas transgénicas generadas por las cotransformaciones 2, 3 y 13. La proteína soluble total se extrajo de los cotransformantes de tabaco y se ensayó con anticuerpos anti P4H humana alfa y beta y anti colágeno I.

45 La figura 9 es un análisis de transferencia de Western anterior del (carril 1) cruza de plantas con direccionamiento vacuolar A (2-300 +20-279) cultivadas bajo un régimen de luz normal; y 13-652 plantas con direccionamiento vacuolar cultivadas durante 8 días en la oscuridad. Todas las plantas expresan col1, col2, P4H-alfa y P4H-beta exógenos, así como LH3 (PCR validada).

50 La figura 10 muestra colágeno purificado procedente de hojas de tabaco después de la digestión con tripsina. El

colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-6 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó, se sometió a proteólisis y se precipitó en un tampón de alta concentración de sal, como se detalla en la sección Materiales y métodos. Después de la resuspensión, los sedimentos que contenían colágeno se lavaron, se dializaron y se concentraron hasta obtener el producto final. Este gel representa un análisis de tinción de Coomassie de las muestras de colágeno recogidas, donde los carriles 1 y 2 son el colágeno resultante después de la digestión de procolágeno con 300 mg/l de tripsina. Se cargó colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (0,5 mg/ml) y se ejecutó como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno de tipo 1. La figura 11 muestra colágeno purificado procedente de hojas de tabaco después de la digestión con concentraciones variables de tripsina. El colágeno se extrajo y se purificó como en la figura 10 después de la digestión con 20 mg/l de tripsina (carriles 1-7) o 30 mg/l (carriles 8-10). Los productos se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se analizaron con una solución de tinción a base de Coomassie. Se cargó colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (0,5 mg/ml) y se ejecutó como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno de tipo 1.

La figura 12 muestra colágeno purificado procedente de hojas de tabaco después de la digestión con tripsina y pepsina. El colágeno se extrajo y se purificó como en la figura 10 después de la digestión con 30 mg/l de tripsina y 1 µg/200 ml de pepsina (carriles 1-2). Los productos se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se analizaron con una solución de tinción a base de Coomassie. Se cargó colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (0,5 mg/ml) y se ejecutó como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno de tipo 1.

La figura 13 muestra las cadenas de colágeno obtenidas tras la digestión de procolágeno con subtilisina o bromelaina. El colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-361 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó y se sometió a proteólisis con subtilisina (1-25 mg/l) o bromelaina (1-25 mg/l) y se incubó durante 3 o 6 h. Las muestras se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las cadenas de colágeno se inmunodetectaron usando anti colágeno I. Los sobrenadantes no tratados recogidos después de la homogeneización y la centrifugación sirvieron como controles negativos sin colágeno (carril 3-4sob.). El colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (2,5 µg) sirvió como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 (carril 1).

La figura 14 muestra las cadenas de colágeno obtenidas tras la digestión de procolágeno con papaína. El colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-361 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó y se sometió a proteólisis con papaína (1-25 mg/l) durante un período de incubación de 3 o 6 h. Las muestras se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las cadenas de colágeno se inmunodetectaron usando anti colágeno I. Los sobrenadantes no tratados recogidos después de la homogeneización, centrifugación e incubación a 15 °C durante 3 h (carril 3) o 6 h (carril 2) sin enzima sirvieron como controles negativos sin colágeno. El colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (2,5 µg) sirvió como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 (carril 1).

La figura 15 muestra las cadenas de colágeno obtenidas tras la digestión de procolágeno con ficina o savinasa. El colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-361 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó y se sometió a proteólisis con ficina (1-25 mg/l) o savinasa (1-25 mg/l) durante un período de incubación de 3 o 6 h. Las muestras se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las cadenas de colágeno se inmunodetectaron usando anti colágeno I. Los sobrenadantes no tratados recogidos antes de la proteólisis sirvieron como muestra de control sin colágeno (carril 3). El colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (2,5 µg) sirvió como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 (carril 1).

La figura 16 muestra las cadenas de colágeno obtenidas tras la digestión de procolágeno con protamex o alcalasa. El colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-361 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó y se sometió a proteólisis con protamex (1-25 mg/l) o alcalasa (1-25 mg/l) durante un período de incubación de 3 o 6 h. Las muestras se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las cadenas de colágeno se inmunodetectaron usando anti colágeno I. Los sobrenadantes no tratados recogidos antes de la proteólisis sirvieron como muestra de control sin colágeno (carril 14). El colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (2,5 µg) sirvió como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 (carril 1).

La figura 17 muestra las cadenas de colágeno obtenidas tras la digestión de procolágeno con esperasa o neutrasa. El colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-361 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó y se sometió a proteólisis con esperasa (1-25 mg/l) o neutrasa (1-25 mg/l) después de un período de incubación de 3 o 6 h. Las muestras se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las cadenas de colágeno se inmunodetectaron usando anti colágeno I. El colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (2,5 µg) sirvió como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 (carril 1).

La figura 18 muestra las cadenas de colágeno obtenidas tras la digestión de procolágeno con esperasa 8.0 L o alcalasa. El colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-361 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó y se sometió a proteólisis con esperasa (1-25 mg/l) o neutrasa (1-25 mg/l) después de un período de incubación de 3 o 6 h. Las muestras se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las cadenas de colágeno se inmunodetectaron usando anti colágeno I. Los sobrenadantes no tratados recogidos después de la homogeneización, centrifugación e incubación a 15 °C durante 3 h (carril 3) o 6 h (carril 2) sin enzima proteolítica sirvieron como controles negativos sin colágeno. El colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (2,5 µg) sirvió como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 (carril 1).

La figura 19 muestra las cadenas de colágeno obtenidas en diversas etapas de purificación después de la digestión del procolágeno con ficina. El colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-361 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó y se sometió a proteólisis con ficina (5 mg/l) después de un período de incubación de 3 h a 15 °C. Las muestras se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las cadenas de colágeno se inmunodetectaron usando anti colágeno I. Las muestras recogidas después de la molienda, centrifugación e incubación del sobrenadante con ficina se cargaron en el carril 5. Los carriles 6-14 representan muestras de colágeno tratado con ficina en diferentes etapas del proceso de purificación: carril 6: muestra posterior a la incubación y centrifugación con ficina; carril 7: después de la precipitación con sal y resuspensión en ácido acético 0,5 M; carril 8: muestra como en el carril 7 con una etapa de centrifugación adicional; carril 9: muestra como en el carril 8 después de la resuspensión en ácido acético 0,5 M y centrifugación; carril 10: colágeno maduro después de la resuspensión en HCl 10 mM y diálisis; carril 11: muestra como en el carril 10 con una etapa de filtración adicional; carril 12: muestra como en el carril 11 con una etapa de concentración 5x adicional; carril 13: muestra como en el carril 11 con una etapa de concentración 20x adicional; carril 14: muestra como en el carril 13 con una etapa de concentración 5x adicional. Las muestras de procolágeno sin tratar (carriles 3-4) sirvieron como controles negativos. El colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (2,5 µg) sirvió como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 (carril 1).

La figura 20 muestra las cadenas de colágeno obtenidas en diversas etapas de purificación después de la digestión del procolágeno con ficina. El colágeno se purificó a partir de la línea foliar transgénica de la planta de tabaco número 13-361 molida en tampón Tris 100 mM, se centrifugó y se sometió a proteólisis con ficina (5 mg/l) después de un período de incubación de 3 h a 15 °C. Las muestras se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las cadenas de colágeno se inmunodetectaron usando anti colágeno I. Las muestras recogidas después de la molienda, centrifugación e incubación del sobrenadante con ficina se cargaron en el carril 5. Los carriles 6-14 representan muestras de colágeno tratado con ficina en diferentes etapas del proceso de purificación: carril 6: muestra posterior a la incubación y centrifugación con ficina; carril 7: después de la precipitación con sal y resuspensión en ácido acético 0,5 M; carril 8: muestra como en el carril 7 con una etapa de centrifugación adicional; carril 9: muestra como en el carril 8 después de la resuspensión en ácido acético 0,5 M y centrifugación; carril 10: colágeno maduro después de la resuspensión en HCl 10 mM y diálisis; carril 11: muestra como en el carril 10 con una etapa de filtración adicional; carril 12: muestra como en el carril 11 con una etapa de concentración 5x adicional; carril 13: muestra como en el carril 11 con una etapa de concentración 20x adicional; carril 14: muestra como en el carril 13 con una etapa de concentración 5x adicional. Las muestras de procolágeno sin tratar (carriles 3-4) sirvieron como controles negativos. El colágeno procedente de cerdo sin propéptidos (2,5 µg) sirvió como control positivo para las cadenas alfa 1 y alfa 2 (carril 1).

La figura 21 muestra el contenido de colágeno de las muestras tratadas posteriormente con ficina en las diversas etapas de purificación. Las muestras que contenían colágeno se recogieron en cada etapa de extracción y purificación de un procedimiento de purificación basado en AMS del tamaño de reactor descrito en la sección de Material y métodos. Las muestras se trataron con ficina (5 mg/l, 15 °C, 3 h) para la eliminación de propéptidos, se separaron en una SDS PAGE al 10 % y se tiñeron con una solución de tinción a base de Coomassie.

La figura 22 muestra la optimización de la escisión del procolágeno mediante ficina de calidad alimentaria: optimización de la concentración de ficina y tiempo de reacción. Los extractos de hojas de tabaco que expresan procolágeno granulados con AMS se suspendieron de nuevo en un tampón de extracción y a continuación se incubaron con concentraciones crecientes de ficina de calidad alimentaria (5-15 mg/l). A continuación, las mezclas de reacción se incubaron a 15 °C durante 1-3 horas. La escisión se terminó mediante centrifugación y las muestras de proteína se separaron en SDS-PAGE al 8 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se inmunotransfirieron para cadenas alfa-1 y alfa-2 de colágeno con anti colágeno I. Las bandas de procolágeno se indican con flechas de color blanco, mientras que las flechas de color rojo indican bandas de colágeno escindidas. Las figuras 23a-c muestran la optimización de la escisión de procolágeno por ficina de calidad farmacéutica: optimización de la concentración de ficina y tiempo de reacción. Los extractos de hojas de tabaco que expresan procolágeno granulados con AMS se suspendieron de nuevo en un tampón de extracción y a continuación se incubaron con concentraciones crecientes de ficina de calidad farmacéutica (2,5-10 mg/l). A continuación, las mezclas de reacción se incubaron a 15 °C durante 0,5-3 horas. La escisión se terminó mediante centrifugación y las muestras de proteína se separaron en SDS-PAGE al 8 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se inmunotransfirieron para cadenas alfa-1 y alfa-2 de colágeno con anti colágeno I. Las flechas indican la banda de procolágeno y las bandas de colágeno.

Las figuras 24a-b muestran la optimización de la escisión de procolágeno por ficina de calidad farmacéutica: optimización del pH y las concentraciones de sal en el tampón de reacción. Los extractos de hojas de tabaco que expresan procolágeno granulados con AMS se suspendieron de nuevo en un tampón de extracción que contenía 10 mg/l de ficina de calidad farmacéutica a distintos valores de pH (5,5-9,5) y con concentraciones crecientes de NaCl (0,5-3 M). A continuación, las mezclas de reacción se incubaron a 15 °C durante 1 hora. La escisión se terminó por centrifugación y las muestras de proteínas de los sedimentos resultantes y los sobrenadantes se separaron en SDS-PAGE al 8 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se inmunotransfirieron para cadenas alfa-1 y alfa-2 de colágeno con anti colágeno I. Las flechas indican las bandas de colágeno.

La figura 25 muestra la optimización de la escisión de procolágeno con ficina de calidad farmacéutica: optimización de las concentraciones de EDTA y L-cisteína en el tampón de reacción. Los extractos de hojas de tabaco que expresan procolágeno granulados con AMS se suspendieron de nuevo en un tampón de extracción (pH 7,5) que contenía concentraciones variables de L-cisteína (10-100 mM, panel superior de concentraciones) y de EDTA (8-80 mM, panel inferior de concentraciones). A continuación, las muestras se incubaron con 1 mg/l de ficina de

calidad farmacéutica a 15 °C durante 1 h. La escisión se terminó mediante centrifugación y las muestras de proteína se separaron en SDS-PAGE al 8 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se inmunotransfirieron para cadenas alfa-1 y alfa-2 de colágeno con anti colágeno I.

La figura 26 muestra una digestión eficaz del procolágeno por tripsina recombinante a pH 7,5. Los extractos de hojas de tabaco que expresan procolágeno granulados con AMS se suspendieron de nuevo en un tampón de extracción (pH 7,5) que contenía L-cisteína y EDTA. A continuación, las muestras se incubaron con 30-100 mg/l de tripsina recombinante a 15 °C durante 1-3 h. La escisión se terminó mediante centrifugación y las muestras de proteína se separaron en SDS-PAGE al 8 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se inmunotransfirieron para cadenas alfa-1 y alfa-2 de colágeno con anti colágeno I.

La figura 27 muestra la viscosidad (η , cP) en función de la velocidad de corte, línea continua: 2,7 mg/ml de colágeno bovino en solución salina tamponada con fosfato (PBS), línea discontinua: 2,79 mg/ml de rhColágeno en PBS. ▼: mediciones a 4 °C, ▲: mediciones a 37 °C.

La figura 28 muestra la viscosidad en función de la velocidad de corte, 3,4 mg/ml de colágeno bovino en FB. ▼: mediciones a 4 °C, ▲: mediciones a 37 °C.

La figura 29 muestra la viscosidad en función de la velocidad de corte, 10 mg/ml de rhColágeno-MA en PBS. A: mediciones a 4 °C, ▼: mediciones a 37 °C.

La figura 30 muestra mediciones de viscosidad de rhColágeno-MA en DMEM con y sin adición de HA/HAMA.

La figura 31 muestra los módulos de almacenamiento y pérdida y el ángulo de desplazamiento de fase tan δ de la formulación de rhColágeno-MA a diferentes concentraciones antes (gráfico superior) y después (gráfico inferior) de la fotoreticulación.

La figura 32 muestra los valores de G' y G'' a 37 °C registrados en la prueba de barrido de frecuencia y representados gráficamente a 1 Hz.

Las figuras 33A-33C proporcionan un diagrama de flujo para el procesamiento de rhColágeno y metacrilato de rhColágeno. La figura 33A muestra el aislamiento y procesamiento cadena arriba de procolágeno y colágeno (etapas A-H). Las figuras 33B-33C muestran dos fases de procesamiento cadena abajo (respectivamente, etapas I-M y etapas N-P y Z).

La figura 34 muestra la viscosidad (η , cP) de 5 mg/ml de metacrilato de rhColágeno (ColMA) (curva de color negro continua) y 5 mg/ml de MA de colágeno + metacrilato de alcohol polivinílico (PVMA) (curvas de color gris claro) en una relación de ColMA:PVMA de 5:1 (curva continua), 2:1 (curva discontinua), 1:2 (curva con línea de puntos). Se informa la viscosidad de 5 mg/ml de metacrilato de rhColágeno a modo de comparación (curva de color negro).

La figura 35 muestra la viscosidad de 5 mg/ml de ColMA (curva de color negro continua) y 5 mg/ml de MA de colágeno + metacrilato de ácido hialurónico (HAMA) (curvas de color gris) en una relación de ColMA:HAMA de 5:1 (curva continua), 2:1 (curva discontinua). Se informa la viscosidad de 5 mg/ml de metacrilato de rhColágeno a modo de comparación (curva de color negro continua). Estos materiales aún no están reticulados, pero lo estarían después de la inyección. La viscosidad es representativa de la inyectabilidad de los materiales. (HAMA - metacrilato de HA; MA de colágeno (ColMA) - metacrilato de rhColágeno).

La figura 36 muestra la viscosidad de 5 mg/ml de ColMA (curva de color negro continua) y 5 mg/ml de MA de colágeno + celulosa oxidada (OC) (curvas de color gris) en una relación de ColMA:OC de 5:1 (curva continua), 2:1 (curva discontinua), 1:2 (curva con línea de puntos). Se informa la viscosidad de 5 mg/ml de metacrilato de rhColágeno a modo de comparación (curva de color negro continua).

La figura 37 proporciona una comparación de los datos de las figuras 33-35. Muestra la viscosidad de 5 mg/ml de ColMA (curva de color negro continua) y 5 mg/ml de MA de colágeno + diferentes aditivos (curvas de color gris claro a gris oscuro como se indica en la figura) en una relación de 5:1 (curvas continuas), 2:1 (curvas discontinuas), 1:2 (curvas con línea de puntos). Se informa la viscosidad de 5 mg/ml de metacrilato de rhColágeno a modo de comparación (curva de color negro continua).

La figura 38 muestra estructuras polimerizadas de metacrilato de rhColágeno (ColMA) + aditivos en una relación de ColMA:aditivo de 2:1. Se comparó ColMA solo con ColMA combinado con metacrilato de alcohol polivinílico (PVMA), metacrilato de ácido hialurónico (HAMA) o celulosa oxidada (OC). Las soluciones se mezclaron con el fotoiniciador 2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (0,1 %) y se iluminaron durante 20 s con luz ultravioleta (UV) (365 nm).

La figura 39 muestra estudios de viabilidad. Gráfico superior: Comparación de la viabilidad (y proliferación) de fibroblastos humanos normales (nHDF) cuando se cultivan en presencia de GF liberados de la matriz de rhColágeno-PRP (negro), en presencia de GF liberados de PRP activado (gris) y cuando se cultivan en condiciones de inanición (blanco). Los datos son un promedio de dos ensayos de proliferación de fibroblastos diferentes realizados con PRP extraído de 2 donantes diferentes. *Diferencia significativa ($p < 0,0002$). Recuadro inferior: Imágenes de microscopio de células nHDF proliferadas en presencia de GF liberados de la matriz de rhColágeno combinada con PRP (A), en presencia de GF liberados de PRP activado (B) y cuando se cultivan en condiciones de inanición (C). Las imágenes se tomaron 7 días después de que se sembraran las células.

La figura 40 muestra el peso del armazón en función del tiempo (cada punto es un promedio de 6 armazones, 2 ratas por punto temporal, 3 inyecciones por rata).

Las figuras 41A-41B muestran dos estudios que usan un modelo de rata subcutáneo. (A) Contenido de PDGF en función del tiempo (B) Contenido de VEGF en función del tiempo en un modelo de rata subcutáneo. *Diferencia significativa entre la matriz de rhColágeno combinada con PRP y PRP solo ($p < 0,038$) y entre la matriz de rhColágeno sola y PRP solo ($p < 0,004$). ** Diferencia significativa ($p < 0,021$) entre la matriz de rhColágeno sola y PRP solo y entre la matriz de rhColágeno sola y la matriz de rhColágeno combinada con PRP (A), y entre la matriz

de rhColágeno combinada con PRP y PRP solo y la matriz de rhColágeno combinada con PRP y la matriz de rhColágeno sola ($p < 0,007$) (B).

La figura 42 muestra la integración del contenido nominal de PDGF y VEGF en las matrices inyectadas durante 45 (o 30) días en un modelo de rata.

Las figuras 43A-43C muestran la puntuación histopatológica de los tendones de Aquiles en un modelo de rata de tendinopatía tratada con PRP o matriz de rhColágeno-PRP. (A) Fibrosis madura, (B) presencia de células inflamatorias mononucleares y (C) presencia de tejido de granulación inmaduro.

La figura 44 muestra una comparación de la fuerza de expresión (newtons, N) necesaria para inyecciones de ácido hialurónico (HA) reticulado (curva de color negro $\square$), ácido hialurónico (HA) reticulado + colágeno monomérico ($\blacktriangledown$), o ácido hialurónico (HA) reticulado + colágeno fibrilado (A) a partir de una aguja de calibre 32 y una jeringa de 1 ml (Becton Dickinson [BD], ref. 309628). El HA reticulado + colágeno monomérico y el HA reticulado + colágeno fibrilado son redes semiinterpenetradas, en donde el colágeno no está reticulado con nada.

La figura 45 muestra una comparación de la fuerza de expresión (newtons, N) necesaria para inyecciones de ácido hialurónico (HA) reticulado (negro) o una red doblemente reticulada de ácido hialurónico (HA) reticulado y colágeno (gris) a partir de una aguja de calibre 32 y una jeringa de 1 ml (Becton Dickinson [BD], ref. 309628).

La figura 46 muestra una comparación de la viscosidad (η , cP) del ácido hialurónico (HA) reticulado (negro), ácido hialurónico (HA) reticulado + colágeno monomérico ($\blacktriangledown$), o ácido hialurónico (HA) reticulado + colágeno fibrilado ($\blacktriangle$).

La figura 47 muestra una comparación de la viscosidad (η , cP) del ácido hialurónico (HA) reticulado (negro) o una red doblemente reticulada de ácido hialurónico (HA) reticulado y colágeno (gris).

Las figuras 48A-B muestran fotografías de (A) un parche de ratón colocado sobre una solución de colágeno con metacrilato (ColMA/rhColágenoMA) y (B) colágeno con metacrilato (ColMA/rhColágenoMA) polimerizado e integrado en el tejido cutáneo tras la iluminación con una linterna de diodo emisor de luz (LED) color blanco a través de la piel.

La figura 49 muestra dos ejemplos de componentes de relleno dérmico. En el lado izquierdo hay un esquema de un relleno dérmico semiinterpenetrado que comprende ácido hialurónico (HA) reticulado y rhColágeno. En el lado derecho hay un esquema del relleno dérmico doblemente reticulado que comprende ácido hialurónico reticulado y rhColágeno, en donde el HA reticulado se reticula además con el rhColágeno. Las barras de color gris claro indican el agente de reticulación de HA, las hebras de color negro representan el HA, el rhColágeno se representa como hebras delgadas de color gris, y el segundo agente de reticulación, que reticula el HA reticulado con el rhColágeno, en forma de círculos de color negro.

La figura 50 muestra un gráfico que representa mediciones reológicas de módulos de almacenamiento y pérdida para diversas formulaciones de doblemente reticuladas medidas usando un instrumento HAAKE-RHEO STRESS 600™ (THERMO SCIENTIFIC™) usando una configuración de cono (1 grado) frente a una configuración de placa (C35/1). Las mediciones de barrido de frecuencia se realizaron a una deformación constante del 0,8 % y una frecuencia que variaba de 0,02-100 Hz. Módulos de almacenamiento (líneas continuas) y pérdida (líneas discontinuas) de formulaciones doblemente reticuladas representativas (véase la Tabla 7) en comparación con un relleno dérmico disponible comercialmente (líneas continuas y discontinuas: negro de línea continua - producto disponible comercialmente; $\blacktriangledown$ de línea continua - formulación 2; $\square$ de línea continua - formulación 2A; pentágono ascendente de línea continua - Formulación 3; pentágono descendente de línea continua - Formulación 1A; $\circ$ de línea continua - Formulación 1; A de línea discontinua - producto comercialmente disponible G'; $\blacktriangledown$ de línea discontinua - Formulación 2G'; $\square$ de línea discontinua - Formulación 2A-G'; $\circ$ de línea discontinua - Formulación 1G'; pentágono descendente de línea discontinua - Formulación 1A G'; pentágono ascendente de línea discontinua - Formulación 3').

La figura 51 muestra un gráfico que representa una comparación a $f = 1$ Hz de los módulos de almacenamiento y pérdida de las formulaciones informadas en la figura 50. (barras de color blanco G' [Pa]; barras de color gris G'' [Pa])

La figura 52 muestra un gráfico que representa la inyectabilidad de formulaciones doblemente reticuladas seleccionadas medidas usando una máquina de prueba de compresión MULTI-TEST 1-i MECMESIN™ con jeringas LUER-LOK™ de 1 ml (BECTON-DICKINSON™) y agujas 30G usadas para las Formulaciones 2, 2A y 3 (Tabla 8). El relleno dérmico disponible comercialmente se incluye con fines comparativos con las formulaciones doblemente reticuladas. La fuerza expresada en función del desplazamiento del émbolo (12 mm/min) de formulaciones doblemente reticuladas representativas se comparó con un relleno dérmico disponible comercialmente. (A de color negro Relleno dérmico disponible comercialmente; $\square$ de color gris - Formulación 3; Pentágono ascendente de color gris - Formulación 2; $\blacktriangledown$ de color gris - Formulación 2A)

La figura 53 muestra un gráfico que representa las mediciones reológicas de los módulos de almacenamiento y pérdida para diversas combinaciones (véase la Tabla 10) de ácido hialurónico (HA) altamente reticulado, metacrilato de rhColágeno (MA) y/o rhColágeno antes (líneas discontinuas) y después (líneas continuas) del fotocurado con luz visible, en comparación con el HA altamente reticulado (línea discontinua de color negro, triángulo lateral). Antes del fotocurado, los módulos de almacenamiento y pérdida se midieron usando un instrumento HAAKE-RHEO STRESS 600™ (THERMO SCIENTIFIC™) usando una configuración de cono (1 grado) frente a una configuración de placa (C35/1). Las mediciones de barrido de frecuencia se realizaron a una deformación constante del 0,8 %, con una frecuencia que variaba entre 0,02-100 Hz. Después del fotocurado (iluminación de luz visible con una linterna LED blanca durante 6 minutos), los módulos de almacenamiento y pérdida se midieron usando un instrumento HAAKE-RHEO STRESS 600™ (THERMO SCIENTIFIC™) usando una configuración de placa dentada frente a placa (PP20). Se realizaron mediciones de barrido de frecuencia a una

tensión de corte constante de 3 Pa, con una frecuencia que variaba entre 0,02-100 Hz, bajo una carga normal constante de 0,3 N. (▲ de línea continua - Formulación 4-después; ▼ de línea continua - Formulación 5-después; □ de línea continua - Formulación 6-después; Pentágono ascendente de línea discontinua - Formulación 4-antes; Pentágono descendente de línea discontinua - Formulación 5-antes; o de línea discontinua - Formulación 6-antes; Triángulo lateral de línea de puntos discontinua (HA altamente reticulado)

La figura 54 muestra un gráfico que representa una comparación de los módulos de almacenamiento y pérdida antes y después del fotocurado de las formulaciones 4, 5 y 6 de la Tabla 10, así como HA altamente reticulado no curable, a una frecuencia de $F = 1$ Hz. (Barra de color blanco G' [Pa]; Barra de color gris G'' [Pa])

La figura 55 muestra un gráfico que representa la inyectabilidad de formulaciones doblemente reticuladas seleccionadas medidas usando una máquina de prueba de compresión MULTI-TEST 1-i MECMESIN™ con jeringas LUER-LOK™ de 1 ml (BECTON-DICKINSON™) y agujas 30G usadas para todas las muestras. La fuerza expresada en función del desplazamiento del émbolo (12 mm/min) de formulaciones doblemente reticuladas representativas se comparó con HA altamente reticulado. (▲ de color negro - HA altamente reticulado; ▼ de color gris - Formulación 4; □ de color gris - Formulación 5; ○ de color gris - Formulación 6)

La figura 56 presenta imágenes histológicas representativas el día 7 después de la inyección subcutánea de las Formulaciones 2, 2A y control (relleno dérmico disponible comercialmente) en la espalda de ratas Sprague Dawley. En cada caso, la flecha señala una reacción de inflamación mejorada en las Formulaciones 2 y 2A (no grave) que indica el inicio de la regeneración tisular.

La figura 57 presenta la puntuación histológica el día 7 de la Formulación 2, 2A y el control del tejido analizado en la figura 56. (Negro - control; gris claro - Formulación 2; gris oscuro - Formulación 2A)

La figura 58 presenta los resultados de la puntuación histológica de los rellenos dérmicos fotocurables el día 7, el día 14 y el día 20. (Negro - control, HA altamente reticulado; Gris - Formulación 4, HA altamente reticulado y rhColMA)

La figura 59 presenta los resultados de la puntuación de fibrosis el día 7 y el día 14 después de las inyecciones de la Formulación 4 (Gris - HA altamente reticulado + rhColMA) frente al control (Negro - HA altamente reticulado).

Descripción más detallada

En el presente documento se divulgan rellenos dérmicos fotoiniciados y rellenos dérmicos doblemente reticulados, y estructuras promotoras del crecimiento celular, y métodos para usar los mismos, por ejemplo, pero sin limitación, para el aumento de tejido blando. Cualquier referencia a la invención que proporcione un método de tratamiento debe interpretarse como una referencia a composiciones para su uso en dicho método.

Las plantas productoras de colágeno se pueden usar para producir cadenas de colágeno, así como colágeno, pero dichas cadenas están hidroxiladas incorrectamente y, por lo tanto, el autoensamblaje de las mismas, ya sea en plantas o no, conduce a un colágeno que es inherentemente inestable en contraste con el colágeno humano de origen vegetal de la presente solicitud.

Al reducir las presentes soluciones polimerizables y doblemente reticuladas, y los métodos de uso, a la práctica, los profesionales han ideado un enfoque de expresión vegetal que asegura la hidroxilación correcta de las cadenas de colágeno y, por lo tanto, permite la producción en las plantas de colágeno que imite estrechamente las características (p. ej., estructura molecular, estabilidad de temperatura, interacciones celulares) del colágeno humano de tipo I.

En un aspecto, se divulga en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende:

(a) introducir una solución polimerizable en el espacio tisular, comprendiendo la solución polimerizable:

- (i) un colágeno humano de origen vegetal reticulable; y
- (ii) un fotoiniciador; y

(b) aplicar luz a la superficie de la epidermis superficial a dicho espacio para inducir la polimerización.

En un aspecto particular, el método comprende además, antes de, o concomitante con, la etapa de aplicar luz, moldear o esculpir la solución polimerizable en una configuración deseada en el espacio tisular. En otro aspecto particular, la etapa de moldeado o esculpido reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices.

Aún en otro aspecto particular, la solución de polímero comprende además un relleno que comprende un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos. En un aspecto particular, el colágeno humano aislado de origen vegetal se formula opcionalmente, tal como con ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa, nanocelulosa cristalina (CNC) o una combinación de los mismos.

Los derivados modificados incluyen, pero sin limitación, versiones fotopolimerizables de, p. ej., HA, PVA, PEG u OC.

Las modificaciones incluyen, pero sin limitación, metacrilación o tiolación. En otro aspecto particular más, la fuente de luz se selecciona de diodo emisor de luz (LED), láser, una lámpara de xenón y similares.

En algún aspecto, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación solo consigo mismo. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con rhColágeno con tiolato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con cualquier aditivo de MA/con tiolato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con HA con metacrilato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con HA con tiolato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con PVA con metacrilato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con PVA con tiolato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con PEG con metacrilato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con PEG con tiolato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con OC con metacrilato. En algunos aspectos, en las formulaciones divulgadas en el presente documento, el metacrilato de rhColágeno se reticula en condiciones de iluminación con OC con tiolato.

Un experto en la técnica apreciaría que una formulación fotocurable es en realidad una IPN semicurable antes del curado y se convierte en una IPN (red interpenetrada) después del curado. Una IPN puede abarcar dos redes enredadas, cada una reticulada consigo misma y no reticulada con la otra.

En algunos aspectos, la formulación reticulada incluye una relación de rhColágeno no modificado para ajustar la rigidez después de la reticulación (con luz) sin reducir la cantidad total final de rhColágeno, ya que el rhColágeno no modificado no puede reticularse con iluminación, por lo tanto, no mejora la rigidez final. También puede añadirse HA con metacrilato a esta formulación final.

En algunos aspectos, el HA o MA-HA se puede reticular consigo mismo usando un agente de reticulación, por ejemplo, pero sin limitación, BDDE, como se describe en el Ejemplo 23. En algunos aspectos, el agente de reticulación que reticula el HA o MA-HA comprende divinil sulfona (DVS) o glutaraldehído. En determinados aspectos, el HA o MA-HA reticulado con BDDE no se reticula más con rhColágeno o MA-rhColágeno, creando lo que se denomina una red interpenetrada (figura 49, lado izquierdo).

En otro aspecto más, el colágeno de origen vegetal comprende rhColágeno. En otro aspecto, el colágeno de origen vegetal se obtiene de una planta modificada genéticamente. En otro aspecto, la planta modificada genéticamente es una planta modificada genéticamente seleccionada del grupo que consiste en tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola, zanahoria y algodón. En particular, la planta modificada genéticamente es una planta de tabaco.

En otro aspecto más, la planta modificada genéticamente comprende una secuencia expresable de al menos una secuencia génica de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano seleccionada del grupo que consiste en: COL1, COL2, P4H-alfa, P4H-beta y LH3. En otro aspecto, el colágeno humano de origen vegetal comprende al menos una cadena alfa-1 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 3 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y al menos una cadena alfa-2 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 6 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y en donde la planta modificada genéticamente expresa además una prolil-4-hidroxilasa exógena (P4H). En otro aspecto, el método comprende además la expresión de un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en lisil hidroxilasa (LH), proteasa N y proteasa C. En otro aspecto más, la cadena alfa-1 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la cadena alfa-2 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4.

En otro aspecto más, la P4H exógena es una P4H de mamífero. En particular, la P4H exógena es una P4H humana. Aún en otro aspecto, el método comprende además dirigir el colágeno humano alfa-1 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina. Aún en otro aspecto, el método comprende además dirigir el colágeno humano alfa-2 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina.

En otro aspecto más, el colágeno humano de origen vegetal es atelocolágeno. En otro aspecto, el colágeno humano de origen vegetal es atelocolágeno que tiene una secuencia de aminoácidos (AA) obtenida de la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 4. El atelocolágeno se obtiene por digestión enzimática (p. ej., con ficina) de procolágeno, que es el producto de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 4.

Aún en otro aspecto, el fotoiniciador induce la polimerización de la solución polimerizable en respuesta a la luz visible. En particular, la luz visible tiene una longitud de onda de 390-800 nm. En particular, el fotoiniciador se selecciona del

grupo que consiste en eosina Y+ trietanolamina, riboflavina y similares.

En otro aspecto, el fotoiniciador induce la polimerización de la solución polimerizable en respuesta a la luz ultravioleta (uv). En particular, el fotoiniciador se selecciona del grupo que consiste en fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP) o 1-[4 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metilpropan-1-ona (IRGACURE® 2959).

En otro aspecto, el fotoiniciador induce la polimerización de la solución polimerizable en respuesta a la luz infrarroja.

En otro aspecto más, la solución polimerizable se introduce en el espacio tisular a través de una aguja hueca o cánula en el intervalo de calibre 27 a calibre 33.

En otro aspecto más, la solución polimerizable en el espacio tisular se moldea o esculpe en la configuración deseada a través de un masaje manual. En otro aspecto, la solución polimerizable en el espacio tisular se moldea o esculpe en la configuración deseada usando un implemento de moldeo o esculpido.

En otro aspecto más, la solución polimerizable en el espacio tisular es esencialmente no gelificable a temperatura ambiente. En otro aspecto, la solución polimerizable en el espacio tisular es esencialmente no gelificable a 37 °C. En otro aspecto más, la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido, por ejemplo, pero sin limitación, colágeno bovino, porcino o equino en la misma concentración y formulación. En otro aspecto, la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a 37 °C en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

Como se usa a lo largo de todo el documento, la expresión "colágeno de origen animal" puede abarcar colágeno bovino, porcino, equino o de cola de rata y contrasta con el colágeno de origen humano.

En otro aspecto más, la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido en la misma concentración y formulación. En otro aspecto más, la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a 37 °C en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

En otro aspecto, se divulga en el presente documento un uso de una solución polimerizable inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, comprendiendo la solución polimerizable un colágeno humano de origen vegetal, reticulable, con metacrilato o tiolato y un fotoiniciador para inducir la polimerización antes de, de manera concomitante con, la aplicación de luz visible, y el moldeo o esculpido de la solución polimerizable en una configuración deseada para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices. En un aspecto particular, la solución de polímero comprende además un relleno que comprende un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxipatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de cualquiera de estos.

Los derivados modificados incluyen, pero sin limitación, versiones fotopolimerizables de, p. ej., HA, PVA, PEG, OC, PMMA, TCP, CaHA, carboximetilcelulosa o CNC. Las modificaciones incluyen, pero sin limitación, metacrilación o tiolación.

En otro aspecto, se divulga en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende:

- (a) introducir una solución polimerizable en el espacio tisular, comprendiendo la solución polimerizable un colágeno humano de origen vegetal reticulable.

La presente tecnología se refiere, en parte, a rellenos polimerizables a base de colágeno cosméticos y médicos que forman una composición moldeable, polimerizable mediante fotoactivación con una fuente de luz, tal como una fuente de luz visible. El relleno polimerizable comprende un colágeno humano de origen vegetal reticulable junto con un fotoiniciador.

La presente tecnología de interés tiene la ventaja de permitir la formación *in situ* de un implante o relleno dérmico personalizado y contorneado, típicamente sin intervención quirúrgica invasiva ni anestesia general. Generalmente, la solución polimerizable a base de colágeno se introduce en un espacio tisular debajo de la piel (es decir, debajo de la epidermis), y la polimerización se induce por exposición a luz visible aplicada a la superficie de la piel, es decir, desde

fuera del cuerpo o fuera de la piel, o a la epidermis.

Los métodos de polimerización *in situ* proporcionan procedimientos de mejora y/o correctivos cosméticos y médicos que usan una solución polimerizable que comprende un componente polimérico capaz de formar una red de reticulación reticulada insoluble al activarse con una fuente de luz visible.

En algunos aspectos, un relleno dérmico o un armazón promotor del crecimiento celular divulgado en el presente documento es para uso cosmético. En algunos aspectos, un relleno dérmico o un armazón promotor del crecimiento celular divulgado en el presente documento es para uso médico correctivo. En algunos aspectos, un relleno dérmico o un armazón promotor del crecimiento celular divulgado en el presente documento es para uso en un procedimiento de mejora, por ejemplo, pero sin limitación, el aumento de tejido. En algunos aspectos, un relleno dérmico doblemente reticulado divulgado en el presente documento es para uso cosmético. En algunos aspectos, un relleno dérmico doblemente reticulado divulgado en el presente documento es para uso médico correctivo. En algunos aspectos, un relleno dérmico doblemente reticulado divulgado en el presente documento se requiere como resultado de una afección médica o dental (implantes de encías/enfermedad de las encías). En algunos aspectos, un relleno dérmico doblemente reticulado divulgado en el presente documento se requiere como resultado de una afección médica que requiere aumento de la piel. En algunos aspectos, un relleno dérmico doblemente reticulado divulgado en el presente documento es para su uso en un procedimiento de mejora, por ejemplo, pero sin limitación, el aumento de tejido. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable divulgado en el presente documento es para uso cosmético. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable divulgado en el presente documento es para uso médico correctivo. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable divulgado en el presente documento se requiere como resultado de una afección médica o dental (implantes de encías/enfermedad de las encías). En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable divulgado en el presente documento se requiere como resultado de una afección médica que requiere aumento de la piel. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable divulgado en el presente documento es para su uso en un procedimiento de mejora, por ejemplo, pero sin limitación, el aumento de tejido. En algunos aspectos, un armazón promotor del crecimiento celular divulgado en el presente documento es para uso cosmético. En algunos aspectos, un armazón promotor del crecimiento celular divulgado en el presente documento es para uso médico correctivo. En algunos aspectos, un armazón promotor de crecimiento celular o relleno dérmico divulgado en el presente documento es necesario como resultado de una afección médica o dental (implantes de encías/enfermedad de las encías). En algunos aspectos, un armazón promotor de crecimiento celular o relleno dérmico divulgado en el presente documento se requiere como resultado de una afección médica que requiere aumento de la piel. En algunos aspectos, el uso médico correctivo incluye el tratamiento de la tendinitis. En algunos aspectos, un armazón promotor del crecimiento celular divulgado en el presente documento es para uso en un procedimiento de mejora, por ejemplo, pero sin limitación, el aumento de tejido.

En algunos aspectos, el aumento de tejido es de un tejido cutáneo.

En algún aspecto, el uso de los rellenos dérmicos, incluidos los armazones promotores del crecimiento celular, divulgados en el presente documento, es en un ser humano. En algunos aspectos, el uso de los rellenos dérmicos que incluyen armazones promotores de crecimiento celular divulgados en el presente documento en un ser humano reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, la reducción de líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o cualquier combinación de los mismos, tiene fines cosméticos. En algunos aspectos, la reducción de líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o cualquier combinación de los mismos, tiene fines cosméticos. En algunos aspectos, el uso de los rellenos dérmicos, incluidos los armazones promotores del crecimiento celular, divulgados en el presente documento, en un ser humano aumenta el tejido, por ejemplo, pero sin limitación, el tejido epidérmico o dérmico. En algunos aspectos, el aumento de tejido tiene fines cosméticos. En algunos aspectos, el aumento de tejido es para tratamiento médico. En algunos aspectos, el aumento de tejido es parte de un procedimiento de mejora. En algunos aspectos, el aumento de tejido es parte de un procedimiento de mejora de la piel.

En algunos aspectos, el aumento de tejido se requiere como resultado de cualquier afección médica o dental (enfermedad de las encías/implantes de encías).

En determinados aspectos, un relleno dérmico para su uso descrito en el presente documento comprende una red interpenetrada (IPN) o una red semiinterpenetrada (semi-IPN), en la que los diferentes componentes pueden estar reticulados consigo mismos pero no están reticulados entre sí. En algunos aspectos, un relleno dérmico IPN o semi-IPN comprende rhColágeno y un relleno, tal como ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC) o un derivado de la misma, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, una IPN o semi-IPN comprende rhColágeno y un HA reticulado. En algunos aspectos, una IPN o semi-IPN comprende un derivado de rhColágeno, por ejemplo, pero sin limitación, un rhColágeno con metacrilato o un rhColágeno con tiol y/o un derivado de un relleno, por ejemplo, pero sin limitación, un HA con metacrilato, PVA, PEG u OC, o un HA con tiolato, PVA, PEG u OC, o una combinación de los mismos.

En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN o una red doblemente reticulada que comprende un relleno dérmico comprende una relación de relleno, por ejemplo, pero sin limitación, HA, PVA, PEG u OC con respecto a rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN que comprende

un relleno dérmico comprende una relación de MA-relleno, por ejemplo, pero sin limitación, HA, PVA, PEG u OC con respecto a rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN que comprende un relleno dérmico comprende una relación de relleno, por ejemplo, pero sin limitación, HA, PVA, PEG u OC con respecto a MA-rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN que comprende un relleno dérmico comprende una relación de MA-relleno con respecto a MA-rhColágeno que es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende un relleno dérmico comprende una relación de HA con respecto a rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende un relleno dérmico comprende una relación de MA-HA con respecto a rhColágeno que es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN que comprende un relleno dérmico comprende una relación de HA con respecto a MA-rhColágeno que es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN que comprende un relleno dérmico comprende una relación de MA-HA con respecto a MA-rhColágeno que es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende un relleno dérmico comprende una relación de relleno con respecto a rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende un relleno dérmico comprende una relación de MA-HA, o MA-PVA, o MA-PEG, o MA-OC con respecto a rhColágeno que es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN que comprende un relleno dérmico comprende una relación de MA-HA, o MA-PVA, o MA-PEG, o MA-OC con respecto a MA-rhColágeno que es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN que comprende un relleno dérmico comprende una relación de MA-HA, o MA-PVA, o MA-PEG, o MA-OC con respecto a MA-rhColágeno que es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En algunos aspectos, una red IPN o semi-IPN que comprende un relleno dérmico o un relleno dérmico doblemente reticulado comprende un armazón promotor del crecimiento celular.

En determinados aspectos, un relleno dérmico para su uso descrito en el presente documento comprende un relleno dérmico fotocurable, en el que al menos uno de los componentes, por ejemplo, pero sin limitación, rhColágeno comprende un derivado de metacrilato-rhColágeno o un derivado de tiol-rhColágeno. En algunos aspectos, un relleno dérmico curable comprende rhColágeno y un relleno, tal como ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC) o un derivado de la misma, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, el relleno dérmico fotocurable comprende MA-rhColágeno y un HA o un derivado de los mismos. En algunos aspectos, el relleno dérmico fotocurable comprende un derivado de rhColágeno, por ejemplo, pero sin limitación, un rhColágeno con metacrilato o un rhColágeno con tiol y/o un derivado de un relleno, por ejemplo, pero sin limitación, un HA con metacrilato, PVA, PEG u OC, o un HA con tiolato, PVA, PEG u OC, o una combinación de los mismos.

En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable comprende una relación de relleno, por ejemplo, pero sin limitación, HA, PVA, PEG u OC, o un derivado de los mismos, con respecto a rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable comprende una relación de relleno, por ejemplo, pero sin limitación, HA, PVA, PEG u OC, o un derivado de los mismos, con respecto a MA-rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable comprende una relación de relleno, por ejemplo, pero sin limitación, HA, PVA, PEG u OC con respecto a tio-rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable comprende una relación de MA-relleno con respecto a MA-rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable comprende una relación de HA con respecto a MA-rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1, 1:3, 1:4, 1:5 o 0:1. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable comprende una relación de MA-HA con respecto a MA-rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable comprende una relación de PVA, PEG u OC con respecto a MA-rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, un relleno dérmico fotocurable comprende una relación de MA-PVA, MA-HA u OC con respecto a MA-rhColágeno de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En algunos aspectos, los componentes de HA de un relleno dérmico fotocurable comprenden un HA reticulado o un MA-HA reticulado.

A lo largo de esta solicitud, se pueden presentar diversos aspectos de los rellenos dérmicos y sus usos en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es únicamente por conveniencia y brevedad y no debería interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha divulgado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1:1 a 6:1 ha divulgado específicamente subintervalos tales como de 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1 a 5,9:1, de 1:1,1 a 1:1,9, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo y fracciones de los mismos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccional o entero) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en el presente documento indistintamente y se entiende que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionales y enteros entre los mismos.

Por ejemplo, la presente divulgación proporciona un relleno dérmico para un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende un colágeno humano de origen vegetal reticulable, ya sea solo o junto con un relleno, tal como ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC) o una combinación de los mismos, que puede reticularse, para proporcionar un relleno dérmico que forma una preparación de polímero reticulado insoluble en agua *in situ* tras la activación con luz visible en presencia de un fotoiniciador. En algunos aspectos, el colágeno tiene metacrilato o tiolato.

En algunos aspectos, el relleno dérmico proporcionado para los usos descritos en el presente documento forma una red IPN o semi-IPN. En algunos aspectos, el relleno dérmico proporcionado para los usos descritos en el presente documento forma una red doblemente reticulada.

En determinados aspectos, un relleno dérmico doblemente reticulado proporcionado para los usos descritos en el presente documento comprende rhColágeno que está reticulado con un relleno reticulado, tal como ácido hialurónico (HA) reticulado, poli(alcohol vinílico) (PVA) reticulado, polietilenglicol (PEG) reticulado o celulosa oxidada (OC) reticulada, o un derivado reticulado de los mismos, o una combinación de los mismos. En determinados aspectos, un relleno dérmico doblemente reticulado proporcionado para los usos descritos en el presente documento comprende rhColágeno que está reticulado adicionalmente con un relleno reticulado con metacrilato o tiolato, tal como HA, PVA, PEG u OC.

En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación el relleno reticulado con respecto a rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de MA-relleno con respecto a rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de relleno reticulado con respecto a MA-rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de MA-relleno con respecto a MA-rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de relleno con tiolato con respecto a rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de relleno reticulado con respecto a rhColágeno con tiolato es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de relleno con tiolato con respecto a rhColágeno con tiolato es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, el HA reticulado o el MA-HA reticulado se reticula adicionalmente con rhColágeno o rhColágeno con metacrilato o rhColágeno con tiol, dando como resultado un relleno dérmico doblemente reticulado. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de HA reticulado con respecto a rhColágeno o rhColágeno con metacrilato o rhColágeno con tiol es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de MA-HA reticulado con respecto a rhColágeno o rhColágeno con metacrilato o rhColágeno con tiol es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de MA-HA reticulado con respecto a rhColágeno o rhColágeno con metacrilato o rhColágeno con tiol es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, PVA, PEG u OC reticulados o MA-PVA, MA-PEG o MA-OC reticulados se reticulan adicionalmente con rhColágeno o rhColágeno con metacrilato, dando como resultado un relleno dérmico doblemente reticulado. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de PVA, PEG u OC reticulados con respecto a rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de MA-PVA, MA-PEG o MA-OC reticulados con respecto a rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de PVA, PEG u OC reticulados con respecto a MA-rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de MA-PVA, MA-PEG o MA-OC reticulados con respecto a MArhColágeno o rhColágeno con tiol es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, tiol-PVA, tiol-PEG o tiol-OC reticulados se reticulan adicionalmente con rhColágeno o rhColágeno con metacrilato, dando como resultado un relleno dérmico doblemente reticulado. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de tiol-PVA, tiol-PEG o tiol-OC reticulados con respecto a rhColágeno es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. En determinados aspectos, en un relleno dérmico doblemente reticulado, la relación de tiol-PVA, tiol-PEG o tiol-OC reticulados con respecto a rhColágeno con MA o rhColágeno con tiol es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5,

1:6 o 0:1.

En algunos aspectos, se puede usar cualquier agente de acoplamiento soluble en agua que pueda reticular el ácido hialurónico con el colágeno. Algunos ejemplos no limitantes de un agente de acoplamiento incluyen carbodiimidas tales como N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), etc. Los agentes de acoplamiento de carbodiimida pueden facilitar la formación de enlaces de éster o amida sin convertirse en parte del enlace. En otras palabras, un enlace de éster o un enlace de amida puede comprender átomos de un grupo carboxilato de uno de ácido hialurónico o colágeno, y un grupo hidroxilo o un grupo amina del otro. Sin embargo, pueden usarse otros agentes de acoplamiento que se convierten en parte del grupo de reticulación. La concentración de un agente de acoplamiento puede variar. En algunos aspectos, un agente de acoplamiento puede estar presente en una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunos aspectos, el agente de acoplamiento es EDC que está presente en una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunos aspectos, el agente de acoplamiento es EDC que está presente en una cantidad de EDC igual a 10 a 100 veces el número de aminas libres en el rhcolágeno. En algunos aspectos, el agente de acoplamiento es EDC que está presente en una cantidad de EDC igual a 50 veces el número de aminas libres en el rhcolágeno. Aumentar la concentración de carbodiimida hasta aproximadamente 50 mM puede dar como resultado una matriz macromolecular reticulada con mayor rigidez de hidrogel y/o menos hinchazón.

Un experto en la técnica apreciaría que un relleno dérmico que comprende una doble reticulación, en donde el relleno se reticula consigo mismo y a continuación también se reticula con el rhColágeno, es distinto de un relleno dérmico que comprende una reticulación directa de colágeno y HA usando un único tipo de agente de reticulación en una única reacción. Las propiedades de dichos rellenos dérmicos difieren.

A modo de ejemplo, la presente solución polimerizable se puede usar para bloquear o rellenar diversos lúmenes y huecos justo debajo de la superficie de la piel. Por lo tanto, la presente tecnología proporciona un método de aumento de tejido en un hospedador, tal como un paciente humano, en donde dicha solución polimerizable de interés se introduce en un sitio de interés usando métodos conocidos en la técnica, tal como inyectar la solución polimerizable en un sitio tisular que necesita aumento y, una vez aplicada, exponer la superficie corporal suprayacente a una luz visible para provocar la polimerización de la solución polimerizable depositada.

"Aumento" significa la reparación, prevención o alivio de defectos, particularmente defectos debidos a la pérdida o ausencia de tejido, proporcionando, aumentando o reemplazando dicho tejido con un polímero o red o interés. El aumento también incluye la complementación de una estructura o característica natural, es decir, una construcción o adición a una parte corporal existente, por ejemplo, para aumentar el tamaño de la misma, tales como los labios, la nariz, los senos, las orejas, partes de órganos, el mentón, las mejillas, etc. Por lo tanto, el aumento de tejido puede incluir el relleno o la reducción de líneas, pliegues, arrugas, cicatrices, depresiones faciales menores, labios leporinos, arrugas superficiales y similares, tal como en la cara, el cuello, las manos, los pies, los dedos de las manos y de los pies; la corrección de deformidades menores debidas al envejecimiento o a enfermedades, incluyendo en las manos y los pies, los dedos de las manos y de los pies; el aumento de las cuerdas vocales o la glotis para rehabilitar el habla; el relleno dérmico de las líneas de expresión y del sueño; la sustitución del tejido dérmico y subcutáneo perdido debido al envejecimiento; el aumento de los labios; el relleno de las arrugas y del surco orbital alrededor del ojo; el aumento de los senos; el aumento del mentón; el aumento de la mejilla y/o la nariz; el relleno de hendiduras en tejido blando, dérmico o subcutáneo, debido a, p. ej., una liposucción excesiva u otro traumatismo; el relleno de acné o cicatrices y arrugas traumáticas; el relleno de líneas nasolabiales, líneas nasoglabelares y líneas infraorales, etc.

La solución polimerizable de interés, en algunos aspectos, abarca una solución polimerizable que tiene una viscosidad adecuada para una fácil extrusión a través de un medio de suministro, tal como una aguja quirúrgica fina (p. ej., agujas que tienen un calibre de al menos calibre 27, al menos calibre 33 o más fino) a la temperatura de uso. Por lo tanto, una solución que es "inyectable" es una que tiene una textura y viscosidad que permite el flujo a través de un dispositivo de suministro adecuado, tal como una aguja quirúrgica, otro instrumento quirúrgico u otro medio de suministro, tal como un equipo usado en procedimientos de discectomía endoscópica o percutánea. Por lo tanto, la solución polimerizable de interés es inyectable a través de un aplicador adecuado, tal como un catéter, una cánula, una aguja, una jeringa, un aparato tubular, etc., como se conoce en la técnica.

Una vez inyectada en el espacio tisular, la solución polimerizable puede manipularse, masajearse, moldearse o esculpirse en los contornos deseados en el espacio tisular, típicamente después de que se haya activado la fotoiniciación de la polimerización. En un aspecto, la manipulación, el masaje, el moldeado o el esculpido tienen lugar durante el proceso de gelificación. La solución polimerizable, de polimerización o parcialmente polimerizada se puede conformar mediante manipulación externa, usando, por ejemplo, un medio de conformado, tal como un depresor quirúrgico u otra herramienta o instrumento con una superficie plana o curvada, los dedos, la palma, un nudillo, etc.

Sorprendentemente, el colágeno humano de origen vegetal reticulable y modificado genéticamente del presente método proporciona un relleno dérmico mejorado que contiene colágeno y métodos mejorados de relleno dérmico al permitir el uso de agujas de menor calibre y una menor fuerza de inyección, así como por su capacidad para llenar

espacios tisulares más pequeños.

La "fuerza de expresión" de una inyección (newtons, N) incluye la fuerza requerida para la inyección desde la aguja o cánula.

La "viscosidad absoluta" ("viscosidad dinámica") es la resistencia de un fluido a fluir cuando se aplica una fuerza. Es proporcional a la relación entre fuerza y velocidad. La letra griega η (eta) representa la viscosidad absoluta en los cálculos. Se mide comúnmente en cP porque muchos fluidos comunes tienen viscosidades entre 0,5 cP y 1000 cP.

Un "gel" es una placa o cilindro semirrígido de un polímero orgánico usado como medio para la separación de macromoléculas. Un gel es un sistema reticulado sustancialmente diluido, que no exhibe flujo cuando está en estado estacionario. Los geles son principalmente líquidos en peso, pero se comportan en parte como sólidos debido a una red reticulada tridimensional dentro del líquido, al tiempo que conservan algunas propiedades de un líquido, tal como la deformabilidad. Es la reticulación dentro del fluido lo que le da a un gel su estructura (dureza) y contribuye a la adhesividad (adherencia). Como resultado, los geles se pueden ver como una dispersión de moléculas líquidas dentro de un sólido, es decir, partículas líquidas dispersas dentro de un medio sólido. El "tiempo de gelificación" es el tiempo que tarda la solución polimerizable en formar un gel.

Un "hidrogel" es una red de cadenas poliméricas que son hidrófilas, que a veces se encuentran como un gel coloidal en el que el agua es el medio de dispersión. Los hidrogeles son redes poliméricas altamente absorbentes (p. ej., capaces de contener más del 90 % de agua) y tienen una flexibilidad muy similar a la del tejido natural, debido a su importante contenido de agua.

Un "polímero" es una macromolécula compuesta por una serie de subunidades repetitivas. La subunidad repetitiva básica se conoce como "monómero". Como grupo, los polímeros son conocidos por su resistencia a la tracción y elasticidad.

Un "fotoiniciador" es una molécula que crea especies reactivas (radicales libres, cationes o aniones) cuando se expone a la radiación (UV o visible). El fotoiniciador de la presente invención induce la polimerización de la solución polimerizable. Los ejemplos de fotoiniciadores útiles en el presente método incluyen, pero sin limitación, fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP), 1-[4 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metilpropan-1-ona (IRGACURE® 2959), eosina Y + trietanolamina o riboflavina.

El metacrilato es un éster o sal derivado del ácido metacrílico. Los metacrilatos son monómeros comunes en los plásticos poliméricos, que forman los polímeros de acrilato. La adición de grupos metacrilato a colágeno da como resultado metacrilato de colágeno (rhColágeno-MA o MA-rhColágeno) que es fotocurable. La adición de grupos metacrilato a ácido hialurónico (HA) da como resultado metacrilato de ácido hialurónico (HAMA o MA-HA) que es fotocurable.

En algunos aspectos, el rhColágeno usado en un relleno dérmico descrito en el presente documento comprende una combinación de rhColágeno no modificado y MA-rhColágeno. En algunos aspectos, la relación de rhColágeno no modificado con respecto a MA-rhColágeno es de aproximadamente 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 0:1, 2:1, 3:1 o 4:1. En algunos aspectos, el intervalo de concentración final de MA-rhColágeno comprende entre aproximadamente 0-12 mg/ml. En algunos aspectos, el intervalo de concentración final de rhColágeno no modificado comprende entre aproximadamente 0-12 mg/ml. En algunos aspectos, el intervalo de concentración final de MA-rhColágeno comprende entre aproximadamente 0 mg/ml-6 mg/ml. En algunos aspectos, el intervalo de concentración final de rhColágeno no modificado comprende entre aproximadamente 0 mg/ml-6 mg/ml. En algunos aspectos, la concentración final de MA-rhColágeno comprende aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 mg/ml. En algunos aspectos, la concentración final de rhColágeno no modificado comprende aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 mg/ml.

Un tiol es un compuesto de organoazufre que contiene un grupo sulfhidrilo (R-SH) unido a carbono (donde R representa un alquilo u otro sustituyente orgánico). La tiolación del colágeno puede mejorar las propiedades de cohesión y mucoadhesión y afecta a la capacidad de hinchamiento.

La luz es una forma de radiación electromagnética. La "luz visible" es luz que tiene una longitud de onda en el intervalo de 380-800 nm o al menos 390-700 nm. La "luz ultravioleta" tiene longitudes de onda más cortas, mientras que la "luz infrarroja" tiene longitudes de onda más largas.

Un medio de iluminación puede ser una fuente de luz adecuada para activar el fotoiniciador usado, y que puede activar el fotoiniciador desde fuera del cuerpo. Si bien se pueden usar iniciadores térmicos y, por lo tanto, se puede usar una fuente de infrarrojos, y se pueden usar iniciadores activados por ultravioleta y, por lo tanto, se puede usar una fuente de ultravioleta adecuada, una fuente de luz preferida es una fuente de luz blanca. Por lo tanto, se usa un fotoiniciador adecuado, de modo que se ajuste la máxima absorción del iniciador y la fuente de luz. Como se ha mencionado

anteriormente en el presente documento, una fuente de luz visible de este tipo es un diodo emisor de luz (LED). Se pueden usar otras fuentes de luz adecuadas siempre que se produzca la gelificación en el cuerpo, en el sitio, debajo de la superficie de la piel, etc., tal como, aplicando la radiación electromagnética al cuerpo, al sitio según sea necesario, o desde encima de la superficie de la piel. La radiación electromagnética se aplica a una intensidad, durante un tiempo y durante una duración que permite la gelificación. La fuente de luz puede estar situada por encima de la superficie de la piel o directamente sobre la superficie de la piel, típicamente por encima de la ubicación de la solución polimerizable moldeada o esculpida.

La solución monomérica de algunos aspectos puede contener cualquiera de una diversidad de materiales diferentes, tales como materiales inertes, tales como conservantes, rellenos, excipientes o diluyentes, moléculas o agentes farmacológicamente activos, tales como una molécula pequeña o un agente biológico, células, etc., como se conoce en las técnicas farmacéuticas. Por lo tanto, se puede añadir un agente inerte o biológicamente activo adecuado a la solución monomérica. En el caso de este último, el agente activo puede ejercer una acción farmacológica localmente en el sitio o en la proximidad de la estructura polimerizada o en red de interés, o puede liberarse del almacén, matriz o red formados para moverse a través de los espacios tisulares adyacentes o puede ingresar al sistema circulatorio para un efecto menos local.

Como se ha analizado anteriormente, los métodos de solución polimerizable de interés también se pueden usar junto con otros tratamientos dermatológicos, ortopédicos, cosméticos y otros tratamientos médicos.

En algunos aspectos, la solución polimerizable se mezcla con un relleno conocido para proporcionar una composición que sea moldeable, contorneable, que tenga un tiempo de residencia prolongado, etc. Los ejemplos de rellenos incluyen, pero sin limitación, ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC) o derivados modificados de los mismos, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, la solución polimerizable, en una fase semilíquida, se inyecta de forma independiente en la dermis como un relleno conocido también en una fase semilíquida, que, en conjunto, proporcionará una composición que sea moldeable, contorneable, que tenga un tiempo de residencia prolongado, etc. Los ejemplos de rellenos que pueden inyectarse de forma independiente incluyen, pero sin limitación, ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC) o derivados modificados de los mismos, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, la solución polimerizable, en una fase semilíquida, se inyecta en la dermis como una mezcla que en conjunto proporcionará una composición moldeable, contorneable, que tenga un tiempo de residencia prolongado, etc. Los ejemplos de rellenos que pueden inyectarse mezclados con rhColágeno incluyen, pero sin limitación, ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC) o derivados modificados de los mismos, o una combinación de los mismos.

Aún en otro aspecto, se describen en el presente documento métodos para inducir un almacén promotor del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis que comprenden introducir una solución en el espacio tisular, comprendiendo la solución: (a) un colágeno humano de origen vegetal; y (b) al menos un factor de crecimiento o fuente del mismo.

En un aspecto, la fuente del al menos un factor de crecimiento comprende un plasma o un plasma rico en plaquetas.

En un aspecto, el almacén promotor del crecimiento celular promueve la curación o el reemplazo debido a la degradación o lesión de un tejido que comprende colágeno. En un aspecto, el tejido que comprende colágeno se selecciona del grupo que consiste en un tendón, un ligamento, piel, una córnea, un cartílago, un vaso sanguíneo, un intestino, un disco intervertebral, un músculo, un hueso o un diente. En un aspecto particular, el almacén promotor del crecimiento celular promueve la curación de la tendinitis.

En un aspecto, el colágeno de origen vegetal comprende rhColágeno. En un aspecto, el colágeno de origen vegetal se obtiene de una planta modificada genéticamente. En diversos aspectos, la planta modificada genéticamente es una planta modificada genéticamente seleccionada del grupo que consiste en tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola, zanahoria y algodón. En un aspecto, la planta modificada genéticamente es una planta de tabaco.

En un aspecto, la planta modificada genéticamente comprende una secuencia expresable de al menos una secuencia génica de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano seleccionada del grupo que consiste en: COL1, COL2, P4H-alfa, P4H-beta y LH3.

En un aspecto particular, el colágeno humano de origen vegetal comprende al menos una cadena alfa-1 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 3 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y al menos una cadena alfa-2 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 6 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y la planta modificada genéticamente expresa además una prolil-4-hidroxilasa exógena (P4H).

En otro aspecto particular, el método comprende además la expresión de un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en lisil hidroxilasa (LH), proteasa N y proteasa C.

En un aspecto particular, la cadena alfa-1 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto particular, la cadena alfa-2 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2.

En un aspecto, la P4H exógena es una P4H de mamífero. En un aspecto particular, la P4H exógena es una P4H humana.

En un aspecto, el método comprende además dirigir el colágeno humano alfa-1 a una vacuola de la planta o la planta genéticamente modificada y digerirlo con ficina. En un aspecto, el método comprende además dirigir el colágeno humano alfa-2 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina.

En un aspecto particular, el colágeno humano de origen vegetal es atelocolágeno.

Un experto en la técnica apreciaría que la expresión "relleno dérmico" abarca, en algunos aspectos, una solución que comprende un colágeno humano de origen vegetal, por ejemplo, un colágeno humano recombinante de tipo 1 (rhColágeno) o un derivado del mismo. La expresión "relleno dérmico" también abarca, en algunos aspectos, una solución que comprende un colágeno humano de origen vegetal, por ejemplo, un colágeno humano recombinante de tipo 1 (rhColágeno) o un derivado del mismo, y un relleno o un derivado del mismo, o un relleno reticulado o un derivado del mismo, que tienen todos los mismos significados y cualidades, en donde un relleno dérmico puede usarse para aumentar la estructura tisular, o puede usarse para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o cualquier combinación de los mismos.

Un experto en la técnica apreciaría que los rellenos dérmicos descritos en el presente documento comprenden diferentes formulaciones, por ejemplo, pero sin limitación:

- Un rhColágeno o un derivado de MA o tiol del mismo,
- una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol, y un relleno o derivado de los mismos;
- una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol, y HA o MA-HA o Tiol-HA;
- una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol, y PVA o MA-PVA o Tiol-PVA;
- una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol, y PEG o MA-PEG o Tiol-PEG;
- una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada que comprende rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol, y OC o MA-OC o tiol-OC;
- una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada o un almacén promotor del crecimiento celular que comprende rhColágeno, y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) autólogo de sangre que contiene una alta concentración de plaquetas;
- una red IPN o semi-IPN o doblemente reticulada o un almacén promotor del crecimiento celular, comprendiendo cada uno rhColágeno y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) autólogo de sangre que contiene una alta concentración de plaquetas, en donde las plaquetas liberan diversos tipos de factores de crecimiento (GF) que comprenden factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas (PDEGF), factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF) o factores de crecimiento de hepatocitos (HGF), o una combinación de los mismos;
- un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol reticulados con un relleno reticulado o derivado del mismo;
- un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende un rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol reticulados con un HA reticulado o MA-HA reticulado o Tiol-HA reticulado;
- un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende un rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol reticulados con un PVA reticulado o MA-PVA reticulado o Tiol-PVA reticulado;
- un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende un rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol reticulados con un PEG reticulado o MA-PEG reticulado o Tiol-PEG reticulado; o
- un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende un rhColágeno o rhColágeno-MA o rhColágeno-Tiol reticulados con una OC reticulada o MA-OC reticulada o tiol-OC reticulada.

Un experto en la técnica apreciaría que, en algunos aspectos, la expresión "almacén promotor del crecimiento celular" abarca rellenos dérmicos que comprenden colágeno y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) autólogo de sangre o componentes de los mismos. En algunos aspectos, el PRP no incluye "células", sino vesículas membranosas (de origen celular) que contienen factores de crecimiento y componentes plasmáticos como fibrinógeno y protrombina. En algunos aspectos, un "almacén promotor del crecimiento celular" abarca rellenos dérmicos que comprenden colágeno y una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) autólogo de sangre o componentes de los mismos, y al menos un componente de relleno adicional.

En algunos aspectos, un armazón promotor del crecimiento celular comprende un relleno dérmico que puede ser una red IPN, una red semi-IPN o un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende además una fracción de plasma rico en plaquetas (PRP) autólogo de sangre que contiene una alta concentración de plaquetas, en donde la fracción de PRP autólogo de sangre que contiene una alta concentración de plaquetas, en donde las plaquetas liberan diversos tipos de factores de crecimiento (GF) que comprenden factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas (PDEGF), factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF) o factores de crecimiento de hepatocitos (HGF), o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, un armazón promotor del crecimiento celular comprende un relleno dérmico que comprende una red IPN, una red semi-IPN o un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende además, y al menos un factor de crecimiento que comprende factor de crecimiento vasculoendotelial (VEGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas (PDEGF), factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factores de crecimiento epidérmico (EGF) o factores de crecimiento de hepatocitos (HGF), o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, un armazón promotor del crecimiento celular comprende un relleno dérmico que comprende una red IPN, una red semi-IPN o un relleno dérmico doblemente reticulado que comprende además, y un subconjunto o fracción de componentes de PRP.

En algunos aspectos, un relleno dérmico descrito en el presente documento comprende una solución polimerizable. En algunos aspectos, un relleno dérmico descrito en el presente documento comprende una solución no polimerizable. En algunos aspectos, la polimerización de una solución de relleno dérmico se produce *in vivo*. En algunos aspectos, los componentes de una solución de relleno dérmico polimerizable se inyectan juntos y a continuación se polimerizan para formar el relleno dérmico curado. En algunos aspectos, los componentes de una solución de relleno dérmico polimerizable se inyectan de forma independiente y a continuación se polimerizan para formar el relleno dérmico curado. Un ejemplo del enfoque único de inyección independiente de componentes de relleno dérmico puede comprender, en algunos aspectos, inyectar un relleno en la dermis de la piel, por ejemplo, pero sin limitación, HA o un derivado del mismo, e inyectar por separado un rhColágeno con metacrilato o tiol en la dermis de la piel en las proximidades de la primera inyección, en donde los componentes están en una fase semilíquida, y a continuación, reticulación *in situ*. Este enfoque, en algunos aspectos, permite una inyección más sencilla y un esculpido *in situ* antes de curar los componentes de relleno dérmico juntos mediante polimerización por luz.

En algunos aspectos, un relleno dérmico proporcionado en el presente documento se usa en un método de aumento de tejido blando. En algunos aspectos, un relleno dérmico proporcionado en el presente documento mejora la proliferación celular. En algunos aspectos, un relleno dérmico proporcionado y usado en un método de aumento de tejido blando, se degrada con el tiempo. En algunos aspectos, un relleno dérmico proporcionado en el presente documento se usa en un método de aumento de tejido blando en donde el relleno dérmico llena un espacio tisular debajo de una epidermis. En algunos aspectos, un relleno dérmico proporcionado en el presente documento se usa en un método de aumento de tejido blando, en donde el uso reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices.

En un aspecto, la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido en la misma concentración y formulación. En otro aspecto, la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a 37 °C en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido en la misma concentración y formulación. Aún en otro aspecto, la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido en la misma concentración y formulación. En otro aspecto más, la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a 37 °C en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido en la misma concentración y formulación. En un aspecto particular, la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una formación de armazón aumentada o promueve un aumento en el crecimiento celular en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o de origen animal extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

Aún en otro aspecto, se divulga en el presente documento un uso de una solución inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para inducir un armazón promotor del crecimiento celular, comprendiendo la solución un colágeno humano de origen vegetal y al menos un factor de crecimiento o fuente del mismo, para promover la curación o el reemplazo debido a la degradación o lesión de un tejido que comprende colágeno. En un aspecto particular, la fuente del al menos un factor de crecimiento comprende un plasma o un plasma rico en plaquetas.

En un aspecto, el tejido que comprende colágeno se selecciona del grupo que consiste en un tendón, un ligamento, piel, una córnea, un cartílago, un vaso sanguíneo, un intestino, un disco intervertebral, un músculo, un hueso o un diente. En otro aspecto, el armazón promotor del crecimiento celular promueve la curación de la tendinitis. En los aspectos, el tejido que comprende colágeno es piel.

En algunos aspectos, se proporciona una planta modificada genéticamente que es capaz de expresar al menos un tipo de cadena alfa de colágeno y acumularla en un compartimento subcelular que está desprovisto de actividad P4H

endógena.

Como se usa en el presente documento, la expresión "planta modificada genéticamente" se refiere a cualquier planta inferior (p. ej., musgo) o superior (vascular) o un tejido o una célula aislada de la misma (p. ej., de una suspensión celular) que se transforma de forma estable o transitoria con una secuencia polinucleotídica exógena. Los ejemplos de plantas incluyen tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola, algodón, zanahoria, así como plantas inferiores, tales como el musgo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cadena de colágeno" se refiere a una subunidad de colágeno tal como las cadenas alfa 1 o 2 de fibras de colágeno, preferentemente fibras de tipo I. Como se usa en el presente documento, la expresión "colágeno" se refiere a un trímero de colágeno ensamblado, que en el caso del colágeno de tipo I incluye dos cadenas alfa 1 y una cadena alfa 2. Una fibra de colágeno es colágeno que está desprovisto de propéptidos terminales C y N.

Como se usa en el presente documento, la expresión "compartimento subcelular desprovisto de actividad P4H endógena" se refiere a cualquier región compartimentada de la célula que no incluye P4H vegetal o una enzima que tenga actividad P4H de tipo vegetal. Los ejemplos de dichos compartimentos subcelulares incluyen la vacuola, el apoplasto y el citoplasma, así como orgánulos tales como el cloroplasto, las mitocondrias y similares.

Cualquier tipo de cadena de colágeno se puede expresar por la planta modificada genéticamente de la presente invención. Los ejemplos incluyen colágenos formadores de fibrillas (tipos I, II, III, V y XI), colágenos formadores de redes (tipos IV, VIII y X), colágenos asociados con superficies de fibrillas (tipos IX, XII y XIV), colágenos que se presentan como proteínas transmembrana (tipos XIII y XVII), o que forman filamentos periódicos en forma de perlas de 11 nm (tipo VI).

En un aspecto, la cadena de colágeno expresada es una cadena alfa 1 y/o 2 de colágeno de tipo I. La cadena alfa de colágeno expresada puede estar codificada por cualquier secuencia polinucleotídica procedente de cualquier mamífero. En un aspecto particular, las secuencias que codifican cadenas alfa de colágeno son humanas y se exponen mediante las SEQ ID NO: 1 y 4.

Típicamente, las cadenas alfa de colágeno expresadas en plantas pueden incluir o no sus propéptidos terminales (es decir, propéptido C y propéptido N).

El procesamiento del procolágeno por la actividad proteolítica de las plantas es diferente del procesamiento normal en los seres humanos y el propéptido C se elimina por la actividad proteolítica de las plantas aunque se desconoce el sitio de escisión. La escisión del propéptido C puede tener lugar en un péptido de procolágeno antes del ensamblaje del recortador (la asociación de tres propéptidos C es esencial para iniciar el ensamblaje de los recortadores).

La escisión del propéptido N por la actividad proteolítica de las plantas tiene lugar en plantas maduras pero no en plántulas. Dicha escisión elimina 2 aminoácidos del telopéptido N (2 de 17).

Los propéptidos C (y en menor medida los propéptidos N) mantienen el procolágeno soluble durante su paso a través de la célula animal (Bulleid *et al.*, 2000) y se espera que tengan un efecto similar en la célula vegetal. Después o durante la secreción de moléculas de procolágeno en la matriz extracelular, los propéptidos son eliminados por las proteinasas N y C del procolágeno, lo que desencadena el autoensamblaje espontáneo de las moléculas de colágeno en fibrillas. La eliminación de los propéptidos por las proteinasas N y C del procolágeno reduce la solubilidad del procolágeno en >10.000 veces y es necesaria y suficiente para iniciar el autoensamblaje del colágeno en fibras. Para este proceso de ensamblaje son cruciales los péptidos cortos sin triple hélice llamados telopéptidos en los extremos del dominio de triple hélice, que garantizan el registro correcto de las moléculas de colágeno dentro de la estructura de la fibrilla y reducen la concentración crítica para el autoensamblaje. La pepsina puede escindir los propéptidos durante la producción de colágeno. Sin embargo, la pepsina daña los telopéptidos y, como resultado, el colágeno extraído con pepsina es incapaz de formar estructuras fibrilares ordenadas.

Se ha demostrado que la proteína disulfuro isomerasa (PDI) que forma la subunidad beta de la P4H humana se une al propéptido C antes del ensamblaje del recortador, actuando de este modo también como una chaperona molecular durante el ensamblaje catenario.

El uso de la proteinasa N del procolágeno I humana y la proteinasa C del procolágeno expresadas en diferentes plantas puede generar colágeno que es más similar al colágeno humano natural y puede formar estructuras fibrilares ordenadas.

En un caso donde los propéptidos N o C o ambos están incluidos en la cadena de colágeno expresada, la planta modificada genéticamente de la presente invención también puede expresar la proteasa respectiva (es decir, C o N o ambas). Las secuencias polinucleotídicas que codifican dichas proteasas se ilustran mediante las SEQ ID NO: 18 (proteasa C) y 20 (proteasa N). Dichas proteasas se pueden expresar de manera que se acumulen en el mismo compartimento subcelular que la cadena de colágeno.

La acumulación de la cadena de colágeno expresada en un compartimento subcelular desprovisto de actividad P4H endógena puede efectuarse mediante uno cualquiera de varios enfoques.

Por ejemplo, la cadena de colágeno expresada puede incluir una secuencia de señal para dirigir la proteína expresada a un compartimento subcelular tal como el apoplasto o un orgánulo (p. ej., cloroplasto). Los ejemplos de secuencias de señal adecuadas incluyen el péptido de tránsito del cloroplasto (incluido en Swiss-Prot entrada P07689, aminoácidos 1-57) y el péptido de tránsito de la mitocondria (incluido en Swiss-Prot entrada P46643, aminoácidos 1-28). La sección de Ejemplos a continuación proporciona ejemplos adicionales de secuencias de señal adecuadas, así como pautas para emplear dichas secuencias de señal en la expresión de cadenas de colágeno en células vegetales.

Como alternativa, la secuencia de la cadena de colágeno se puede modificar de una manera que altere la localización celular del colágeno cuando se expresa en plantas.

Como se ha mencionado anteriormente, el RE de las plantas incluye una P4H que es incapaz de hidroxilar correctamente las cadenas de colágeno. Las cadenas alfa de colágeno incluyen de forma natural una secuencia de direccionamiento del RE que dirige el colágeno expresado al RE, donde se modifica postraduccionalmente (incluida la hidroxilación incorrecta). Por lo tanto, la eliminación de la secuencia de direccionamiento del RE conducirá a la acumulación citoplasmática de cadenas de colágeno que están desprovistas de modificación postraduccional, incluyendo cualquier hidroxilación.

El Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos a continuación describe la generación de secuencias de colágeno que están desprovistas de secuencias del RE.

Como alternativa adicional, las cadenas de colágeno se pueden expresar y acumular en un orgánulo que contiene ADN, como el cloroplasto o las mitocondrias. A continuación se proporciona una descripción adicional de la expresión del cloroplasto.

Como se ha mencionado anteriormente, la hidroxilación de las cadenas alfa es necesaria para el ensamblaje de un colágeno de tipo I estable. Dado que las cadenas alfa expresadas por la planta modificada genéticamente de la presente invención se acumulan en un compartimento desprovisto de actividad P4H endógena, dichas cadenas deben aislarse de la planta, tejido vegetal o célula e hidroxilarse *in vitro*. Dicha hidroxilación se puede lograr mediante el método descrito por Turpeenniemi-Hujanen y Myllyla (Concomitant hydroxylation of proline and lysine residues in collagen using purified enzymes *in vitro*. Biochim Biophys Acta. 16 de julio de 1984; 800(1):59-65).

Aunque dicha hidroxilación *in vitro* puede conducir a cadenas de colágeno correctamente hidroxiladas, puede ser difícil y costoso de lograr.

Para superar las limitaciones de la hidroxilación *in vitro*, la planta modificada genéticamente de la presente invención preferentemente también coexpresa P4H que es capaz de hidroxilar correctamente la una o más cadenas alfa de colágeno [es decir, hidroxilar solo la posición de prolina (Y) de los tripletes Gly-X-Y]. P4H es una enzima compuesta por dos subunidades, alfa y beta. Ambas son necesarias para formar una enzima activa mientras que la subunidad Beta también posee una función de chaperona.

La P4H expresada por la planta modificada genéticamente de la presente invención es preferentemente una P4H humana que está codificada por, por ejemplo, las SEQ ID NO:12 y 14. Además, También se pueden usar mutantes de P4H que presentan una especificidad de sustrato mejorada u homólogos de P4H.

Un homólogo de P4H adecuado se ilustra mediante una oxidoreductasa de *Arabidopsis* identificada por el número de acceso del NCBI NP_179363. La alineación por pares de esta secuencia de proteína y una subunidad alfa de P4H humana realizada por los presentes inventores reveló la homología más alta entre dominios funcionales de todos los homólogos de P4H conocidos de las plantas.

Dado que P4H necesita acumularse conjuntamente con la cadena de colágeno expresada, la secuencia codificante de la misma se modifica preferentemente en consecuencia (adición de secuencias de señal, delecciones que pueden impedir el direccionamiento de RE, etc.).

En células de mamífero, el colágeno también es modificado por lisil hidroxilasa, galactosiltransferasa y glucosiltransferasa. Estas enzimas modifican secuencialmente los residuos de lisilo en posiciones específicas a residuos de hidroxilisilo, galactosilhidroxilisilo y glucosilgalactosilhidroxilisilo. Una sola enzima humana, la lisil hidroxilasa 3 (LH3), puede catalizar las tres etapas consecutivas en la formación de carbohidratos ligados a hidroxilisina.

Por lo tanto, la planta modificada genéticamente de la presente invención también expresa preferentemente LH3 de mamífero. Se puede usar una secuencia codificante de LH3 tal como la que se expone mediante la SEQ ID NO: 22 para tales fines.

La una o más cadenas de colágeno y las enzimas modificadoras descritas anteriormente se pueden expresar a partir de una construcción de ácido nucleico integrada de forma estable o expresada de forma transitoria que incluye secuencias polinucleotídicas que codifican las cadenas alfa y/o enzimas modificadoras (p. ej., P4H y LH3) posicionadas bajo el control de la transcripción de promotores funcionales vegetales. Tal construcción de ácido nucleico (que también se denomina en el presente documento como construcción de expresión) se puede configurar para determinar la expresión en toda la planta, tejidos vegetales definidos o células vegetales definidas, o en etapas de desarrollo definidas de la planta. Tal construcción también puede incluir marcadores de selección (p. ej., resistencia a antibióticos), elementos potenciadores y un origen de replicación para la replicación bacteriana.

Se apreciará que las construcciones que incluyen dos insertos expresables (p. ej., dos tipos de cadena alfa, o una cadena alfa y P4H) incluyen preferentemente un promotor individual para cada inserto o, como alternativa, dichas construcciones pueden expresar una única quimera de transcripción que incluye ambas secuencias de inserto de un único promotor. En tal caso, la transcripción quimérica incluye una secuencia IRES entre las dos secuencias de inserto de modo que el inserto cadena abajo se puede traducir a partir de la misma.

Las construcciones de la presente invención pueden utilizar numerosos promotores y potenciadores de expresión funcional vegetal que pueden ser específicos de tejido, específicos del desarrollo, constitutivos o inducibles, a continuación en el presente documento se proporcionan algunos ejemplos.

Como se usa en el presente documento, en la memoria descriptiva y en la sección de reivindicaciones a continuación, la expresión "promotor vegetal" o "promotor" incluye un promotor que puede dirigir la expresión génica en células vegetales (incluyendo orgánulos que contienen ADN). Un promotor de este tipo puede ser de origen vegetal, bacteriano, vírico, fúngico o animal. Tal promotor puede ser constitutivo, es decir, es capaz de dirigir un alto nivel de expresión génica en una pluralidad de tejidos vegetales, es específico de tejido, es decir, es capaz de dirigir la expresión génica en un tejido o tejidos vegetales particulares, es inducible, es decir, es capaz de dirigir la expresión génica bajo un estímulo, o es quimérico, es decir, está formado por porciones de al menos dos promotores diferentes.

Por lo tanto, el promotor vegetal empleado puede ser un promotor constitutivo, un promotor específico del tejido, un promotor inducible o un promotor quimérico.

Los ejemplos de promotores vegetales constitutivos incluyen, sin limitación, los promotores CaMV35S y CaMV19S, el promotor FMV34S, el promotor del badnavirus baciliforme de la caña de azúcar, el promotor CsVMV, el promotor de actina ACT2/ACT8 de *Arabidopsis*, el promotor de ubiquitina UBQ1 de *Arabidopsis*, el promotor de tionina BTH6 de hoja de cebada y el promotor de actina de arroz.

Los ejemplos de promotores específicos de tejido incluyen, sin limitación, el promotor de proteína de almacenamiento de faseolina de frijol, el promotor DLEC, el promotor PHS, el promotor de proteína de almacenamiento de zeína, el promotor de conglutina gamma de soja, el promotor del gen AT2S1, el promotor de actina ACT11 de *Arabidopsis*, el promotor napA de *Brassica napus* y el promotor del gen de la patatina de la patata.

El promotor inducible es un promotor inducido por un estímulo específico, tal como condiciones de estrés que comprenden, por ejemplo, luz, temperatura, productos químicos, sequía, alta salinidad, choque osmótico, condiciones oxidantes o en caso de patogenicidad e incluyen, sin limitación, el promotor inducible por la luz derivado del gen *rbcS* del guisante, el promotor del gen *rbcS* de la alfalfa, los promotores DRE, MYC y MYB activos en sequía; los promotores INT, INPS, prxEa, Ha hsp17.7G4 y RD21 activos en alta salinidad y estrés osmótico, y los promotores hsr203J y str246C activos en estrés patógeno.

Preferentemente, el promotor utilizado por la presente invención es un promotor constitutivo fuerte de modo que la sobreexpresión de los insertos de construcción se efectúa después de la transformación de la planta.

Se apreciará que cualquiera de los tipos de construcción usados en la presente invención se puede cotransformar en la misma planta usando los mismos o diferentes marcadores de selección en cada tipo de construcción. Como alternativa, el primer tipo de construcción se puede introducir en una primera planta mientras que el segundo tipo de construcción se puede introducir en una segunda planta isogénica, después de lo cual las plantas transgénicas resultantes de las mismas se pueden cruzar y la descendencia se puede seleccionar para los transformantes dobles. Se pueden emplear autocruces adicionales de dicha descendencia para generar líneas homocigotas para ambas construcciones.

Existen diversos métodos para introducir construcciones de ácido nucleico en plantas tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Potrykus, I., Annu. Rev. Plant. Physiol., Plant. Mol. Biol. (1991) 42:205-225; Shimamoto *et al.*, Nature (1989) 338:274-276). Dichos métodos se basan en la integración estable de la construcción de ácido nucleico o una porción de la misma en el genoma de la planta, o en la expresión transitoria de la construcción de ácido nucleico, en cuyo caso, estas secuencias no son heredadas por una descendencia de la planta.

Además, existen varios métodos en los que se puede introducir directamente una construcción de ácido nucleico en

el ADN de un orgánulo que contiene ADN, tal como un cloroplasto.

Existen dos métodos principales para efectuar la integración genómica estable de secuencias exógenas tales como las incluidas dentro de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en genomas de plantas:

- (i) Transferencia génica mediada por *Agrobacterium*: Klee *et al.* (1987) Annu. Rev. Plant Physiol. 38:467-486; Klee y Rogers en Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes, eds. Schell, J. y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) pág. 2-25; Gatenby, en Plant Biotechnology, eds. Kung, S. y Arntzen, C. J., Butterworth Publishers, Boston, Mass. (1989) pág. 93-112.
- (ii) Captación directa de ADN: Paszkowski *et al.*, en Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 6, Molecular Biology of Plant Nuclear Genes eds. Schell, J. y Vasil, L. K., Academic Publishers, San Diego, Calif. (1989) pág. 52-68; incluyendo métodos para la captación directa de ADN en protoplastos, Toriyama, K. *et al.* (1988) Bio/Technology 6: 1072-1074. Captación de ADN inducida por una breve descarga eléctrica de las células vegetales: Zhang *et al.* Plant Cell Rep. (1988) 7:379-384. Fromm *et al.* Nature (1986) 319: 791-793. Inyección de ADN en células o tejidos vegetales mediante bombardeo de partículas, Klein *et al.* Bio/Technology (1988) 6: 559-563; McCabe *et al.* Bio/Technology (1988) 6: 923-926; Sanford, Physiol. Plant. (1990) 79:206-209; mediante el uso de sistemas de micropipetas: Neuhaus *et al.*, Theor. Appl. Genet. (1987) 75:30-36; Neuhaus y Spangenberg, Physiol. Plant. (1990) 79:213-217; o por la incubación directa de ADN con polen en germinación, DeWet *et al.* en Experimental Manipulation of Ovule Tissue, eds. Chapman, G. P. y Mantell, S. H. y Daniels, W. Longman, Londres, (1985) pág. 197-209; y Ohta, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:715-719.

El sistema de *Agrobacterium* incluye el uso de vectores plasmídicos que contienen segmentos de ADN definidos que se integran en el ADN genómico vegetal. Los métodos de inoculación del tejido vegetal varían según la especie de la planta y el sistema de suministro de *Agrobacterium*. Un enfoque ampliamente usado es el procedimiento de disco foliar que puede realizarse con cualquier explante tisular que proporcione una buena fuente para el inicio de la diferenciación de la planta completa. Horsch *et al.* en Plant Molecular Biology Manual A5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1988) pág. 1-9. Un enfoque complementario emplea el sistema de suministro de *Agrobacterium* junto con infiltración al vacío. El sistema de *Agrobacterium* es especialmente viable en la creación de plantas dicotiledóneas transgénicas.

Existen diversos métodos de transferencia directa de ADN a células vegetales. En la electroporación, los protoplastos se exponen brevemente a un campo eléctrico fuerte. En la microinyección, el ADN se inyecta de manera mecánica directamente en las células usando micropipetas muy pequeñas. En el bombardeo de micropartículas, el ADN se adsorbe en microproyectiles tales como cristales de sulfato de magnesio, partículas de wolframio o partículas de oro, y los microproyectiles se aceleran físicamente hacia células o tejidos vegetales.

Después de la transformación, se realiza propagación de la planta. El método más común de propagación de plantas es mediante semillas. La regeneración mediante propagación por semillas, sin embargo, tiene la deficiencia de que, debido a la heterocigosidad, existe una falta de uniformidad en el cultivo, ya que las semillas son producidas por plantas de acuerdo con las variaciones genéticas regidas por las normas mendelianas. Básicamente, cada semilla es genéticamente diferente, y cada una crecerá con sus propios rasgos específicos. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se produzca de manera que la planta regenerada tenga los rasgos y características idénticos de la planta transgénica original. Por lo tanto, se prefiere que la planta transformada se regenere por micropropagación, lo que proporciona una reproducción rápida y consistente de las plantas transformadas.

Los métodos de expresión transitoria que se pueden usar para expresar transitoriamente el ácido nucleico aislado incluido dentro de la construcción de ácido nucleico de la presente invención incluyen, pero sin limitación, microinyección y bombardeo, como se ha descrito anteriormente, pero bajo condiciones que favorecen la expresión transitoria, y la expresión mediada por virus, en donde un vector de virus recombinante empaquetado o no empaquetado que incluye la construcción de ácido nucleico se usa para infectar tejidos o células vegetales de tal manera que un virus recombinante en propagación establecido en el mismo exprese la secuencia de ácido nucleico no vírica.

Los virus que se han mostrado como útiles para la transformación de hospedadores vegetales incluyen CaMV, TMV y BV. Se describe la transformación de plantas usando virus vegetales en la Pat. de EE. UU. N.º 4.855.237 (BGV), el documento EP-A 67.553 (TMV), la Solicitud Publicada Japonesa N.º 63-14693 (TMV), los documentos EPA 194.809 (BV), EPA 278.667 (BY); y Gluzman, Y. *et al.*, Communications in Molecular Biology: Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, págs. 172-189 (1988). Las partículas de pseudovirus para su uso en la expresión de ADN exógeno en muchos hospedadores, incluyendo plantas, se describe en el documento WO 87/06261.

La construcción de virus de ARN vegetal para la introducción y expresión de secuencias de ácido nucleico exógenas no víricas en plantas se demuestra por las referencias anteriores, así como por Dawson, W. O. *et al.*, Virology (1989) 172:285-292; Takamatsu *et al.* EMBO J. (1987) 6:307-311; French *et al.* Science (1986) 231:1294-1297; y Takamatsu *et al.* FEBS Letters (1990) 269:73-76.

Cuando el virus es un virus de ADN, las construcciones se pueden elaborar adecuadas al propio virus. Como alternativa, el virus se puede clonar primero en un plásmido bacteriano para facilitar la construcción del vector vírico

deseado con el ADN exógeno. A continuación, el virus puede escindirse del plásmido. Si el virus es un virus de ADN, se puede unir un origen bacteriano de replicación al ADN vírico, que a continuación se replica por las bacterias. La transcripción y la traducción de este ADN producirán la proteína de cubierta que encapsidará el ADN vírico. Si el virus es un virus de ARN, el virus se clona generalmente como un ADNc y se inserta en un plásmido. A continuación, el plásmido se usa para realizar todas las construcciones. A continuación, el virus de ARN se produce al transcribir la secuencia vírica del plásmido y la traducción de los genes víricos para producir la una o más proteínas de cubierta que encapsidan el ARN vírico.

La construcción de virus de ARN de plantas para la introducción y expresión en plantas de secuencias de ácido nucleico exógenas no víricas tales como las incluidas en la construcción de la presente invención se demuestra mediante las referencias anteriores, así como en la Pat. de EE. UU. N.º 5.316.931.

En un aspecto, se proporciona un ácido nucleico vírico vegetal en el que la secuencia codificante de proteína de cubierta natural se ha suprimido de un ácido nucleico vírico, una secuencia codificante de proteína de cubierta vírica vegetal no natural y un promotor no natural, preferentemente se ha insertado el promotor subgenómico de la secuencia codificante de proteína de cubierta no natural, capaz de expresarse en el hospedador vegetal, empaquetar el ácido nucleico vírico vegetal recombinante y asegurar una infección sistémica del hospedador por el ácido nucleico vírico vegetal recombinante. Como alternativa, el gen de la proteína de cubierta puede inactivarse mediante inserción de una secuencia de ácido nucleico no natural dentro de este, de modo que se produce una proteína. El ácido nucleico vírico vegetal recombinante puede contener uno o más promotores subgenómicos no naturales adicionales. Cada promotor subgenómico no natural es capaz de transcribir o expresar genes adyacentes o secuencias de ácido nucleico en el hospedador vegetal e incapaz de recombinarse entre sí y con promotores subgenómicos naturales. Pueden insertarse secuencias de ácido nucleico no naturales (exógenas) adyacentes al promotor subgenómico vírico vegetal natural o a los promotores subgenómicos víricos vegetales naturales y uno no natural si se incluye más de una secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico no naturales se transcriben o se expresan en la planta hospedadora bajo control del promotor subgenómico para producir los productos deseados.

En un segundo aspecto, se proporciona un ácido nucleico vírico vegetal recombinante como en el primer aspecto, excepto que la secuencia codificante de proteína de cubierta natural se coloca adyacente a uno de los promotores subgenómicos de proteína de cubierta no natural en lugar de una secuencia codificante de proteína de cubierta no natural.

En un tercer aspecto, se proporciona un ácido nucleico vírico vegetal recombinante en el que el gen de la proteína de cubierta natural está adyacente a su promotor subgenómico y se han insertado uno o más promotores subgenómicos no naturales en el ácido nucleico vírico. Los promotores subgenómicos no naturales insertados son capaces de transcribir o expresar genes adyacentes en una planta hospedadora y son incapaces de recombinarse entre sí y con promotores subgenómicos naturales. Pueden insertarse secuencias de ácido nucleico no naturales adyacentes a los promotores víricos vegetales subgenómicos no naturales de modo que dichas secuencias se transcriban o se expresen en la planta hospedadora bajo el control de los promotores subgenómicos para producir el producto deseado.

En un cuarto aspecto, se proporciona un ácido nucleico vírico vegetal recombinante como en el tercer aspecto, excepto que la secuencia codificante de proteína de cubierta natural se reemplaza por una secuencia codificante de proteína de cubierta no natural.

Los vectores víricos están encapsidados por las proteínas de cubierta codificadas por el ácido nucleico vírico vegetal recombinante para producir un virus vegetal recombinante. El ácido nucleico vírico vegetal recombinante o virus vegetal recombinante se usa para infectar plantas hospedadoras adecuadas. El ácido nucleico vírico vegetal recombinante tiene capacidad de replicación en el hospedador, diseminación sistémica en el hospedador y transcripción o expresión de uno o más genes exógenos (ácido nucleico aislado) en el hospedador para producir la proteína deseada.

Se conoce una técnica para introducir secuencias de ácido nucleico exógenas en el genoma de los cloroplastos. Esta técnica implica los siguientes procedimientos. En primer lugar, las células vegetales se tratan químicamente para reducir el número de cloroplastos por célula a aproximadamente uno. A continuación, el ácido nucleico exógeno se introduce mediante bombardeo de partículas en las células con el objetivo de introducir al menos una molécula de ácido nucleico exógena en los cloroplastos. El ácido nucleico exógeno se selecciona de modo que se pueda integrar en el genoma del cloroplasto mediante recombinación homóloga que se efectúa fácilmente mediante enzimas inherentes al cloroplasto. Para este fin, el ácido nucleico exógeno incluye, además de un gen de interés, al menos un tramo de ácido nucleico que procede del genoma del cloroplasto. Además, el ácido nucleico exógeno incluye un marcador seleccionable, que actúa mediante procedimientos de selección secuencial para determinar que todas o sustancialmente todas las copias de los genomas de cloroplasto después de dicha selección incluirán el ácido nucleico exógeno. Se encuentran detalles adicionales relacionados con esta técnica en las Pat. de EE. UU. N.º 4.945.050; y 5.693.507. Por lo tanto, el sistema de expresión de proteínas del cloroplasto puede producir un polipéptido y este puede integrarse en la membrana interna del cloroplasto.

Los enfoques de transformación descritos anteriormente se pueden usar para producir cadenas de colágeno y/o

enzimas modificadoras, así como colágeno ensamblado (con o sin propéptidos) en cualquier especie de planta, o tejido vegetal o célula vegetal aislada procedente de la misma.

Son plantas preferidas las que son capaces de acumular grandes cantidades de cadenas de colágeno, colágeno y/o las enzimas de procesamiento descritas en el presente documento, dichas plantas también pueden seleccionarse de acuerdo con su resistencia a las condiciones de estrés y la facilidad con la que se pueden extraer los componentes expresados o el colágeno ensamblado. Los ejemplos de plantas preferidas incluyen tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola y algodón.

Las fibras de colágeno se usan ampliamente en la industria alimentaria y cosmética, por lo tanto, aunque los componentes de fibra de colágeno (cadenas alfa) y las enzimas modificadoras expresadas por plantas encuentran utilidad en la síntesis industrial de colágeno, la producción completa de colágeno en plantas es preferida por su simplicidad y rentabilidad.

Se pueden usar varios enfoques para generar colágeno de tipo I en plantas. Por ejemplo, la cadena alfa 1 de colágeno se puede aislar de una planta que exprese colágeno alfa 1 y P4H (y opcionalmente LH3) y mezclarla con una cadena alfa 2 de colágeno que se aísla de una planta que exprese colágeno alfa 2 y P4H (y opcionalmente LH3 y proteasa C y/o N). Dado que la cadena alfa 1 de colágeno se autoensambla en una triple hélice por sí sola, puede ser necesario desnaturalizar tal homotrímero antes de su mezcla y renaturalización con la cadena alfa 2 de colágeno.

Preferentemente, una primera planta que expresa colágeno alfa 1 y P4H (y opcionalmente LH3 y proteasa C y/o N) se puede cruzar con una segunda planta (y preferentemente isogénica) que expresa colágeno alfa 2 o, como alternativa, una primera planta que expresa ambas cadenas alfa se puede cruzar con una segunda planta que expresa P4H y opcionalmente LH3 y proteasa C y/o N.

Cabe señalar que, aunque los enfoques de fitomejoramiento descritos anteriormente utilizan dos plantas transformadas individualmente, también se pueden utilizar enfoques que utilicen tres o más plantas transformadas individualmente, cada una de las cuales expresa uno o dos componentes.

Un experto en la técnica conocerá bien diversas técnicas de fitomejoramiento y, como tal, no se proporciona aquí ninguna descripción adicional de dichas técnicas.

Aunque se prefieren los enfoques de fitomejoramiento, cabe señalar que una sola planta que exprese colágeno alfa 1 y 2, P4H y LH3 (y opcionalmente proteasa C y/o N) se puede generar a través de varios eventos de transformación, cada uno diseñado para introducir uno o más componentes expresables en la célula. En tales casos, la estabilidad de cada evento de transformación se puede verificar usando marcadores de selección específicos.

En cualquier caso, se pueden usar enfoques de transformación y fitomejoramiento para generar cualquier planta, expresando cualquier número de componentes. Actualmente se prefieren las plantas que expresan cadenas alfa 1 y 2 de colágeno, P4H, LH3 y al menos una proteasa (p. ej., proteasa C y/o N). Como se describe además en la sección de Ejemplos a continuación, dichas plantas acumulan colágeno que exhibe estabilidad a temperaturas de hasta 42 °C.

La descendencia resultante del mejoramiento o, como alternativa, de plantas transformadas de forma múltiple se puede seleccionar verificando la presencia de ARNm exógeno y/o polipéptidos usando sondas de ácido nucleico o proteínas (p. ej., anticuerpos). Se prefiere este último enfoque, ya que permite la localización de los componentes polipeptídicos expresados (por ejemplo, mediante el análisis de extractos vegetales fraccionados) y, por lo tanto, también verifica un potencial para el correcto procesamiento y ensamblaje. Se proporcionan ejemplos de sondas adecuadas en la sección de Ejemplos a continuación.

Una vez que se identifica la descendencia que expresa colágeno, dichas plantas se cultivan posteriormente en condiciones que maximizan la expresión de las cadenas de colágeno, así como de las enzimas modificadoras.

Dado que la acumulación de prolina libre puede facilitar la sobreproducción de diferentes proteínas ricas en prolina, incluidas las cadenas de colágeno expresadas por las plantas modificadas genéticamente de la presente invención, las condiciones de cultivo preferidas son aquellas que aumentan la acumulación de prolina libre en la planta cultivada.

La prolina libre se acumula en una diversidad de plantas en respuesta a una amplia gama de estreses ambientales, incluyendo la privación de agua, salinización, baja temperatura, alta temperatura, infección por patógenos, toxicidad por metales pesados, anaerobiosis, deficiencia de nutrientes, contaminación atmosférica e irradiación UV (Hare y Cress, 1997).

La prolina libre también puede acumularse en respuesta al tratamiento de la planta o el suelo con compuestos tales como ABA o compuestos que inducen estrés, tales como sal de cobre, paraquat, ácido salicílico y similares.

Por lo tanto, la descendencia que expresa colágeno se puede cultivar en diferentes condiciones de estrés (p. ej., diferentes concentraciones de NaCl que varían desde 50 mM hasta 250 mM). Para mejorar aún más la producción de

colágeno, se examinará y se optimizará el efecto de diversas condiciones de estrés sobre la expresión de colágeno con respecto a la viabilidad de la planta, la biomasa y la acumulación de colágeno.

Los tejidos/células vegetales se recogen preferentemente en la madurez, y las fibras de colágeno se aíslan usando enfoques de extracción de la técnica anterior bien conocidos, a continuación se detalla uno de dichos enfoques.

Las hojas de plantas transgénicas se muelen hasta obtener un polvo en una atmósfera de nitrógeno líquido y el homogeneizado se extrae en ácido acético 0,5 M que contiene NaCl 0,2 M durante 60 h a 4 °C. El material insoluble se elimina por centrifugación. El sobrenadante que contiene el colágeno recombinante se fracciona con sal a 0,4 M y 0,7 M de NaCl. El precipitado de NaCl 0,7 M, que contiene el colágeno heterotrimérico recombinante, se disuelve y se dializa contra ácido acético 0,1 M y se almacena a -20 °C (siguiendo a Ruggiero *et al.*, 2000).

En un aspecto, se divulga en el presente documento un método para procesar procolágeno con el fin de generar atelocolágeno formador de fibrillas homogéneo y soluble.

En algunos aspectos, como se muestra en el presente documento mediante el análisis de los resultados de la proteólisis por SDS PAGE, determinadas proteasas de origen vegetal (p. ej., papaína), no son capaces de escindir la porción de propéptido del procolágeno soluble sin escisión proteolítica dentro de la región helicoidal (aunque son capaces de eliminar telopéptidos del telocolágeno que se origina a partir de fuentes animales), mientras que otras proteasas (p. ej., esperasa, savinasa) no escinden eficazmente la región de propéptido del procolágeno soluble, lo que dificulta una fibrilógenesis eficaz. Mediante una experimentación metódica, los presentes inventores descubrieron que sólo proteasas de origen vegetal particulares, tales como ficina, y proteasas de origen bacteriano, tales como neutrasa y subtilisina, pueden usarse para escindir correctamente la porción de propéptido (incluyendo los telopéptidos) del procolágeno soluble para generar una preparación homogénea de atelocolágeno soluble (figuras 13, 15, 17, 19 y 20) sin digerir la región helicoidal del procolágeno no animal. Además, los presentes inventores demostraron que una tripsina recombinante también es capaz de realizar una escisión correcta (figura 26). Los presentes inventores demostraron además que la escisión con ficina permite que el atelocolágeno resultante conserve su capacidad fibrilógena (Tabla 5 de la sección de Ejemplos a continuación en el presente documento).

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, se proporciona un método para generar atelocolágeno. El método comprende poner en contacto un colágeno que comprende telopéptidos humano recombinante con una proteasa seleccionada del grupo que consiste en neutrasa, subtilisina, tripsina recombinante, pepsina recombinante y ficina, en donde el colágeno que comprende telopéptidos humano recombinante se expresa en una célula no animal, generando de esta manera el atelocolágeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión "colágeno que comprende telopéptidos" se refiere a una molécula de colágeno soluble que comprende telopéptidos que son más largos que los restos de telopéptidos comprendidos en el atelocolágeno. Por lo tanto, el colágeno que comprende telopéptidos puede ser procolágeno que comprende propéptidos de longitud completa. Como alternativa, el colágeno que comprende telopéptidos puede ser una molécula de procolágeno que comprende propéptidos parcialmente digeridos. Como alternativa adicional, el colágeno que comprende telopéptidos puede ser telocolágeno.

Como se usa en el presente documento, el término "procolágeno" se refiere a una molécula de colágeno (p. ej., humana) que comprende un propéptido en el extremo N, un propéptido en el extremo C o ambos. Las secuencias de aminoácidos de procolágeno humano de ejemplo se exponen mediante las SEQ ID NO: 30, 31, 36 y 37.

Como se usa en el presente documento, el término "telocolágeno" se refiere a moléculas de colágeno que carecen de propéptidos tanto en el extremo N como en el extremo C típicamente comprendidos en el procolágeno pero que aún contienen los telopéptidos. Como se ha mencionado anteriormente en la sección de Antecedentes en el presente documento, los telopéptidos de colágeno fibrilar son los restos de los propéptidos del extremo N y C después de la digestión con proteinasas N/C naturales.

El telocolágeno humano recombinante puede generarse en células que han sido transformadas para expresar tanto procolágeno humano exógeno como la proteasa respectiva (es decir, C o N, o ambas). Las secuencias polinucleotídicas que codifican dichas proteasas se ilustran mediante las SEQ ID NO: 39 (proteasa C) y 40 (proteasa N). Dichas proteasas se pueden expresar de manera que se acumulen en el mismo compartimento subcelular que la cadena de colágeno, como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "atelocolágeno" se refiere a moléculas de colágeno que carecen de los propéptidos del extremo N y C típicamente comprendidos en el procolágeno y al menos una porción de sus telopéptidos pero que incluyen una porción suficiente de sus telopéptidos de manera que en condiciones adecuadas es capaz de formar fibrillas.

Puede generarse cualquier tipo de atelocolágeno de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento. Los ejemplos incluyen colágenos formadores de fibrillas (tipos I, II, III, V y XI), colágenos formadores de red (tipos IV, VIII y X), colágenos asociados con superficies de fibrillas (tipos IX, XII y XIV), colágenos que se presentan como

proteínas transmembrana (tipos XIII y XVII), o que forman filamentos periódicos en forma de perlas de 11 nm (tipo VI). De acuerdo con un aspecto, el atelocolágeno comprende una cadena alfa-1 y/o alfa-2 de colágeno de tipo I.

Se apreciará que, en algunos aspectos, se divulgan en el presente documento formas modificadas genéticamente de colágeno/atelocolágeno, por ejemplo, colágenos resistentes a colagenasa y similares.

El procolágeno o telocolágeno humano recombinante puede expresarse en cualquier célula no animal, incluyendo, pero sin limitación, células vegetales y otras células eucariotas, tales como levaduras y hongos.

Las plantas en las que puede producirse (es decir, expresarse) el procolágeno o telocolágeno humano pueden ser de especies vegetales inferiores (p. ej., musgo y algas) o superiores (vasculares), incluyendo tejidos o células aisladas y extractos de los mismos (p. ej., suspensiones celulares). Son plantas preferidas las que son capaces de acumular grandes cantidades de cadenas de colágeno, colágeno y/o las enzimas de procesamiento que se describen a continuación en el presente documento. Dichas plantas también pueden seleccionarse de acuerdo con su resistencia a las condiciones de estrés y la facilidad con la que se pueden extraer los componentes expresados o el colágeno ensamblado. Los ejemplos de plantas en las que se puede expresar procolágeno humano incluyen, pero sin limitación, tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola, zanahoria, lechuga y algodón.

La producción de procolágeno humano recombinante se efectúa típicamente mediante transformación estable o transitoria con una secuencia polinucleotídica exógena que codifica procolágeno humano.

Las secuencias polinucleotídicas de ejemplo que codifican procolágeno humano se exponen mediante las SEQ ID NO: 32, 33, 41 y 42.

Como se ha mencionado, la producción de telocolágeno humano se efectúa típicamente mediante transformación estable o transitoria con una secuencia polinucleotídica exógena que codifica procolágeno humano y al menos una secuencia polinucleotídica exógena que codifica la proteasa relevante.

La estabilidad de la estructura de triple hélice del colágeno requiere la hidroxilación de las prolina por la enzima prolil-4-hidroxilasa (P4H) para formar residuos de hidroxiprolina dentro de la cadena de colágeno. Aunque las plantas son capaces de sintetizar proteínas que contienen hidroxiprolina, la prolil hidroxilasa, que es responsable de la síntesis de hidroxiprolina en células vegetales, presenta una especificidad de secuencia de sustrato relativamente débil en comparación con la P4H de mamífero. Por lo tanto, la producción de colágeno que contiene hidroxiprolina solo en la posición Y de los tripletes Gly-X-Y requiere la expresión conjunta de colágeno y genes P4H humanos o de mamífero.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, el procolágeno o telocolágeno se expresa en un compartimento subcelular de una planta que está desprovisto de actividad P4H endógena para evitar la hidroxilación incorrecta del mismo. Como se usa en el presente documento, la expresión "compartimento subcelular desprovisto de actividad P4H endógena" se refiere a cualquier región compartimentada de la célula que no incluye P4H vegetal o una enzima que tenga actividad P4H de tipo vegetal. De acuerdo con un aspecto, el compartimento subcelular es una vacuola.

La acumulación del procolágeno expresado en un compartimento subcelular desprovisto de actividad P4H endógena puede efectuarse mediante uno cualquiera de varios enfoques.

Por ejemplo, el procolágeno/telocolágeno expresado puede incluir una secuencia de señal para dirigir la proteína expresada a un compartimento subcelular tal como el apoplasto o un orgánulo (p. ej., cloroplasto). Los ejemplos de secuencias de señal adecuadas incluyen el péptido de tránsito del cloroplasto (incluido en Swiss-Prot entrada P07689, aminoácidos 1-57) y el péptido de tránsito de la mitocondria (incluido en Swiss-Prot entrada P46643, aminoácidos 1-28).

Como alternativa, la secuencia del procolágeno se puede modificar de una manera que altere la localización celular del procolágeno cuando se expresa en plantas.

En algunos aspectos, se divulgan en el presente documento células modificadas genéticamente que expresan conjuntamente tanto procolágeno humano como una P4H, capaces de hidroxilar correctamente la una o más cadenas alfa del procolágeno [es decir, hidroxilar solo la posición de prolina (Y) de los tripletes Gly-X-Y]. P4H es una enzima compuesta por dos subunidades, alfa y beta como se expone en Genbank n.º P07237 y P13674. Ambas subunidades son necesarias para formar una enzima activa, mientras que la subunidad beta también posee una función de chaperona.

La P4H expresada por las células modificadas genéticamente de la presente invención es preferentemente una P4H humana que está codificada por, por ejemplo, las SEQ ID NO: 34 y 35. Además, También se pueden usar mutantes de P4H que presentan una especificidad de sustrato mejorada u homólogos de P4H. Un homólogo de P4H adecuado se ilustra mediante una oxidoreductasa de *Arabidopsis* identificada por el número de acceso del NCBI: NP_179363.

Dado que es esencial que la P4H se acumule conjuntamente con la cadena de procolágeno expresada, la secuencia

codificante de la misma se modifica preferentemente en consecuencia (p. ej., mediante la adición o delección de secuencias de señal).

5 En células de mamífero, el colágeno también es modificado por lisil hidroxilasa, galactosiltransferasa y glucosiltransferasa. Estas enzimas modifican secuencialmente los residuos de lisilo en posiciones específicas a residuos de hidroxilisilo, galactosilhidroxilisilo y glucosilgalactosilhidroxilisilo en posiciones específicas. Una sola enzima humana, la lisil hidroxilasa 3 (LH3), como se expone en Genbank N.º 060568, puede catalizar las tres etapas de modificación consecutivas como se observa en la formación de carbohidratos ligados a hidroxilisina.

10 Por lo tanto, las células modificadas genéticamente divulgadas en el presente documento también pueden expresar LH3 de mamífero. Se puede usar una secuencia codificante de LH3 tal como la que se expone mediante la SEQ ID NO: 38 para tales fines.

15 El uno o más procolágenos y las enzimas modificadoras descritas anteriormente se pueden expresar a partir de una construcción de ácido nucleico integrada de forma estable o expresada de forma transitoria que incluye secuencias polinucleótídicas que codifican las cadenas alfa de procolágeno y/o enzimas modificadoras (p. ej., P4H y LH3) posicionadas bajo el control de la transcripción de promotores funcionales. Tal construcción de ácido nucleico (que también se denomina en el presente documento construcción de expresión) se puede configurar para su expresión en todo el organismo (p. ej., planta, tejidos definidos o células definidas) y/o en etapas de desarrollo definidas del organismo. Tal construcción también puede incluir marcadores de selección (p. ej., resistencia a antibióticos), elementos potenciadores y un origen de replicación para la replicación bacteriana.

25 Se apreciará que las construcciones que incluyen dos insertos expresables (p. ej., dos tipos de cadena alfa de procolágeno, o una cadena alfa de procolágeno y P4H) incluyen preferentemente un promotor individual para cada inserto o, como alternativa, dichas construcciones pueden expresar una única quimera de transcripción que incluye ambas secuencias de inserto bajo un único promotor. En tal caso, la transcripción quimérica puede incluir una secuencia de región de entrada intrarribosómica (IRES) entre las dos secuencias de inserto de modo que el inserto cadena abajo se puede traducir a partir de la misma.

30 Las construcciones de la presente invención pueden utilizar numerosos promotores y potenciadores de expresión funcional que pueden ser específicos de tejido, específicos del desarrollo, constitutivos o inducibles, a continuación en el presente documento se proporcionan algunos ejemplos.

35 Independientemente de la técnica de transformación empleada, una vez que se ha identificado la descendencia que expresa procolágeno, dichas plantas se cultivan adicionalmente en condiciones que maximizan la expresión de las mismas. Se puede seleccionar la descendencia resultante de plantas transformadas, verificando la presencia de ARNm exógeno y/o polipéptidos usando sondas de ácido nucleico o proteínas (p. ej., anticuerpos). El último enfoque permite la localización de los componentes polipeptídicos expresados (por ejemplo, explorando extractos vegetales fraccionados) y, por lo tanto, también verifica el potencial de la planta para el procesamiento y ensamblaje correctos de la proteína exógena.

45 Después del cultivo de dichas plantas, típicamente se recoge el colágeno que comprende telopéptidos. Los tejidos/células vegetales se recogen preferentemente en la madurez y las moléculas de procolágeno se aíslan usando enfoques de extracción. Preferentemente, la recogida se efectúa de manera que el procolágeno permanece en un estado en el que puede ser escindido por enzimas proteasas. De acuerdo con un aspecto, se genera un extracto en bruto a partir de las plantas transgénicas de la presente divulgación y posteriormente se pone en contacto con las enzimas proteasas. Se describe un método de ejemplo para generar un extracto vegetal en bruto en la sección de Ejemplos a continuación en el presente documento.

50 Se apreciará que el colágeno que comprende propéptidos o telopéptidos puede purificarse a partir de las células modificadas genéticamente de la presente divulgación antes de la incubación con proteasa o, como alternativa, puede purificarse después de la incubación con la proteasa. Como alternativa adicional, el colágeno que comprende propéptido o telopéptido puede purificarse parcialmente antes del tratamiento con proteasa y a continuación purificarse completamente después del tratamiento con proteasa. Como una alternativa más, el colágeno que comprende propéptido o telopéptido puede tratarse con proteasa simultáneamente con otros procedimientos de extracción/purificación.

60 Los métodos de ejemplo para purificar o semipurificar el colágeno que comprende telopéptidos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, precipitación salina con sulfato de amonio o similares y/o la eliminación de moléculas pequeñas por ultrafiltración.

65 Como se ha como se ha descrito en la sección de Antecedentes anterior, existe un riesgo en el uso de material de origen animal para fines médicos. Este riesgo también es relevante cuando se seleccionan las enzimas proteolíticas usadas en el procesamiento del procolágeno expresado en plantas para el atelocolágeno. La aplicación de enzimas de origen animal, tales como tripsina o pepsina, puede en sí misma contaminar la preparación final con portadores de enfermedades. Por lo tanto, se desea idear un sistema de producción donde todos los componentes estén libres de

una fuente animal.

Se ha divulgado en el presente documento que solo proteasas particulares son capaces de escindir correctamente el colágeno recombinante que comprende propéptidos o telopéptidos. Estas incluyen determinadas proteasas de origen vegetal, p. ej., ficina (EC 3.4.22.3) y determinadas proteasas de origen bacteriano, p. ej., subtilisina (EC 3.4.21.62), neutrasa. En algunas realizaciones, se divulga en el presente documento el uso de enzimas recombinantes, tales como rhtripsina y la rhpepsina. Dichas enzimas están disponibles comercialmente, p. ej., ficina de látex de higuera (Sigma, n.º de catálogo F4125 y Europe Biochem), subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Sigma, n.º de catálogo P5459), neutrasa de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* (Novozymes, n.º de catálogo PW201041) y TrypZean.TM., una tripsina humana recombinante expresada en maíz (Sigma, n.º de catálogo T3449).

El procolágeno o telocolágeno se pone en contacto preferentemente con las proteasas en condiciones tales que las proteasas puedan escindir los propéptidos o telopéptidos de las mismas. Típicamente, las condiciones se determinan de acuerdo con la proteasa particular seleccionada. Por lo tanto, por ejemplo, el procolágeno puede incubarse con una proteasa durante hasta 15 horas, a una concentración de 1-25 mg/ml y una temperatura de aproximadamente 10-20 °C.

Después de la digestión con proteasa, el atelocolágeno generado puede purificarse aún más, p. ej., mediante precipitación salina, como se describe en la sección de Ejemplos a continuación, de modo que el producto final comprenda una composición purificada de atelocolágeno que se haya procesado a partir de procolágeno generado por plantas o células vegetales mediante una proteasa seleccionada del grupo que consiste en neutrasa, subtilisina, ficina y tripsina humana recombinante y analizada usando métodos conocidos en la técnica (p. ej., análisis de tamaño mediante tinción de Coomassie, análisis por transferencia de Western, etc.).

Después de la purificación, el atelocolágeno puede resolubilizarse mediante la adición de soluciones ácidas (p. ej., HCl 10 mM). Dichas soluciones ácidas son útiles para el almacenamiento del atelocolágeno purificado.

Los presentes inventores han demostrado que después de la digestión con ficina, el atelocolágeno mantiene su capacidad de formar fibrillas tras la neutralización de las soluciones ácidas descritas anteriormente. De acuerdo con un aspecto, al menos el 70 % del atelocolágeno purificado y resolubilizado generado de acuerdo con el método de la presente invención es capaz de formar fibrillas. De acuerdo con un aspecto, al menos el 88 % del atelocolágeno purificado y resolubilizado generado de acuerdo con el método de la presente invención es capaz de formar fibrillas.

La capacidad de formar fibrillas demuestra que el atelocolágeno generado es útil para fines médicos, incluyendo, pero sin limitación, cirugía estética, auxiliar en la cicatrización para pacientes con quemaduras, reconstrucción ósea y una amplia diversidad de fines dentales, ortopédicos y quirúrgicos.

Como se ha descrito en la sección de Antecedentes, el colágeno de tipo I se considera un candidato perfecto para su uso como componente principal de un material de construcción en la bioimpresión 3D. A pesar de las importantes ventajas que ofrece este polímero natural, una serie de factores dificultan su uso para la bioimpresión 3D. El uso de colágeno extraído de tejido para este fin está limitado debido a su sensibilidad a la temperatura y fuerza iónica que impulsa la formación espontánea de gel a temperaturas superiores a 20 °C, en condiciones fisiológicas [véase, por ejemplo, PureCol, Advanced BioMatrix, Inc.]. La formación típica de gel dependiente de la temperatura de colágenos extraídos de tejido dificulta significativamente la fluidez precisa durante la impresión. Mantener los medios de impresión a baja temperatura hasta la aplicación es una posible solución para este fenómeno pero implica una limitación técnica grave. Otra solución es el uso de gelatina, la forma desnaturalizada de colágeno que no se vuelve gelatinosa en estas condiciones. Sin embargo, la gelatina carece de las interacciones genuinas entre tejido y célula del colágeno natural y, por lo tanto, se pierden funciones biológicas cruciales.

Los recientes desarrollos en tecnología han dado como resultado el desarrollo de un sistema para la purificación de colágeno de tipo I humano sin tratar (rhColágeno) introduciendo en plantas de tabaco, cinco genes humanos que codifican colágeno de tipo I heterotrimérico (COLLPLANT™, Israel; ahora también disponible en SIGMA-ALDRICH®, St. Louis, MO, EE. UU.). La proteína se purifica hasta homogeneidad mediante un proceso industrial rentable que aprovecha las propiedades únicas del colágeno. Véanse también los documentos WO 2006/035442, WO 2009/053985.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto, se divulga en el presente documento una planta modificada genéticamente que es capaz de expresar al menos un tipo de cadena alfa de colágeno y acumularla en un compartimento subcelular que está desprovisto de actividad P4H endógena.

El colágeno de tipo I y el rhColágeno se consideran candidatos para su uso como componente principal de un material de construcción en bioimpresión 3D. Se han usado armazones de diversos tipos para aplicaciones cosméticas y reconstructivas.

Además, ha habido un aumento en el uso de rellenos dérmicos para el aumento de tejidos blandos, p. ej., la reducción de arrugas. Un método posible para el uso de rellenos dérmicos incluye la inyección de un material de relleno dérmico

polimerizable en el área deseada, seguido por el contorneado o moldeado del relleno en la conformación deseada. La polimerización y reticulación del material mediante uno de diversos métodos puede transformar los monómeros en el material inyectado para formar polímeros y cadenas, que pueden formar redes, conservando la conformación moldeada deseada. Existen varios métodos para formar polímeros y reticular polímeros. Un método implica reactivos que reaccionan a la luz y reacciones inducidas por la luz que crean especies reactivas en una solución monomérica.

Sin embargo, al menos algunos de estos enfoques continúan centrándose en colágenos de origen tisular o polímeros diferentes de colágeno (p. ej., poli(alcohol vinílico) o ácido hialurónico). Además, el uso de colágeno extraído de tejido está limitado debido a su sensibilidad a la temperatura y fuerza iónica que impulsa la formación espontánea de gel a temperaturas superiores a 20 °C, en condiciones fisiológicas [véase, por ejemplo, PureCol, Advanced BioMatrix, Inc.]. La formación típica de gel dependiente de la temperatura de colágenos extraídos de tejido dificulta significativamente la fluidez precisa. Mantener los colágenos a baja temperatura hasta la aplicación es una posible solución para este fenómeno pero implica una limitación técnica grave. Otra solución es el uso de gelatina, la forma desnaturalizada de colágeno que no se vuelve gelatinosa en estas condiciones. Sin embargo, la gelatina carece de las interacciones genuinas entre tejido y célula del colágeno natural y, por lo tanto, se pierden funciones biológicas cruciales. Además, la viscosidad hace que sea más difícil inyectarlo debajo de la dermis usando agujas de calibre fino y también hace que sea más difícil esparcirlo y moldearlo en cavidades más pequeñas.

La divulgación proporciona en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende: introducir una solución polimerizable en el espacio tisular, comprendiendo la solución polimerizable: un colágeno humano de origen vegetal reticulable y un fotoiniciador; y aplicar luz a la superficie de la epidermis superficial a dicho espacio para inducir la polimerización.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además: una etapa de moldear o esculpir la solución polimerizable en una configuración deseada en el espacio tisular, en donde dicha etapa es concomitante con, o posterior a, la etapa de aplicación de luz.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la etapa de moldeado o esculpido reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno humano de origen vegetal reticulable tiene metacrilato o tiolato.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, comprendiendo la solución polimérica además un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el derivado modificado de ácido hialurónico (HA), un poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa, o nanocelulosa cristalina (CNC), comprende un derivado modificado fotopolimerizable.

La divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el derivado modificado de ácido hialurónico (HA), un poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprende un derivado con metacrilato o tiolato.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno de origen vegetal comprende rhColágeno.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno de origen vegetal se obtiene de una planta modificada genéticamente.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente es una planta modificada genéticamente seleccionada del grupo que consiste en tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola, zanahoria y algodón.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente es una planta de tabaco.

5 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente comprende una secuencia expresable de al menos una secuencia génica de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano seleccionada del grupo que consiste en: COL1, COL2, P4H-alfa, P4H-beta y LH3.

10 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno humano de origen vegetal comprende al menos una cadena alfa-1 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 3 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y al menos una cadena alfa-2 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 6 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y en donde la planta modificada genéticamente expresa además una prolil-4-hidroxilasa exógena (P4H).

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además la expresión de un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en lisil hidroxilasa (LH), proteasa N y proteasa C.

20 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la cadena alfa-1 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1.

25 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la cadena alfa-2 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2.

30 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la P4H exógena es una P4H de mamífero.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la P4H exógena es una P4H humana.

35 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además dirigir el colágeno humano alfa-1 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina.

40 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además dirigir el colágeno humano alfa-2 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno humano de origen vegetal es atelocolágeno.

45 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la fuente de luz comprende un diodo emisor de luz (LED), un láser o una lámpara de xenón.

50 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el fotoiniciador induce la polimerización de la solución polimerizable en respuesta a la luz visible.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la luz visible tiene una longitud de onda de 390-700 nm.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el fotoiniciador se selecciona del grupo que consiste en eosina Y+ trietanolamina o riboflavina.

60 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el fotoiniciador induce la polimerización de la solución polimerizable en respuesta a la luz ultravioleta (uv).

65 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el fotoiniciador se selecciona del grupo que consiste en fenil-2,4,6-

trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP) o 1-[4 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metilpropan-1-ona (IRGACURE® 2959).

5 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el fotoiniciador induce la polimerización de la solución polimerizable en respuesta a la luz infrarroja.

10 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable se introduce en el espacio tisular a través de una aguja hueca o cánula en el intervalo de calibre 27 a calibre 33.

15 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable en el espacio tisular se moldea o esculpe en la configuración deseada a través de un masaje manual.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable en el espacio tisular se moldea o esculpe en la configuración deseada usando un implemento de moldeo o esculpido.

20 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable en el espacio tisular es esencialmente no gelificable a temperatura ambiente.

25 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable en el espacio tisular es esencialmente no gelificable a 37 °C.

30 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

35 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a 37 °C en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

40 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

45 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a 37 °C en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

50 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene un mayor aumento de tejido en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

55 La divulgación proporciona además en el presente documento un uso de una solución polimerizable inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, comprendiendo la solución polimerizable un colágeno humano de origen vegetal reticulable y un fotoiniciador para inducir la polimerización antes de, de manera concomitante con, la aplicación de luz visible, y el moldeo o esculpido de la solución polimerizable en una configuración deseada para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices.

60 La divulgación proporciona además en el presente documento un uso de una solución polimerizable inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, en donde el colágeno humano de origen vegetal reticulable tiene metacrilato o tiolato.

65 La divulgación proporciona además en el presente documento un uso de una solución polimerizable inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, en donde la solución polimérica comprende además un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol

vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos.

La divulgación proporciona además en el presente documento un uso de una solución polimerizable inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, en donde el derivado modificado de ácido hialurónico (HA), un poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa, o nanocelulosa cristalina (CNC), comprende un derivado modificado fotopolimerizable.

La divulgación proporciona además en el presente documento un uso de una solución polimerizable inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, en donde el derivado modificado de ácido hialurónico (HA), un poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprende un derivado con metacrilato o tiolato.

La divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende: introducir una solución polimerizable en el espacio tisular, comprendiendo la solución polimerizable un colágeno humano de origen vegetal reticulable.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además: una etapa de moldear o esculpir la solución polimerizable en una configuración deseada en el espacio tisular.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la etapa de moldeado o esculpido reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, comprendiendo la solución polimerizable además un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno de origen vegetal comprende rhColágeno.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno de origen vegetal se obtiene de una planta modificada genéticamente.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente es una planta modificada genéticamente seleccionada del grupo que consiste en tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola, zanahoria y algodon.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente es una planta de tabaco.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente comprende una secuencia expresable de al menos una secuencia génica de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano seleccionada del grupo que consiste en: COL1, COL2, P4H-alfa, P4H-beta y LH3.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno humano de origen vegetal comprende al menos una cadena alfa-1 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 3 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y al menos una cadena alfa-2 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 6 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y en donde la planta modificada genéticamente expresa además una proil-4-hidroxilasa exógena (P4H).

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular

debajo de una epidermis, que comprende además la expresión de un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en lisil hidroxilasa (LH), proteasa N y proteasa C.

5 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la cadena alfa-1 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1.

10 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la cadena alfa-2 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la P4H exógena es una P4H de mamífero.

15 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la P4H exógena es una P4H humana.

20 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además dirigir el colágeno humano alfa-1 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina.

25 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además dirigir el colágeno humano alfa-2 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno humano de origen vegetal es atelocolágeno.

30 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable se introduce en el espacio tisular a través de una aguja hueca o cánula en el intervalo de calibre 27 a calibre 33.

35 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable en el espacio tisular se moldea o esculpe en la configuración deseada a través de un masaje manual.

40 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable en el espacio tisular se moldea o esculpe en la configuración deseada usando un implemento de moldeo o esculpido.

La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable en el espacio tisular es esencialmente no gelificable a temperatura ambiente.

45 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable en el espacio tisular es esencialmente no gelificable a 37 °C.

50 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

55 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a 37 °C en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

60 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

65 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal

se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a 37 °C en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

5 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un método para rellenar un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución polimerizable que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene un mayor aumento de tejido en comparación con una solución polimerizable análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

10 La divulgación proporciona además en el presente documento un uso de una solución polimerizable inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, comprendiendo la solución polimerizable un colágeno humano de origen vegetal reticulable y moldear o esculpir la solución polimerizable en una configuración deseada para reducir líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices.

15 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis que comprende introducir una solución en el espacio tisular, comprendiendo la solución: un colágeno humano de origen vegetal y al menos un factor de crecimiento o fuente del mismo.

20 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la fuente del al menos un factor de crecimiento comprende un plasma o un plasma rico en plaquetas.

25 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el armazón del crecimiento celular promueve la curación o el reemplazo debido a la degradación o lesión de un tejido que comprende colágeno.

30 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el tejido que comprende colágeno se selecciona del grupo que consiste en un tendón, un ligamento, piel, una córnea, un cartílago, un vaso sanguíneo, un intestino, un disco intervertebral, un músculo, un hueso o un diente.

35 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el armazón del crecimiento celular promueve la curación de la tendinitis.

La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno de origen vegetal comprende rhColágeno.

40 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno de origen vegetal se obtiene de una planta modificada genéticamente.

45 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente es una planta modificada genéticamente seleccionada del grupo que consiste en tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola, zanahoria y algodón.

50 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente es una planta de tabaco.

55 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la planta modificada genéticamente comprende una secuencia expresable de al menos una secuencia génica de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano seleccionada del grupo que consiste en: COL1, COL2, P4H-alfa, P4H-beta y LH3.

60 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno humano de origen vegetal comprende al menos una cadena alfa-1 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 3 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y al menos una cadena alfa-2 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 6 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y en donde la planta modificada genéticamente expresa además una prolil-4-hidroxilasa exógena (P4H).

65 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además la expresión de un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en lisil hidroxilasa (LH), proteasa N y proteasa C.

La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la cadena alfa-1 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1.

5 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la cadena alfa-2 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2.

10 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la P4H exógena es una P4H de mamífero.

La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la P4H exógena es una P4H humana.

15 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además dirigir el colágeno humano alfa-1 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina.

20 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, que comprende además dirigir el colágeno humano alfa-2 a una vacuola de la planta o la planta modificada genéticamente y digerirlo con ficina.

25 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde el colágeno humano de origen vegetal es atelocolágeno.

30 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

35 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una viscosidad reducida a 37 °C en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

40 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a temperatura ambiente en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

45 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal se introduce en el espacio tisular con una fuerza reducida a 37 °C en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

50 La divulgación proporciona además en el presente documento un método para inducir un armazón del crecimiento celular en un espacio tisular debajo de una epidermis, en donde la solución que comprende el colágeno humano de origen vegetal tiene una formación de armazón aumentada o promueve un aumento en el crecimiento celular en comparación con una solución análoga que comprende un colágeno humano o bovino extraído de tejido en la misma concentración y formulación.

55 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un uso de una solución inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para inducir un armazón del crecimiento celular, comprendiendo la solución un colágeno humano de origen vegetal y al menos un factor de crecimiento o fuente del mismo, para promover la curación o el reemplazo debido a la degradación o lesión de un tejido que comprende colágeno.

60 La presente divulgación proporciona además en el presente documento un uso de una solución inyectada en un espacio tisular debajo de una epidermis para inducir un armazón del crecimiento celular, en donde la fuente del al menos un factor de crecimiento comprende un plasma o un plasma rico en plaquetas.

Definiciones

65 As used herein, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto

indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una molécula" también incluye una pluralidad de moléculas.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere $\pm 10\%$ o $\pm 5\%$.

- 5 Los términos y expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus variaciones significan "incluyendo, pero sin limitación".

La expresión "que consiste en" significa "que incluye y se limita a".

- 10 La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, el método o la estructura reivindicados.

- 15 Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada incluyendo, pero sin limitación, las maneras, medios, técnicas y procedimientos tanto conocidos como desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los especialistas de las técnicas químicas, farmacológicas, biológico, bioquímicas y médicas.

- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión "planta modificada genéticamente" abarca cualquier planta inferior (p. ej., musgo) o superior (vascular) o un tejido o una célula aislada de la misma (p. ej., de una suspensión celular) que se transforma de forma estable o transitoria con una secuencia polinucleotídica exógena. Los ejemplos de plantas incluyen, pero sin limitación, tabaco, maíz, alfalfa, arroz, patata, soja, tomate, trigo, cebada, canola, algodón, zanahoria, así como plantas inferiores, tales como el musgo.

- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "cadena de colágeno" abarca a una subunidad de colágeno tal como las cadenas alfa 1 o 2 de fibras de colágeno, preferentemente fibras de tipo I. Como se usa en el presente documento, la expresión "colágeno" se refiere a un trímero de colágeno ensamblado, que en el caso del colágeno de tipo I incluye dos cadenas alfa 1 y una cadena alfa 2. Una fibra de colágeno es colágeno que está desprovisto de propéptidos terminales C y N.

- 30 Como se usa en el presente documento, la expresión "colágeno que comprende telopéptidos" abarca una molécula de colágeno soluble que comprende telopéptidos que son más largos que los restos de telopéptidos comprendidos en el atelocolágeno. Por lo tanto, el colágeno que comprende telopéptidos puede ser procolágeno que comprende propéptidos de longitud completa. Como alternativa, el colágeno que comprende telopéptidos puede ser una molécula de procolágeno que comprende propéptidos parcialmente digeridos. Como alternativa adicional, el colágeno que comprende telopéptidos puede ser telocolágeno.

- 35 Como se usa en el presente documento, el término "procolágeno" abarca una molécula de colágeno (p. ej., humana) que comprende un propéptido del extremo N, un propéptido en el extremo C o ambos. Las secuencias de aminoácidos de procolágeno humano de ejemplo se exponen mediante las SEQ ID NO: 1, 2, 7 y 8.

- 40 Como se usa en el presente documento, el término "telocolágeno" abarca moléculas de colágeno que carecen de propéptidos tanto del extremo N como C típicamente comprendidos en el procolágeno pero que aún contienen los telopéptidos. Los telopéptidos de colágeno fibrilar son los restos de los propéptidos del extremo N y C después de la digestión con proteinasas N/C naturales. El telocolágeno humano recombinante puede generarse en células que han sido transformadas para expresar tanto procolágeno humano exógeno como la proteasa respectiva (es decir, C o N, o ambas). Las secuencias polinucleotídicas que codifican dichas proteasas se ilustran mediante las SEQ ID No: 10 (proteasa C) y 11 (proteasa N). Dichas proteasas se pueden expresar de manera que se acumulen en el mismo compartimento subcelular que la cadena de colágeno, como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento.

- 45 Como se usa en el presente documento, el término "atelocolágeno" abarca moléculas de colágeno que carecen de los propéptidos del extremo N y C que típicamente están comprendidos en el procolágeno y al menos una porción de sus telopéptidos, pero que incluyen una porción suficiente de sus telopéptidos de manera que, en condiciones adecuadas, es capaz de formar fibrillas. Se puede generar cualquier tipo de atelocolágeno de acuerdo con el método de la presente invención. Los ejemplos incluyen colágenos formadores de fibrillas (tipos I, II, III, V y XI), colágenos formadores de red (tipos IV, VIII y X), colágenos asociados con superficies de fibrillas (tipos IX, XII y XIV), colágenos que se presentan como proteínas transmembrana (tipos XIII y XVII), o que forman filamentos periódicos en forma de perlas de 11 nm (tipo VI). De acuerdo con un aspecto, el atelocolágeno comprende una cadena alfa 1 y/o 2 de colágeno de tipo I.

- 50 Se apreciará que los rellenos dérmicos divulgados en el presente documento pueden comprender, en algunos aspectos, formas genéticamente modificadas de colágeno/atelocolágeno, por ejemplo, colágenos resistentes a colagenasa y similares.

- 55 Como se usa en el presente documento, la expresión "promotor vegetal" o "promotor" incluye un promotor que puede

dirigir la expresión génica en células (incluyendo orgánulos que contienen ADN) de plantas, hongos y levadura. Un promotor de este tipo puede ser de origen vegetal, bacteriano, vírico, fúngico o animal. Tal promotor puede ser constitutivo, es decir, es capaz de dirigir altos niveles de expresión génica en una pluralidad de tejidos, es específico de tejido, es decir, es capaz de dirigir la expresión génica en un tejido o tejidos particulares, es inducible, es decir, es capaz de dirigir la expresión génica bajo un estímulo, o es quimérico, es decir, está formado por porciones de al menos dos promotores diferentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "compartimento subcelular desprovisto de actividad P4H endógena" se refiere a cualquier región compartimentada de la célula que no incluye P4H vegetal o una enzima que tenga actividad P4H de tipo vegetal. Los ejemplos de dichos compartimentos subcelulares incluyen la vacuola, el apoplasto y el citoplasma, así como orgánulos tales como el cloroplasto, las mitocondrias y similares.

A lo largo del presente documento, la expresión "material de construcción" abarca las expresiones "material de construcción no curado" o "formulación de material de construcción no curado" y describe colectivamente los materiales que se usan para formar secuencialmente las capas, como se describe en el presente documento. Esta expresión abarca materiales no curados que forman el objeto final, en concreto, una o más formulaciones de material de modelado no curado y, opcionalmente, también materiales no curados usados para formar un soporte, en concreto formulaciones de materiales de soporte sin curar. Un material de construcción no curado puede comprender una o más formulaciones de modelado y se puede dispensar de manera que se formen diferentes partes del objeto al curar diferentes formulaciones de modelado y, por lo tanto, estén hechas de diferentes materiales de modelado curados o diferentes mezclas de materiales de modelado curados.

Como se usa en el presente documento, "bioimpresión" significa poner en práctica un proceso de fabricación aditiva mientras se usan una o más formulaciones de biotinta que comprenden componentes biológicos a través de una metodología que es compatible con un sistema de fabricación aditiva automatizado o semiautomatizado, asistido por ordenador, como se describe en el presente documento (p. ej., una bioimpresora o un sistema de bioimpresión).

A lo largo del presente documento, en el contexto de la bioimpresión, el término "objeto" describe un producto final de la fabricación aditiva que comprende, en al menos una porción del mismo, componentes biológicos. Este término se refiere al producto obtenido mediante un método de bioimpresión como se describe en el presente documento, después de la retirada del material de soporte, si se ha usado como parte del material de construcción no curado. En algunos aspectos, los componentes biológicos incluyen colágeno humano recombinante, como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 2006/035442, WO 2009/053985.

Como se usa a lo largo del presente documento, el término "objeto" se refiere a un objeto completo o una parte del mismo.

A lo largo del presente documento, un "material curable" es un compuesto (compuesto monomérico u oligomérico o polimérico) que, cuando se expone a una condición de curado, como se describe en el presente documento, se solidifica o se endurece para formar un material de modelado curado como se define en el presente documento. Los materiales curables son típicamente materiales polimerizables, que experimentan polimerización y/o reticulación cuando se exponen a una fuente de energía adecuada. Como alternativa, los materiales curables son materiales termosensibles, que se solidifican o se endurecen tras la exposición a un cambio de temperatura (p. ej., calentamiento o enfriamiento). Opcionalmente, los materiales curables son materiales biológicos que experimentan una reacción para formar un material endurecido o sólido tras una reacción biológica (p. ej., una reacción catalizada enzimáticamente).

Una "condición de curado" abarca una energía de curado (p. ej., temperatura, radiación) y/o un material o reactivo que promueve el curado.

En algunos de los aspectos descritos en el presente documento, un material curable es un material fotopolimerizable, que se polimeriza o experimenta reticulación tras la exposición a la radiación, como se describe en el presente documento, y en algunos aspectos el material curable es un material curable por UV o curable por luz visible, que se polimeriza o experimenta reticulación tras la exposición a la radiación UV-vis, como se describe en el presente documento.

En algunos de los aspectos descritos en el presente documento, un material curable puede ser un monómero, un oligómero o un polímero de cadena corta, cada uno de los cuales es polimerizable como se describe en el presente documento.

En el presente documento, el término "curable" abarca los términos "polimerizable" y "reticulable".

Como se usa en el presente documento, "aeroponía" es el proceso de cultivo de plantas en un entorno de aire o niebla sin el uso de tierra o un medio agregado (conocido como "geoponía").

Como se usa en el presente documento, "hidroponía" es el proceso de cultivo de plantas sin suelo ("geoponía"),

usando soluciones de nutrientes minerales en un disolvente acuoso.

Como se usa en el presente documento, la "endosfera" comprende todos los endófitos de una planta.

- 5 Como se usa en el presente documento, un "exudado" es un fluido emitido por un organismo a través de poros o una herida. "Exudación" es el proceso de emisión de un "exudado".

Como se usa en el presente documento, "hidroponía" es el proceso de cultivo de plantas sin suelo ("geoponía"), usando soluciones de nutrientes minerales en un disolvente acuoso.

- 10 Como se usa en el presente documento, "integresión" o "hibridación por integresión" es el movimiento de un gen (es decir, "flujo génico") desde el acervo genético de una especie al acervo genético de otra especie a través de un retrocruzamiento repetido de un híbrido interespecífico con una de sus especies precursoras, distinta de la hibridación simple, y que da como resultado una mezcla compleja de genes precursores.

- 15 Como se usa en el presente documento, el "metaboloma" es el conjunto completo de productos químicos de molécula pequeña que se encuentran dentro de una "muestra biológica" (incluyendo, pero sin limitación, una célula, un orgánulo, un órgano, un tejido, un extracto tisular, un biofluido o un organismo). Los productos químicos de molécula pequeña del metaboloma pueden ser "metabolitos endógenos" o "productos químicos exógenos". Los "metabolitos endógenos" son producidos de manera natural por un organismo e incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, aminos, azúcares, vitaminas, cofactores, pigmentos y antibióticos. Las "productos químicos exógenos" no son producidas de forma natural por el organismo e incluyen, pero sin limitación, fármacos, contaminantes ambientales, aditivos alimentarios, toxinas y otros xenobióticos. El "metaboloma endógeno" está compuesto por los metabolitos endógenos, mientras que el "metaboloma exógeno" está compuesto por los "agentes químicos exógenos". El "metaboloma endógeno" está compuesto por un "metaboloma primario" y un "metaboloma secundario", especialmente con respecto a plantas, hongos y procariotas. El "metaboloma primario" está compuesto por "metabolitos primarios" (es decir, metabolitos directamente implicados en el crecimiento, desarrollo y reproducción normales del organismo), mientras que el "metaboloma secundario" está compuesto por "metabolitos secundarios" (es decir, metabolitos que no están directamente implicados en el crecimiento, desarrollo o reproducción normales del organismo). Los metabolitos secundarios a menudo tienen funciones ecológicas significativas.

- 20 Como se usa en el presente documento, un "metabolito" es normalmente una molécula pequeña que tiene un peso molecular de menos de 1500 Da. Un "metabolito" puede incluir, pero sin limitación, un glucolípido, un polisacárido, un péptido corto, un oligonucleótido pequeño, un ácido orgánico, un taxano, un alcaloide y estrigolactona, mientras que las macromoléculas muy grandes (p. ej., proteínas, ARNm, ARNr y ADN) generalmente no son metabolitos y no forman parte del metaboloma.

Como se usa en el presente documento, la "base de datos SILVA" es la base de datos de ARN ribosómico SILVA.

- 40 Todas las muestras obtenidas de un organismo, incluidas aquellas sometidas a cualquier tipo de procesamiento posterior, se consideran obtenidas del organismo.

- 45 Los métodos para el aislamiento, secuenciación, amplificación y/o clonación de ADN son conocidos por un experto en la técnica. El método más comúnmente usado para la amplificación de ADN es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa; véanse, por ejemplo, PCR Basics: from background to Bench, Springer Verlag, 2000; Eckert *et al.*, 1991. PCR Methods and Applications 1:17). Los métodos de amplificación adecuados adicionales incluyen la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación de la transcripción y la replicación de secuencia autosostenida, y la amplificación de secuencia basada en ácidos nucleicos (NASBA). De manera análoga, los métodos para el aislamiento, caracterización y similares de ARN y proteínas, y para la expresión de proteínas son conocidos por un experto en la técnica.

- 50 Los siguientes ejemplos se presentan con el de ilustrar más completamente algunos aspectos de los rellenos dérmicos y usos de los mismos, divulgados en el presente documento. Sin embargo, no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del amplio alcance de los rellenos dérmicos divulgados en el presente documento ni de sus usos. Un experto en la materia puede idear fácilmente muchas variaciones y modificaciones de los principios divulgados en el presente documento sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplos

- 60 Ejemplo 1. Construcciones y esquemas de transformación.

- Las construcciones de casetes de expresión y vectores que se usan en este trabajo se ilustran en las figuras 1a-d (véase también la Pat. de EE. UU. 8.455.717). Todas las secuencias codificantes en este trabajo se optimizaron para la expresión en tabaco y se sintetizaron químicamente con las regiones flanqueantes deseadas (SEQ ID NO: 1, 4, 7, 12, 14, 16, 18, 20, 22). Figura 1A: Los genes sintéticos que codifican Coll y Col2 (SEQ ID NO: 1, 4) fusionados ya sea a la señal vacuolar o a la señal de apoplasto (codificada por la SEQ ID NO: 7) o sin señales se clonaron en casetes

de expresión compuestos por un promotor *rbcS1* de *Chrysanthemum* y 5' UTR (SEQ ID NO: 10) y una 3' UTR de *rbcS1* de *Chrysanthemum* y un terminador (SEQ ID NO: 11). Los casetes de expresión completos se clonaron en el sitio de clonación múltiple del vector de transformación vegetal pBINPLUS (van Engelen *et al.*, 1995, Transgenic Res 4: 288-290). Figura 1b: Los genes sintéticos que codifican P4H beta-humana, P4H alfa-humana y P4H vegetal (SEQ ID NO: 12, 14 y 16) fusionados ya sea a la señal vacuolar o a la señal de apoplasto (codificada por la SEQ ID NO: 7) o sin señales se clonaron en casetes de expresión compuestos por el promotor 35S de CaMV y la secuencia omega de TMV y el terminador de la nopalina sintetasa (NOS) de *Agrobacterium* transportado por el vector pJD330 (Galili *et al.*, 1987, Nucleic Acids Res 15: 3257-3273). Los casetes de expresión completos se clonaron en el sitio de clonación múltiple de los vectores pBINPLUS que llevan los casetes de expresión de Coll o Col2. Figura 1c: Los genes sintéticos que codifican la proteinasa C y la proteinasa N (SEQ ID NO: 18, 20) fusionados ya sea a la señal vacuolar o a la señal de apoplasto (codificada por la SEQ ID NO: 7) se clonaron en casetes de expresión compuestos por un promotor *rbcS1* de *Chrysanthemum* y 5' UTR (SEQ ID NO: 10) y una 3' UTR de *rbcS1* de *Chrysanthemum* y un terminador (SEQ ID NO: 11). Los casetes de expresión completos se clonaron en el sitio de clonación múltiple del vector de transformación vegetal pBINPLUS. Figura 1d: El gen sintético que codifica LH3 (SEQ ID NO: 22) con el promotor flanqueante del virus de las bandas de las venas de la fresa (SVBV) (número de acceso del NCBI AF331666 REGIÓN: 623.950 versión AF331666.1 GI:13345788) y terminado por el terminador de la octopina sintasa (OCS) de *Agrobacterium* (número de acceso del NCBI Z37515 REGIÓN: 1344.1538 versión Z37515.1 GI:886843) fusionado a la señal vacuolar o a la señal de apoplasto (codificada por SEQ ID NO: 7) o sin señales se clonó en el sitio de clonación múltiple del vector pBINPLUS que lleva los casetes de expresión de Coll y P4H beta.

En la figura 2 se ilustran esquemas de cotransformaciones que utilizan los casetes de expresión descritos en las figuras 1a-d en una planta hospedadora. Cada inserto de casete de expresión está representado por un nombre corto de la secuencia codificante. Las secuencias codificantes y las SEQ ID NO relacionadas se describen en la Tabla 1. Cada cotransformación se realiza mediante dos vectores binarios pBIN PLUS. Cada rectángulo representa un único vector pBINPLUS que lleva uno, dos o tres casetes de expresión. Los promotores y terminadores se especifican en las figuras 1a-d.

Ejemplo 2. Expresión de colágeno vegetal.

Se diseñaron y se optimizaron secuencias polinucleotídicas sintéticas que codifican las proteínas enumeradas en la Tabla 1 a continuación para determinar la expresión en plantas de tabaco.

TABLA 1
Lista de proteínas expresadas

Nombre:	Acceso de SwissProt	Aminoácidos	Isoforma de corte y empalme	Deleciones	nombre	Incluida en la SEQ ID NO.	Codificada por la SEQ ID NO.
Cadena alfa 1(I) de colágeno [Precursor]	p02452	1442	Una versión	Señal de RE	Col1	3	1
Cadena alfa 2(I) de colágeno [Precursor]	p08123 Dos cambios hechos en p08123: D549A y N249I	1342	Una versión	Señal de RE	Col2	6	4
Subunidad beta de prolil 4-hidroxilasa	p07237	487	Una versión	Señal de RE, KDEL	P4H beta humana	13	12
Subunidad alfa-1 de prolil 4-hidroxilasa	p13674	517	P13674-1	Señal de RE	P4H alfa humana	15	14
Planta de prolil 4-hidroxilasa	Sin entrada en Swissprot. Acceso del NCBI: gi: 15227885	252	Una versión	Señal mitocondrial predicha como: aa1-39	P4Hvegetal	17	16
Proteinasa C de procolágeno	p13497	866	P13497-1 BMP1-3	Señal de RE, propéptido	Proteinasa C	19	18

(continuación)

Lista de proteínas expresadas

Nombre:	Acceso de SwissProt	Aminoácidos	Isoforma de corte y empalme	Deleciones	nombre	Incluida en la SEQ ID NO.	Codificada por la SEQ ID NO.
Proteinasa N de procolágeno I	o95450	958	O95450-1 LpNPI	Señal de RE, propéptido	Proteinasa N	21	20
Lisil hidroxilasa 3	o60568	714	Una versión	Señal de RE	LH3	23	22

Péptidos señal

1. Secuencia señal vacuolar del gen de cebada para el precursor de la tior proteasa aleuraína (número de acceso del NCBI P05167 GI:113603) MAHARVLLALAVLATAAVAVASSSSSFADSNPIRPVTDRAASTLA (SEQ ID NO: 24).
2. Señal de apoplasto de la endo-1,4-beta-glucanasa de *Arabidopsis thaliana* (Célula, número de acceso del NCBI CAA67156.1 GI:2440033); SEQ ID NO. 9, codificada por la SEQ ID NO. 7.

Construcción de plásmidos

Los vectores de expresión vegetal se construyeron como se enseña en el Ejemplo 1, y la composición de cada vector de expresión construido se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación.

Se construyeron vectores de expresión que incluían los siguientes casetes de expresión:

1. Colágeno alfa 1
2. Colágeno alfa 1 + subunidad beta de P4H humana
3. Colágeno alfa 1 + subunidad beta de P4H humana + LH3 humana
4. Colágeno alfa 2
5. Colágeno alfa 2 + con subunidad alfa de P4H humana
6. Colágeno alfa 2 + con P4H de *Arabidopsis*
7. Subunidad beta de P4H humana + LH3 humana
8. Subunidad alfa de P4H humana

Cada una de las secuencias codificantes descritas anteriormente se fusionó traduccionalmente a un péptido de tránsito de vacuola o a un péptido de tránsito de apoplasto o carecía de cualquier secuencia peptídica de tránsito, en cuyo caso se espera una acumulación citoplasmática.

Transformación de plantas y cribado por PCR

Las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, Samsun NN) se transformaron con los vectores de expresión descritos anteriormente de acuerdo con el esquema de transformación enseñado en la figura 2.

Las plantas transgénicas resultantes se cribaron mediante PCR múltiple usando cuatro cebadores que se diseñaron para que fueran capaces de amplificar un fragmento de 324 pb de colágeno alfa 1 y un fragmento de 537 pb de colágeno alfa 2 (Tabla 2). La figura 3 ilustra los resultados de un cribado por PCR múltiple.

TABLA 2

Lista de cebadores para PCR múltiple para la amplificación de un fragmento de 324 pb de colágeno alfa 1 y un fragmento de 537 pb de colágeno alfa 2

Cebador directo Col1 (24 mer):	5' ATCACCAGGAGAACAGGGACCATC 3'	SEQ ID 25
Cebador inverso Col1 (29 mer):	5' TCCACTTCCAAATCTCTATCCCTAACAAC 3'	SEQ ID 26
Cebador directo Col2 (23 mer):	5' AGGCATTAGAGGCGATAAGGGAG 3'	SEQ ID 27
Cebador inverso Col2 (27 mer):	5' TCAATCCAATAATAGCCACTTGACCAC 3'	SEQ ID 28

Ejemplo 3. Detección de colágeno humano en plantas de tabaco transgénicas.

Se extrajeron proteínas solubles totales de los transformantes de tabaco 2, 3 y 4 moliendo 500 mg de hojas en 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM a pH = 7,5 con un cóctel de inhibidores de proteasas "Complete" (producto n.º 1836145 de Roche Diagnostics GmbH, 1 comprimido por cada 50 ml de tampón). El extracto en bruto se mezcló con 250 µl de tampón de aplicación de muestra 4x que contenía beta-mercaptoetanol al 10 % y SDS al 8 %, las muestras se hirvieron durante 7 minutos y se centrifugaron durante 8 minutos a 13.000 rpm. Se cargaron 20 µl del sobrenadante en un gel de poliacrilamida al 10 % y se ensayaron con anticuerpo anti colágeno I (desnaturalizado) (n.º AB745 de Chemicon Inc.) en un procedimiento de transferencia de Western estándar (figura 4). W.T. es un tabaco de tipo natural. Las bandas de colágeno positivas son visibles en plantas que son positivas por PCR para el colágeno de tipo I alfa 1 o alfa 2, o ambos. La banda de control positiva de 500 ng de colágeno de tipo I de placenta humana (n.º CC050 de Chemicon Inc.) representa aproximadamente el 0,3 % de las proteínas solubles totales (aproximadamente 150 µg) en las muestras de las plantas transgénicas.

Se detectaron plantas que expresaban colágeno con el peso molecular esperado hasta aproximadamente el 1 % de las proteínas solubles totales cuando el colágeno se dirigió a la vacuola (figura 4). Se logró con éxito el direccionamiento subcelular del colágeno de longitud completa al apoplasto (figura 5). Las plantas que expresan colágeno en el citoplasma (es decir, sin péptido de direccionamiento) no acumularon colágeno a niveles detectables, lo que demuestra que el direccionamiento subcelular del colágeno en las plantas es fundamental para el éxito.

Además, en contraste con los estudios de Ruggiero *et al.* 2000 y Merle *et al.* 2002 que demostraron que el colágeno que carecía del propéptido N se sometió a una proteólisis significativa, usando el presente enfoque, las proteínas de colágeno de longitud completa con propéptido C y propéptido N se acumularon en compartimentos subcelulares a niveles altos.

Los datos actuales también muestran claramente que cruzar dos plantas que expresan cada una un tipo de cadena de colágeno diferente es ventajoso porque permite la selección de plantas que expresan niveles óptimos de cada tipo de cadena y el posterior cruce de plantas para lograr la planta productora de colágeno deseada.

El colágeno producido por las plantas de la presente invención incluye los propéptidos naturales y, por lo tanto, se espera que forme una proteína más grande que el control humano que se purificó por proteólisis. El peso molecular calculado de las cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno sin hidroxilaciones ni glucosilaciones es el siguiente: Coll con propéptidos: 136 kDa, Coll sin propéptidos: 95 kDa, Col2 con propéptidos: 127 kDa, Coll sin propéptidos: 92 kDa.

Como se puede observar en la figura 4, las bandas de Coll en los transformantes 3-5 y 3-49 parecen más grandes que las bandas de Coll en otras plantas. Esto indica hidroxilación de prolina en cadenas de colágeno por la holoenzima prolina-4-hidroxilasa humana compuesta por subunidades alfa y beta que se expresaron conjuntamente en estas plantas y se dirigieron al mismo compartimento subcelular que las cadenas de colágeno humano (p. ej., vacuola).

Ejemplo 4. Ensamblaje de triple hélice de colágeno y estabilidad térmica en plantas transgénicas.

El ensamblaje de la triple hélice de colágeno y la estabilidad térmica de la hélice en plantas transgénicas se ensayaron mediante desnaturalización térmica seguida de digestión con tripsina o pepsina del extracto de proteína en bruto total de plantas transgénicas (figuras 6a-b).

En un primer experimento, las proteínas solubles totales del tabaco 2-9 (que expresan solo col alfa 1 y no P4H) y 3-5 (que expresan tanto col alfa 1+2 como P4H) se extrajeron moliendo 500 mg de hojas en 0,5 ml de Tris-HCl 50 mM a pH = 7,5, centrifugando durante 10 minutos a 13.000 rpm y recogiendo el sobrenadante. 0 µl del sobrenadante se sometieron a tratamiento térmico (15 minutos a 33 °C o 43 °C) y a continuación se colocaron inmediatamente en hielo. La digestión con tripsina se inició añadiendo a cada muestra 6 µl de tripsina de 1 mg/ml en Tris-HCl 50 mM a pH = 7,5. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente a 22 °C). La digestión se finalizó añadiendo 20 µl de tampón de aplicación de muestra 4x que contenía beta-mercaptoetanol al 10 % y SDS al 8 %, las muestras se hirvieron durante 7 minutos y se centrifugaron durante 7 minutos a 13.000 rpm. Se cargaron 50 µl del sobrenadante en un gel de poliacrilamida al 10 % y se ensayaron con anticuerpo anti colágeno I (n.º AB745 de Chemicon Inc.) usando un procedimiento de transferencia de Western estándar. Los controles positivos fueron muestras de 500 ng de colágeno humano 1 (n.º CC050 de Chemicon Inc., extraído de placenta humana mediante digestión con pepsina) que se añadió a 50 µl de proteínas solubles totales extraídas de tabaco w.t.

Como se muestra en la figura 6a, la triple hélice de colágeno que se formó en las plantas n.º 3-5, así como el colágeno humano de control, fue resistente a la desnaturalización a 33 °C. En contraste, el colágeno formado por las plantas n.º 2-9 se desnaturalizó a 33 °C. Esta diferencia en la estabilidad térmica indica un ensamblaje de la triple hélice exitoso y una hidroxilación de prolina postraducciona en los transformantes n.º 3-5 que expresan tanto colágeno alfa 1 como colágeno alfa 2, así como las subunidades beta y alfa de P4H.

Dos bandas en los transformantes n.º 2-9 pueden representar dímeros o trímeros, que son estables después de 7 minutos de ebullición con SDS y mercaptoetanol. Se pueden observar bandas similares en el colágeno humano (panel superior) y en los transformantes n.º 3-5. Una posible explicación es un enlace covalente entre dos péptidos en triples hélices diferentes (enlace cruzado), formado después de la desaminación oxidativa de dos lisinas por la lisina

oxidasa.

En un segundo experimento, las proteínas solubles totales de tabaco transgénico 13-6 (que expresa las cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno I, señaladas con flechas, subunidades alfa y beta de P4H humana y LH3 humana) se extrajeron moliendo 500 mg de hojas en 0,5 ml de Tris-HCl 100 mM a pH = 7,5 y NaCl 300 mM, centrifugando durante 7 minutos a 10.000 rpm y recogiendo el sobrenadante. 50 µl del sobrenadante se sometieron a tratamiento térmico (20 minutos a 33 °C, 38 °C o 42 °C) y a continuación se colocaron inmediatamente en hielo. La digestión con pepsina se inició añadiendo a cada muestra 4,5 µl de HCl 0,1 M y 4 µl de pepsina a razón de 2,5 mg/ml en ácido acético 10 mM. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente a 22 °C). La digestión se finalizó añadiendo 5 µl de Tris 1 M sin tampón. Cada muestra se mezcló con 22 µl de tampón de aplicación de muestra 4x que contenía beta-mercaptoetanol al 10 % y SDS al 8 %, se hirvió durante 7 minutos y se centrifugó durante 7 minutos a 13.000 rpm. Se cargaron 40 µl del sobrenadante en un gel de poliacrilamida al 10 % y se ensayaron con anticuerpo anti colágeno I (n.º AB745 de Chemicon Inc.) en un procedimiento de transferencia de Western estándar. El control positivo fue una muestra de aproximadamente 50 ng de colágeno I humano (n.º CC050 de Chemicon Inc., extraído de placenta humana mediante digestión con pepsina) añadido a proteínas solubles totales de tabaco w.t.

Como se ilustra en la figura 6b, la triple hélice de colágeno que se formó en la planta n.º 13-6 fue resistente a la desnaturalización a 42 °C. La escisión de los propéptidos es visible por primera vez a 33 °C y aumenta gradualmente en eficiencia cuando la temperatura se eleva a 38 °C y de nuevo a 42 °C. El dominio de triple hélice de colágeno escindido muestra una migración similar en el gel a la migración del colágeno humano tratado con pepsina. El colágeno humano que se usó en este experimento se extrajo de placenta humana por proteólisis de pepsina y, por lo tanto, carece de los propéptidos y algunos de los telopéptidos.

Ejemplo 5. Expresión de P4H vegetal.

Inducción de P4H vegetal natural

El ADNc de P4H del tabaco se clonó y se usó como sonda para determinar las condiciones y los tratamientos que inducirían la expresión endógena de P4H. El análisis de transferencia de Northern (figura 7) muestra claramente que P4H se expresa en niveles relativamente altos en el brote apical y en niveles bajos en las hojas. El nivel de P4H se indujo significativamente en las hojas 4 horas después del tratamiento de abrasión ("herida" en el panel inferior). Se lograron resultados similares usando otras condiciones de estrés (no se muestran).

Detección de subunidades alfa y beta de P4H humana y cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno en plantas de tabaco transgénicas

La detección de subunidades alfa y beta de P4H humana y cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno de tipo I en plantas de tabaco transgénicas se realizó usando un anticuerpo anti subunidad alfa de P4H humana (n.º 63-163 de ICN Biomedicals Inc.), anticuerpo anti subunidad beta de P4H humana (n.º NMAB2701 de Chemicon Inc.) y anticuerpo anti colágeno I (n.º AB745 de Chemicon Inc.). Los resultados de una transferencia de Western analizados con estos anticuerpos se muestran en la figura 8.

La expresión de bandas de P4H alfa, P4H beta y de colágeno 1 alfa 1 y alfa 2 se confirmó en la planta 13-6 (también transformada con LH3 humana). Los pesos moleculares calculados de P4H alfa y beta, incluido el péptido señal vacuolar, son 65,5 kDa y 53,4 kDa, respectivamente. Los pesos moleculares calculados de las cadenas alfa 1 y alfa 2 de colágeno con propéptidos, sin hidroxilaciones ni glucosilaciones son 136 kDa y 127 kDa, respectivamente.

Ejemplo 6. El colágeno dirigido a la vacuola se expresa de forma estable en plantas cultivadas en oscuridad.

Plantas que expresan colágeno:

La línea de planta de tabaco precursora 20-279 se generó mediante cotransformación con un vector de expresión que expresaba P4Hbeta+LH3 y otro vector de expresión que expresaba P4Halfa. Cada gen está precedido de un determinante de direccionamiento vacuolar de aleuraina, una tiol proteasa vacuolar vegetal,

La línea de planta de tabaco precursora 2-300 se generó mediante cotransformación con un vector de expresión que expresaba coll y otro vector de expresión que expresaba col2. Cada gen está precedido de un determinante de direccionamiento vacuolar de aleuraina, una tiol proteasa vacuolar vegetal.

La planta 13-652 se generó mediante cotransformación de la planta de tabaco con un vector de expresión que codificaba Coll, P4Hbeta y LH3 y un segundo vector de expresión que codificaba Col2 y P4H alfa. Cada gen está precedido de un determinante de direccionamiento vacuolar de aleuraina, una tiol proteasa vacuolar vegetal, Las secuencias de casete incluidas en los vectores se describen en el Ejemplo 1 anterior.

Ensayo de luz y oscuridad

Análisis de seis plantas homocigotas 13-6/52. Se tomaron muestras de la hoja n.º 4+5/6 diariamente a la misma hora (12:30) durante 8 días, de 3 plantas que se cultivaron en condiciones regulares (16 horas en condiciones de luz y 8 horas en la oscuridad) y de 3 plantas que se cultivaron solo en la oscuridad.

5 Extracción de proteína total y análisis de transferencia de Western

Se homogeneizaron noventa mg de hojas de tabaco mediante un molino mezclador tipo MM301 (Retsch) en un tampón de extracción (Tris HCl 100 mM a pH = 7,5, cóctel de inhibidores de proteasa disponible en Roche, número de catálogo 04-693-116-001) a 4 °C. Después de 30 min de centrifugación (20.000 x g a 4 °C), el sobrenadante se recogió. Las muestras de proteína se fraccionaron en SDS-PAGE al 8 % (Laemmli 1970) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa usando el aparato BIO-RAD™ Protein TRANS-BLOT™. La membrana se bloqueó durante 30 min a temperatura ambiente en leche desnatada al 3 % (g/v) (Difco) y a continuación se hizo reaccionar con anticuerpos policlonales anti colágeno humano de tipo I de conejo comerciales (Chemicon), durante una noche a temperatura ambiente. La membrana se aclaró con agua 3-5 veces y a continuación se lavó durante 30 min en TBS. Después de la incubación con un anticuerpo secundario [anticuerpo anti IgG de conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (Chemicon)] durante 2 horas a temperatura ambiente, la membrana se aclaró con agua 3-5 veces y se lavó durante 30 min en TBS. La inmunodetección se efectuó con cloruro azul de nitrotetrazolio (NBT, Sigma) y sal p-toluidina de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP, Sigma), a temperatura ambiente durante 2 horas durante una noche.

20 Resultados

Como se muestra en la figura 9, las plantas de tabaco transgénicas para el colágeno con direccionamiento vacuolar expresan Pro-alfa-1 y Pro-alfa-2 (carril 1). El colágeno de plantas con direccionamiento vacuolar cultivadas en la oscuridad exhibió una estabilidad similar (carril 2), lo que confirma la estabilidad excepcional del colágeno generado de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención

Ejemplos 7-13.

30 Materiales y métodos generales

Extracción de colágeno y reacción enzimática: En una licuadora, se mezclaron 300 g de hojas de tabaco en un tampón de extracción enfriado (600 ml de Tris-HCl 100 mM a pH 7,5 que contenía 360 mg de metabisulfito de potasio, 530 mg de L-cisteína y 1 g de EDTA) complementado con 5 g de PVPP y 2 g de carbón activado (véase también la Pat. de EE. UU. 8.759.487). La mezcla se realizó 5 veces durante intervalos de 1 minuto para mantener las temperaturas por debajo de 15 °C. El extracto en bruto se filtró a través de una gasa y se centrifugó durante 30 min, a 25.000 g, 5 °C. El sobrenadante se recogió; se añadió CaCl₂ hasta una concentración final de 10 mM. El sobrenadante se dividió en muestras de 10 ml. A cada muestra de 10 ml se le añadió la enzima deseada, de acuerdo con las condiciones expuestas en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3.

Condiciones de reacción de la digestión de procolágeno				
N.º de muestra	Proteasa:	Concentración de proteasa (mg/litro):	Tiempo de incubación (horas):	Temperatura de incubación (grados Celsius):
1	Enzima deseada	1	3	15
2	Enzima deseada	5	3	15
3	Enzima deseada	25	3	15
4	Enzima deseada	1	6	15
5	Enzima deseada	5	6	15
6	Enzima deseada	25		15
*	Control-sin proteasa	0	3	15
*	Control-sin proteasa	0	6	15

Descripción de la enzima: La ficina de látex de higuera (Sigma, n.º de catálogo F4125), subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Sigma, n.º de catálogo P5459-5 g), bromelaína de tallo de piña (Sigma, n.º de catálogo B4882-10 g), papaína de *Carica papaya* (Fluka, n.º de catálogo 76220-25 g), savinasa 6.0 t tipo W de la bacteria alcalófila *Bacillus lentus* (Novozymes, n.º de catálogo PX92500501), neutrasa 1.5 MG de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* (Novozymes, n.º de catálogo PW201041), protamex, un complejo de proteinasa de *Bacillus* comercial (Novozymes, n.º de catálogo PW2A1021), alcalasa 3.0 T, proteinasa alcalina de *Bacillus subtilis* (Novozymes, n.º de catálogo PJ90000901), esperasa 6.0 T, bacteria alcalófila *Bacillus lentus* (Novozymes, n.º de catálogo PE90110401), alcalasa 2.4 L FG, proteinasa alcalina de *Bacillus subtilis* (Novozymes, n.º de catálogo PLN05330), esperase 8.0 L, bacteria alcalófila *Bacillus lentus* (Novozymes, n.º de catálogo PE00077) se donaron en su totalidad por Novozymes.

La tripsina, tripsina pancreática tipo 6.0 S sin sal, de páncreas animal (Novozymes, n.º de catálogo P245-D20). TRYPZEAN™, una tripsina recombinante expresada en maíz, se adquirió en Sigma Chemical Co. (n.º de catálogo: T3449).

- 5 Determinación de la concentración de atelocolágeno: La concentración de atelocolágeno generado de acuerdo con los Ejemplos 9-10 se ensayó mediante dos métodos de la siguiente manera:
 Ensayo SIRCOL™: El kit de ensayo de colágeno SIRCOL™ se adquirió en Biocolor Ltd. (n.º de cat. 85000). Este ensayo se basa en la interacción del colorante Sirius Red con la triple hélice de colágeno. El análisis se realizó de acuerdo con el manual de instrucciones del proveedor, 4.ª edición, 2002. Se usó un estándar de colágeno bovino para preparar una curva de calibración (de 0 a 50 µg de colágeno). Se colocaron tres muestras de 10-50 µl de la solución de colágeno en HCl 10 mM en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se llevó el volumen a 100 µl con ácido acético 0,5 M. Se añadió 1 ml de reactivo de colorante SIRCOL™ a cada tubo y los tubos se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, el sobrenadante se aspiró y los tubos se invirtieron sobre un papel absorbente para eliminar el sobrenadante restante. Se usaron bastoncillos de algodón para eliminar las gotas que pudieran quedar en las paredes de los tubos. Se añadió 1 ml de reactivo alcalino a cada tubo, se mezcló bien y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. La absorción a 540 nm se midió usando un espectrofotómetro y la concentración de colágeno se calculó frente a la curva de calibración, usando HCl 10 mM como muestra en blanco.
- 10
- 15
- 20 Ensayo SDS-PAGE Instant Blue: Las muestras se hirvieron durante 5 min en tampón SAB (condiciones reductoras) y se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 min, antes de cargarlas en una SDS-PAGE, acrilamida al 8 %. El gel se analizó en una unidad Mini Protean 3 (BioRad n.º 165-3301, 165-3302). Se aplicó el reactivo Instant Blue (Novex n.º ISB01L) al gel hasta que la proteína se visualizó como bandas de color azul en el gel. El gel se aclaró con agua y se secó. La concentración de las bandas de colágeno se calculó por densitometría, contra un estándar humano cargado en el mismo gel.
- 25
- 30 Análisis de Coomassie: Las muestras de colágeno (en HCl 10 mM) se valoraron a pH 7,5 usando Tris 1 M. Se añadió un tampón de aplicación de muestra que contenía beta-mercaptoetanol al 10 % y SDS al 8 % diluyéndolo cuatro veces en los 30 µl de muestras valoradas en pH. Las muestras se hirvieron durante 7 minutos. Se cargaron 30 µl del sobrenadante en un gel de poliacrilamida al 10 % y se separaron durante 2 horas a 100 voltios. El gel se transfirió a una solución a base de Coomassie durante 1 hora con agitación. El colorante Coomassie se eliminó usando una solución decolorante estándar.
- 35
- 40 Análisis por SDS-PAGE y transferencia de Western de cadenas alfa-1 y alfa-2 de colágeno: Las muestras se hirvieron durante 7 minutos en un tampón de aplicación de muestra reductor (beta-mercaptoetanol al 2,5 % y SDS al 2 %) y a continuación se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 rpm. Se separaron 30 µl del sobrenadante en un gel de poliacrilamida al 10 %. Después de la separación, se emplearon protocolos de transferencia de Western estándar para transferir las muestras a membranas de nitrocelulosa. Después de la transferencia, las membranas se incubaron con anticuerpo anti colágeno I (Chemicon Inc., n.º de catálogo AB745) para la inmunodetección de las cadenas alfa-1 y alfa-2 de colágeno. Los marcadores de peso molecular se adquirieron en Fermentas Inc. (n.º de catálogo SM0671).
- 45
- 50 Controles: Se empleó un control positivo de colágeno de piel humana tipo I adquirido en Calbiochem (n.º 234138) como marcador para los análisis de transferencia de Western. La muestra de control de molienda refleja los sedimentos derivados de las hojas de tabaco inmediatamente antes de la resuspensión en el tampón de extracción. Las muestras de control "D" reflejan los mismos sedimentos después de la resuspensión en el tampón de extracción. Las muestras de control "K" incluyen procolágeno digerido con ficina en HCl 10 mM. Para controlar la actividad de proteasa independiente de ficina de fondo, siempre se prepararon muestras de escisión sin ficina en paralelo a todas las pruebas de digestión con ficina.
- 55
- 60 Purificación de colágeno de plantas transgénicas: La digestión de los propéptidos en el extracto que contenía colágeno se inició mediante la adición de 30 mg/l de tripsina o 5 mg/l (50 µl/l) de subtilisina (Sigma n.º P5459) o 5 mg/l de ficina (Sigma n.º F4125). La proteólisis se realizó a 15 °C durante 4 horas. La eliminación de contaminantes no solubles se realizó mediante centrifugación durante 30 min, a 22.000 g, 15 °C. El sobrenadante se recuperó y el colágeno se precipitó añadiendo lentamente NaCl cristalino hasta una concentración final de 3,13 M con agitación constante durante 20 min a TA. La solución se incubó en una sala fría durante una noche sin agitación. La recogida del colágeno se efectuó mediante centrifugación a 25.000 g, durante 2 horas a 5 °C.
- 65
- El sobrenadante se vertió cuidadosamente a través de cuatro capas de gasa. Los sedimentos se suspendieron de nuevo en 200 ml de ácido acético 250 mM y NaCl 2 M durante 5 minutos usando un agitador magnético. La suspensión se centrifugó a 25.000 g, durante 40 min a 5 °C. Las trazas de sobrenadante se eliminaron de los viales de vidrio. Los sedimentos se disolvieron de nuevo en 200 ml de ácido acético 0,5 M a temperatura ambiente durante 1 hora. La eliminación de la materia no soluble se realizó mediante centrifugación a 16.000 g, 30 min, 15 °C. El sobrenadante se vertió a través de 12 capas de gasa. El colágeno se precipitó añadiendo lentamente NaCl a una concentración final de 3 M con agitación constante durante 20 min a TA. La solución se incubó a 4 °C durante 8 horas hasta durante una noche. La recogida de colágeno se realizó por centrifugación a 25.000 g, durante 2 horas a 5 °C. Después de la aspiración del sobrenadante, el sedimento se disolvió de nuevo en 200 ml de ácido acético 0,5 M usando un agitador

magnético a TA durante 1 hora. La eliminación de la materia no soluble se realizó mediante centrifugación a 16.000 g, 30 min, 15 °C. El sobrenadante se vertió a través de 12 capas de gasa. El colágeno se precipitó añadiendo lentamente NaCl a una concentración final de 3 M con agitación constante durante 20 min a TA. La solución se incubó a 4 °C durante 8 horas. El colágeno se recogió por centrifugación a 2.000 g, durante 2 horas a 5 °C. El sobrenadante se aspiró. El sedimento se disolvió de nuevo en 40 ml de HCl 10 mM mediante pipeta y con agitación vorticial durante 5 min a TA. La solución se transfirió a una bolsa de diálisis (MWCO 14.000 Da) y se dializó durante 4 horas frente a 4 l de HCl 10 mM a 4 °C. Esta diálisis se repitió durante una noche.

La esterilización del colágeno se realizó filtrando la solución primero a través de un filtro de 0,45 µm, a continuación, a través de un filtro de 0,2 µm usando una jeringa de 30 ml. El colágeno se concentró aún más mediante ultrafiltración usando un tubo de filtración Vivaspín PES de 20 ml (Vivascience, n.º VS2041, MWCO 100.000). La centrifugación se realizó durante 45 min a 5000 g a 5 °C hasta que el volumen se redujo a 0,75 ml.

Optimización de la cinética de digestión y condiciones de escisión de procolágeno por ficina de calidad alimentaria: Los sedimentos (recogidos como se describe en el Ejemplo 10), hasta la saturación en sulfato de amonio (AMS) al 25 %) se suspendieron de nuevo en un tampón (Tampón A: metadisulfato de potasio 4,5 mM, L-cisteína 12,5 mM, EDTA 7,5 mM disuelto en tampón fosfato de sodio 0,1 M, valorado a pH 7,5 con NaOH 10 M o HCl 6 N) en una relación de 4,36 g de sedimento:200 ml de tampón enfriado con hielo. A continuación, las muestras se agitaron durante 20 min a 15 °C. A continuación, se prepararon alícuotas de 10 ml por tubo de ensayo de 15 ml, seguido de la administración de concentraciones crecientes (5-15 mg/l) de ficina (látex de higuera, ficina de calidad alimentaria de Biochem Europe). Las muestras se incubaron a 15 °C durante 1-3 horas, se separaron mediante SDS-PAGE y a continuación se analizaron mediante transferencia de Western para determinar la presencia de colágeno que migraba a pesos moleculares más bajos que el procolágeno.

Los sedimentos procedentes de hojas de tabaco resuspendidos en tampón fosfato A (27,2 g:800 ml de tampón) de valores de pH variables (5,5, 7,5 u 8,5) se trataron con 10 mg/l de ficina en presencia de NaCl 0-3 M durante 1 h a 15 °C. La reacción se finalizó centrifugando muestras de 1 ml de cada mezcla de reacción (10 min, 15000 g, 4 °C). Los sedimentos se suspendieron de nuevo en 1 ml de tampón A (pH 7,5), se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante transferencia de Western

Optimización de la cinética de digestión y condiciones de escisión de procolágeno por ficina de calidad farmacéutica: Los sedimentos de hojas de tabaco se suspendieron de nuevo en un tampón de extracción que contenía ficina de calidad farmacéutica (Biochem-Europe Pharm grade) (10 mg/l) de valores de pH variables (7,5, 8,5, 9,5) junto con concentraciones crecientes de NaCl (0-3 M) durante 5-45 minutos. Experimentos posteriores estudiaron la necesidad y las condiciones y concentraciones óptimas de EDTA y L-cisteína como aditivos para el tampón de extracción. Las muestras se incubaron en la mezcla de digestión en presencia de EDTA 0-100 mM con L-cisteína 0-80 mM durante 1-3 h a 15 °C, a pH 7,5 y sin NaCl

Fibrillogénesis: La fibrillogénesis se considera una prueba de funcionalidad del colágeno. Por lo tanto, la capacidad del colágeno purificado digerido con ficina para formar fibrillas es una propiedad esencial del producto obtenido. Método de prueba: El pH de la solución que contenía colágeno (muestras duplicadas) se neutralizó a pH 6,7 con fosfato de sodio, a pH 11,2, y a continuación se incubó a 27 ± 2 µC durante 6 horas. Las muestras se centrifugaron para sedimentar el hidrogel que se formó. La concentración de proteínas de las muestras previas y posteriores a la neutralización (sobrenadante) se determinó mediante el método de Lowry. Se empleó PURECOL™ (adquirido en NUTACON, N.º de cat. 5409) como control positivo y gelatina como control negativo.

Ejemplo 7. Extracción y purificación de colágeno de plantas transgénicas en presencia de tripsina y pepsina.

La producción de colágeno humano en plantas se inició con el fin de evitar el uso de colágeno de fuentes mamíferas, ya que el uso de proteínas mamíferas en cosméticos humanos o aplicaciones médicas puede ser arriesgado para la salud humana, ya que la proximidad evolutiva es relativamente cercana. La enfermedad conocida como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) es un ejemplo de una enfermedad que es causada por el consumo de proteínas mamíferas infectadas por los seres humanos.

Inicialmente, la purificación de colágeno de plantas transgénicas se realizó usando tripsina pancreática bovina y la proteasa digestiva pepsina, ambas de las cuales catalizan la hidrólisis de proteínas en el sistema digestivo animal. Los siguientes ejemplos ilustran la identificación de una proteasa de una fuente no animal adecuada para su uso en el proceso de purificación de colágeno.

Resultados

La digestión de propéptidos durante la purificación de colágeno se realizó primero mediante la enzima pancreática tripsina. La tripsina, a razón de 300 mg/l, digirió los propéptidos de colágeno, sin embargo, el rendimiento de colágeno fue muy bajo al final del proceso de purificación (figura 10). Cuando la concentración de tripsina se redujo a 20 mg/l o 30 mg/l, el rendimiento fue mayor, sin embargo, la digestión del procolágeno fue solo parcial e inconsistente entre muestras idénticas (figura 11).

En un intento de superar este problema, se intentó variar las temperaturas y los tiempos de incubación; sin embargo, los resultados no condujeron a un cambio en el rendimiento (datos no mostrados). La adición de la enzima pepsina más tarde en el proceso de purificación resolvió el problema de digestión parcial (figura 12) y produjo colágeno alfa-1 y alfa-2 que migraron conjuntamente con muestras de control de colágeno procedente de cerdo.

Ejemplo 8. Extracción de colágeno y su digestión inducida enzimáticamente.

Sin embargo, la solución de tripsina-pepsina no fue óptima ya que requirió dos enzimas diferentes, alargando el proceso de purificación. Además, ambas enzimas son de origen animal. Para superar estos problemas, se realizó un cribado de diferentes enzimas proteasas de origen no animal. Se obtuvieron patrones de digestión variables mediante las diferentes enzimas cribadas. Se observó muy poca o ninguna digestión de los propéptidos a partir de la incubación de colágeno con las enzimas savinasa (figura 15) y esperasa (figura 17). La incubación con papaína (figura 14), bromelaína (figura 13), alcalasa 2.4 L y esperasa 8.0 L (figura 18), condujo a una sobredigestión o subdigestión de los propéptidos. Las enzimas alcalasa y protamex (figura 16) condujeron al patrón y nivel de digestión deseados (25 mg/l, 6 h), con cadenas alfa 1 y alfa 2 que migraron de manera similar a la muestra de colágeno procedente de cerdo. Sin embargo, no todas las moléculas se digirieron completamente y pueden requerir períodos de incubación más largos. Se obtuvieron resultados óptimos con la incubación de procolágeno con ficina (5 mg/l y 25 mg/l) (figura 15) donde las bandas de cadenas alfa 1 y alfa 2 migraron conjuntamente con la muestra de control de colágeno procedente de cerdo, sin sobredigestión aparente. Se demostraron resultados similares con 5 mg/l de subtilisina durante 3 h (figura 13) y 25 mg/l de neutrasa durante 6 h (figura 17).

Ejemplo 9. Extracción y purificación de colágeno de plantas transgénicas después de la digestión con subtilisina o ficina.

Se realizaron purificaciones de colágeno a partir de 450 g de hojas de plantas transgénicas (13-361 o 13-6-52) seguidas de digestión de procolágeno con ficina (figura 19) o subtilisina (figura 20). Se analizaron muestras de colágeno en las diversas etapas del proceso de purificación mediante análisis de Western. La digestión de propéptidos con ficina y subtilisina condujo al grado deseado de procesamiento de colágeno 1 y colágeno 2. Se observaron bandas de menor peso molecular en las transferencias de Western durante todo el proceso de purificación, sin embargo, estas bandas aparecieron en los extractos de plantas antes de la incubación con la enzima (carriles 3-4) y también en la muestra de control de colágeno procedente de cerdo (control positivo) (figura 19).

Ejemplo 10. Extracción y purificación a mayor escala de colágeno de plantas transgénicas después de la digestión con FICINA.

Se molieron 1 kg de hojas de tabaco transgénico con un tampón de extracción de 2 l enfriado previamente (tampón fosfato de sodio 100 mM a pH 7,5, metadisulfito de potasio 4,5 mM, L-cisteína 12,23 mM y EDTA 7,5 mM) en un reactor de 4 l (modelo ESCO EL-3) durante 20 minutos (5 °C, velocidad del raspador al 50 % y paleta del homogeneizador al 100 % de rpm). Se añadieron 6,68 g de carbón y 16,67 g de PVPP al extracto y se agitaron continuamente durante 20 minutos (5 °C y velocidad del raspador al 50 %). El extracto se centrifugó (11.000 rpm, 5 °C, 0,5 H) y el sobrenadante se saturó con sulfato de amonio al 15 % (1 hora de agitación, 5 °C). Después de 6880 rpm, 5 °C, 30 min, el sobrenadante se saturó con sulfato de amonio al 25 % y se agitó durante 1 hora (5 °C). Después de la recentrifugación, el sedimento (6880 rpm, 5 °C, 30 min) se suspendió de nuevo (en tampón de extracción) en el 15 % del volumen recogido después de la primera etapa de centrifugación. La eliminación de los propéptidos se permitió mediante una digestión de 3 horas, 15 °C con 5 mg/l de ficina (Biochem Europe). La muestra se centrifugó (11.000 rpm, 15 °C, 30 min) y el colágeno maduro se precipitó usando NaCl 3 M (el NaCl se añadió lentamente mientras se agitaba y se dejó durante una noche a 4 °C). Después de la precipitación (13.000 rpm, 5 °C, 2 horas), el sobrenadante se descartó y el sedimento se suspendió de nuevo en ácido acético 0,5 M. Otra ronda de precipitación salina 3 M (durante una noche) y centrifugación vino seguida de la resuspensión de los sedimentos en 40 ml de HCl 10 mM. La muestra fue transferida a una bolsa de diálisis (12-14 kDa) y se dializó frente a 4 l de HCl 10 mM, a 4 °C, durante 4 horas. La diálisis se repitió con 4 l de HCl 10 mM recién preparado, durante una noche. La solución dializada se filtró a través de una fibra de 0,45 micrómetros (lavada previamente con HCl 10 mM) y a continuación a través de un filtro de 0,25 micrómetros. Finalmente, las muestras se concentraron en un tubo de filtración Vivaspin (Vivascience) (100 kDa).

Ejemplo 11. Solubilidad del atelocolágeno producido como procolágeno humano recombinante en plantas de tabaco transgénicas.

La concentración de atelocolágeno generado de acuerdo con los Ejemplos 9-10 se ensayó mediante dos métodos como se describe a continuación en la sección de Métodos. Las concentraciones resultantes obtenidas para varias preparaciones típicas digeridas con ficina, se enumeran en la Tabla 4, a continuación en el presente documento:

Tabla 4.

Concentraciones de colágeno según lo determinado mediante los métodos de tinción Instant Blue o Sircol		
N.º de lote	mg/ml de colágeno por Instant blue	mg/ml de colágeno por Sircol™
UPEK1	15,7	93
UPEK2	5,8	4,78
PEK052	6,8	5,5
UPEK3	3,4	3,54
UPEK4	ND	33
UPEK6-1	5,9	4,7
UPEK6-2	43	3,7

Ejemplo 12. Proteólisis dependiente de ficina de procolágeno procedente de hojas de tabaco.

- 5 Cinética de digestión de procolágeno con ficina de calidad alimentaria: Para calibrar las concentraciones de ficina apropiadas y los tiempos de incubación que permitan los mayores rendimientos de colágeno, se incubaron sedimentos de hojas de tabaco que expresaban procolágeno con concentraciones crecientes de ficina de calidad alimentaria (5-15 mg/l) a 15 °C durante 1-3 horas. A continuación, las muestras se analizaron mediante inmunodetección de cadenas alfa-1 y alfa-2 de colágeno en transferencias de Western. El aumento de las concentraciones de ficina ofreció una mejora en el rendimiento de la cadena de colágeno después de un período de incubación de 1 hora (figura 22, carril 5 frente a 6). Sin embargo, tras la prolongación del tiempo de reacción, el aumento de las concentraciones de ficina provocó una sobredigestión de colágeno (figura 22, carril 11 frente a 12-14 y carril 17 frente a 18-20). Por lo tanto, las condiciones óptimas para la digestión del procolágeno en colágeno se establecieron con la adición de 10 mg/l de ficina de calidad alimentaria durante 1 hora a 15 °C.
- 10
- 15 Cinética de digestión de procolágeno con ficina de calidad farmacéutica: Se realizaron experimentos similares en sedimentos de hojas de tabaco que expresaban procolágeno para determinar las condiciones adecuadas para la digestión del procolágeno con ficina de calidad farmacéutica. Los sedimentos se suspendieron de nuevo y se incubaron con concentraciones crecientes de ficina de calidad farmacéutica (2,5-10 mg/l), a 15 °C durante 0,5-3 horas. La eficiencia de la digestión se determinó mediante inmunodetección de cadenas de colágeno en transferencias Western. Como se muestra en las figuras 23A-C, el aumento de las concentraciones de ficina condujo a un aumento de la producción de colágeno y a una disminución de los niveles de procolágeno. La digestión más eficaz del procolágeno con ficina de calidad farmacéutica se observó a 10 mg/l, después de un tiempo de reacción de 1 hora.
- 20
- 25 Optimización de los valores de pH y las concentraciones de sal para la escisión de procolágeno dependiente de ficina: A continuación, se evaluó la contribución tanto del pH del tampón de digestión como de las concentraciones de sal. Se suspendieron de nuevo sedimentos de hojas de tabaco similares posteriores a AMS en un tampón de extracción valorado a pH 5,5, 7,5, 8,5 o 9,5 con un contenido de sal que variaba entre 0,5-3 M de NaCl. A continuación, las muestras se incubaron con 10 mg/l de ficina de calidad farmacéutica a 15 °C durante 1 hora antes del inmunoanálisis en transferencias de Western. Las condiciones de ensayo ácidas (pH 5,5) condujeron a un rendimiento de colágeno insuficiente (figura 24A, carriles 2-6), mientras que los aumentos en los valores de pH demostraron un aumento correlativo en el contenido de colágeno dependiente de ficina, con valores máximos observados a pH 8,5 en presencia de NaCl 2 M (figura 24B, carril 10). Estos resultados se vieron respaldados además en un experimento de extracción y purificación a mayor escala realizado en dos sedimentos de 15 kg agrupados para la digestión de procolágeno inducida por ficina. Aparte del aumento del rendimiento de la cadena de colágeno observado mediante inmunotransferencia, las muestras digeridas en un tampón de pH 8,5 en presencia de NaCl 2 M fibrilaron con la misma eficacia que las digeridas en el tampón A (pH 7,5, NaCl 0 mM) (véase la Tabla 5, a continuación en el presente documento, lotes YC1 e YC2). Por lo tanto, tanto el pH más alto como las concentraciones de sal proporcionan un mejor rendimiento de colágeno tras la digestión de procolágeno inducida por ficina.
- 30
- 35
- 40 Determinación de la vitalidad de EDTA y L-cisteína en la mezcla de reacción de digestión: Tanto EDTA como L-cisteína son aditivos presentes en el tampón de extracción en las primeras etapas del proceso de purificación de colágeno. En el presente documento, se determinó la esencialidad de estos dos componentes para la escisión eficaz del colágeno dependiente de ficina. Los sedimentos de procolágeno posteriores a AMS se suspendieron de nuevo en un tampón de extracción que contenía concentraciones crecientes de EDTA (8-80 mM) y L-cisteína (10-100 mM), y se incubaron con ficina (10 mg/l) a 15 °C durante 1 hora, a pH 7,5. Se observó un efecto de mejora pronunciado en la eficiencia de la digestión en presencia de L-cisteína 10 mM (figura 25, carriles 7-10), sin contribución aparente del EDTA a la producción de colágeno dependiente de ficina (figura 25, carriles 7 frente a 8-10).
- 45
- 50 Optimización de las condiciones de temperatura para la digestión de procolágeno inducida por ficina: Los sedimentos de hojas de tabaco que expresaban procolágeno se incubaron con ficina durante 1,5 horas a 15 °C y a continuación se transfirieron a un baño a 30 °C durante 1,5 horas más. Los ensayos de transferencia de Western y fibrillogénesis

no identificaron ninguna mejora en el rendimiento de colágeno o la pureza de la muestra relacionada con el aumento de las temperaturas de reacción.

Fibrillogénesis de colágeno extraído de la escisión inducida por ficina de procolágeno: Tras la digestión inducida por ficina, se realizaron ensayos de fibrillogénesis para determinar la capacidad del colágeno resultante para formar fibrillas, el método definitivo para determinar la funcionalidad del colágeno. La Tabla 5, a continuación, resume los resultados de fibrillogénesis determinados después de la escisión de procolágeno con ficina usando dos variantes de protocolo. Tanto el protocolo A como el protocolo B, que difieren en el pH del tampón de reacción y el contenido de sal, produjeron un porcentaje significativo de fibrillas de colágeno. Por lo tanto, los parámetros de reacción de proteólisis desarrollados y optimizados en el presente documento conducen a un colágeno funcional con altos rendimientos.

Tabla 5.

Porcentaje de fibrillogénesis observado en el colágeno obtenido mediante digestión en condiciones variables		
N.º de lote	Condiciones de digestión:	% de fibrillogénesis
C39	Protocolo A: 10 mg/l de ficina, 1 h, pH 7,5	94,1
P100	Protocolo B: 10 mg/l de ficina, pH 8,5, NaCl 2 M, 1 h	87,2
P101	Protocolo A	73,1
YC1	Protocolo A	95,4
YC2	Protocolo B	98,4
YC3	Protocolo A	96
YC4	Protocolo A	93,1
YC5	Protocolo A	93,2
YC7-8	Protocolo B	94,2

Ejemplo 13. Determinación de la eficacia de la proteasa TRYPZEAN™ en la escisión de procolágeno.

Los sedimentos de hojas de tabaco que expresaban procolágeno resuspendidos en tampón de extracción (pH 7,5) enriquecidos con EDTA (7,5 mM) y L-cisteína (12,5 mM), se incubaron con TRYPZEAN™ (30-100 mg/l) durante 1-3 horas a 15 °C. En 1 hora, dosis de 60 y 100 mg/l de TRYPZEAN™ escindieron eficazmente el procolágeno para producir dos cadenas de colágeno alfa distintas, sin sobredigestión detectable (figura 26). Por lo tanto, el tratamiento de procolágeno con TRYPZEAN™ a pH 7,5 condujo a su digestión eficaz para obtener las cadenas de colágeno alfa-1 y alfa-2.

Análisis

Los Ejemplos 7-13 anteriores describen la identificación de una proteasa no mamífera adecuada para su uso en el proceso de purificación de colágeno de origen vegetal. Se examinaron las proteasas de fuentes bacterianas y vegetales y se encontraron tres enzimas adecuadas para la digestión de los propéptidos de colágeno, en concreto, neutrasa, subtilisina, TRYPZEAN™ y ficina.

La neutrasa y la subtilisina son secretadas por la bacteria *Bacillus* sp. La subtilisina se usa principalmente (>90 %) en detergentes y productos de limpieza del hogar. Aproximadamente el 10 % del uso de la subtilisina se destina a aplicaciones técnicas tales como la hidrólisis de proteínas, el tratamiento del cuero y en las industrias textil y cosmética. El uso estándar de la subtilisina en el proceso de purificación de colágeno a una concentración más alta es problemático debido a la sobredigestión del colágeno. La neutrasa se usa principalmente en la industria de las bebidas alcohólicas y en la maduración del queso. En los Ejemplos 7-13, descritos anteriormente en el presente documento, la neutrasa solo fue eficaz para digerir los propéptidos a altas concentraciones y se requirieron al menos 6 horas para obtener los resultados de digestión deseados.

En las condiciones experimentales descritas actualmente, se encontró que la tripsina y la ficina recombinantes eran las más adecuadas entre las cuatro, ya que no hubo sobredigestión de colágeno a concentraciones altas de enzima ni después de períodos de incubación prolongados. Además, estas enzimas aparentemente no digirieron la región helicoidal del colágeno, como se determinó mediante análisis SDS PAGE. La ficina, que es una enzima natural extraída de la planta del látex de la higuera (*Ficus carica*), está disponible comercialmente en varias calidades, incluyendo una calidad farmacéutica de varias fuentes a bajo coste. Se usa en las industrias alimentarias, industrias de alcohol y cerveza, hidrolización de proteínas, procesamiento de carne, industria de panadería y en la preparación de alimentos para mascotas y alimentos saludables. También se aplica en la industria farmacéutica en limpiadores de lentes de contacto, tratamiento del cáncer, tratamientos contra la artritis y auxiliares digestivos, así como en las industrias

cosmética y textil.

Ejemplo 14. Análisis adicional de las propiedades del rhColágeno.

5 *Materiales y métodos*

Materiales

El colágeno humano recombinante (rhColágeno) de tipo I expresado y aislado de plantas de tabaco transgénicas se produjo y se suministró por CollPlant Ltd (Israel). El colágeno bovino de tipo I (PureCol) se adquirió en Advanced Biomatrix, EE. UU. Se adquirieron anhídrido metacrílico, metacrilato de glicidilo, trietilamina, bromuro de tetrabutilamonio, ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS), 2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (Irgacure 2959), fosfato de sodio monobásico anhidro, HCl 1 N HCl $\geq 37\%$, bicarbonato de sodio y NaOH en Sigma Aldrich Ltd., Israel. La solución salina tamponada con fosfato (PBS), PBS x10, el suero fetal bovino (FBS), el DMEM con alto contenido de glucosa y la penicilina/estreptomicina se adquirieron en Biological Industries Ltd, Israel. El fosfato de sodio dibásico anhidro se adquirió en Cantón, India. El etanol absoluto y la acetona se adquirieron en Bio-Lab Ltd., Israel. El ácido hialurónico se adquirió en Lifecore, EE. UU.

Tampones y preparación de solución madre de fotoiniciador

Tampón de fibrillogénesis (FB): Se disolvió fosfato de sodio dibásico en agua bidestilada (ABD) hasta una concentración final de 162 mM. La solución se valoró a pH 11,2 con NaOH 10 N.

Preparación del medio: Se añadieron 50 ml de suero fetal bovino y 5 ml de penicilina/estreptomicina (10.000 unidades/ml y 10 mg/ml, respectivamente) en condiciones asépticas a 500 ml de medio DMEM con alto contenido de glucosa. El medio se mezcló suavemente y se mantuvo en el frigorífico.

Preparación de solución salina tampón de fosfato: Se mezclaron 39 ml de solución monobásica de fosfato de sodio 0,1 M con 61 ml de solución dibásica de fosfato de sodio 0,1 M y el volumen final se ajustó a 200 ml con ABD. El pH final se ajustó a 7 con NaOH concentrado o HCl según fuera necesario. Se añadió NaCl hasta una concentración final de 150 mM.

Se añadió tampón de lavado HCl al tampón de fibrillogénesis para alcanzar una concentración final de fosfato de sodio dibásico 16,2 mM y HCl 10 mM. El pH se ajustó a 7,2-7,4 con NaOH 10 N.

Solución madre de fotoiniciador al 10 % (v/v): Irgacure 2959 se disolvió en una solución 1:1 de etanol absoluto/PBS hasta una concentración final de 100 mg/ml.

Metacrilato de rhColágeno

Se prepararon rhColágeno fibrilar-metacrilamida y rhColágeno monomérico-metacrilamida mediante la reacción de residuos de colágeno de lisina e hidroxilisina con anhídrido metacrílico en un medio acuoso como se describe a continuación y se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz hasta su uso posterior.

rhColágeno fibrilar-metacrilamida

Se sintetizaron de 3 a 10 mg/ml de *rhColágeno fibrilar-metacrilamida* en tampón de lavado, tampón de fibrillogénesis o ABD, a temperatura ambiente (T.A.) o a 12 °C. Por ejemplo, en resumen, el colágeno fibrilar-MA se sintetizó en ABD de la siguiente manera: Una solución de 3-4 mg/ml de rhColágeno monomérico en HCl 10 mM, (COLLAGE™) se mezcló con un tampón de fibrillogénesis en una relación de 9:1 v/v y se agitó durante 1 h a T.A., obteniéndose fibrillas. La solución se centrifugó a 7500 rpm a 4 °C durante 30 minutos, descartando el sobrenadante. El sedimento se suspendió de nuevo en un volumen igual de tampón de lavado y se centrifugó en las mismas condiciones. Después de esto, las fibrillas del sedimento se suspendieron de nuevo en ABD a razón de 10 mg/ml. La concentración se confirmó mediante mediciones del porcentaje de sólidos. Se añadió gota a gota anhídrido metacrílico (MA) en un flujo de nitrógeno a temperatura ambiente en una relación molar de 10 a 20 con respecto a las lisinas de colágeno, y el pH de la solución de reacción se controló en el tiempo y se ajustó a pH 7 con NaOH 10 N. Después de 24 horas de reacción, la mezcla se dializó frente a un tampón de lavado (pH 7) usando un tubo de diálisis de corte de 10 kDa (Spectrum Laboratories Inc, CA, EE. UU.) durante 3 días a 4 °C con al menos 6 cambios del dializado (tampón de lavado en este caso), para eliminar los subproductos de la reacción y, finalmente, se liofilizó durante 3-4 días.

rhColágeno monomérico-metacrilamida

Se usaron tampones de MOPS 200 mM, fosfato o Tris con la adición de NaCl 150 mM. Por ejemplo, se añadieron MOPS 200 mM y NaCl 150 mM a 3-4 mg/ml de COLLAGE™ y se agitaron a temperatura ambiente hasta obtener una solución transparente. Posteriormente, se añadió gota a gota un exceso de 10 a 20 veces de anhídrido metacrílico en un flujo de nitrógeno a 12 °C, y el pH se ajustó en el tiempo a pH 7 con NaOH 10 N. Después de 24 horas de reacción,

la mezcla se dializó frente a HCl 10 mM y NaCl 20 mM (pH 2) con un tubo de diálisis de corte de 10 kDa durante 3 días a 4 °C con al menos 6 cambios del dializado, seguido de 3-4 días de liofilización.

Metacrilato de ácido hialurónico (HA)

Se funcionalizaron 500 mg de HA como se describe por Leach *et al.* [Leach *et al.* 2002, Biotechnology and Bioengineering, vol. 82, n.º 5]. Brevemente, se añadieron por separado 1,8 ml de trietilamina, 1,8 ml de metacrilato de glicidilo y 1,8 g de bromuro de tetrabutilamonio a 50 ml de una solución de HA de 10 mg/ml en ABD y se mezclaron completamente antes de añadir el siguiente componente. La reacción se mezcló durante una noche a temperatura ambiente y el HAMA se precipitó en un volumen de acetona 20 veces mayor y se disolvió de nuevo en ABD. El proceso de precipitación se repitió dos veces para eliminar todos los residuos de la reacción. Finalmente, el material se liofilizó.

Preparación de soluciones para mediciones de viscosidad

PureCol y Collage™ en PBS: Se neutralizaron 8 ml de soluciones de colágeno monomérico (3 mg/ml en HCl 10 mM), ya sea rhColágeno (COLLAGE™) o colágeno bovino (PureColl) añadiendo 1 ml de PBS x10. A continuación, la solución se llevó a un pH de 7-7,5 mediante valoración con NaOH 0,1 N. Finalmente, se añadió agua bidestilada para alcanzar un volumen final de 10 ml. Las muestras se incubaron a 37 °C durante al menos 90 min antes de realizar las mediciones (ya sea a 37 °C o a 4 °C).

COLLAGE™ en tampón de fibrillogénesis: Se neutralizaron 9 ml de una solución de rhColágeno monomérico (COLLAGE™) (3,79 mg/ml en HCl 10 mM) añadiendo 1 ml de tampón de fibrillogénesis. Las muestras se incubaron a 37 °C durante al menos 90 min antes de realizar las mediciones (ya sea a 37 °C o a 4 °C).

rhColágeno fibrilar-metacrilamida en PBS: Se disolvieron rhColágeno fibrilar liofilizado-MA preparado en ABD y dializado frente a tampón de lavado (de acuerdo con lo descrito anteriormente con un exceso de 10 veces de MA) en PBS a una concentración de 10 mg/ml. Las muestras se incubaron a 37 °C durante al menos 90 min antes de realizar las mediciones (ya sea a 37 °C o a 4 °C).

rhColágeno-metacrilamida en DMEM: Se disolvió rhColágeno fibrilar liofilizado-metacrilamida (15 veces el exceso de MA, preparado y dializado en tampón de lavado, de acuerdo con la descripción anterior) en medio DMEM hasta concentraciones finales de 20 y 26 mg/ml.

rhColágeno-metacrilamida/ácido hialurónico en DMEM: Se añadió ácido hialurónico a una solución de rhColágeno fibrilar-MA para obtener concentraciones finales de 10 mg/ml de HA y 20 mg/ml de rhColágeno-MA en medio DMEM.

rhColágeno-metacrilamida/metacrilato de ácido hialurónico (HA-MA) en DMEM: Se añadió metacrilato de ácido hialurónico (véase anteriormente) a una solución de rhColágeno fibrilar-MA para obtener concentraciones finales de 10 mg/ml de HA-MA y 20 mg/ml de rhColágeno-MA en medio DMEM.

Fotoreticulación de rhColágeno-MA para mediciones de módulos de pérdida y almacenamiento

Se formaron armazones reticulados de rhColágeno-MA en dos preparaciones diferentes, con el objetivo de examinarlos en dos experimentos individuales. En la primera preparación, se disolvió rhColágeno fibrilar-MA al 1-2 % en peso sintetizado con un exceso de 10 veces del reactivo metacrílico en PBS 0,1 M a T.A., a continuación se añadió Irgacure 2959 al 0,1 % y se inyectó un volumen final de 1 ml de soluciones en un molde discoide. Posteriormente, se realizó el proceso de curado desde una distancia de 1,5 cm durante 7 y 10 segundos a una intensidad promedio de 670 mW/cm² usando una fuente de luz de mercurio, terminando en armazones reticulados. La segunda preparación incluyó 2 lotes diferentes de rhColágeno fibrilar-MA, sintetizado con un exceso de 15 y 20 veces del reactivo metacrílico. Se disolvió el 1-2 % en peso en PBS 0,1 M y se añadió Irgacure 2959 al 0,1 % para lograr un volumen final de 1,5 ml. Para obtener armazones altamente reticulados, se realizó un proceso de curado desde una distancia de 2 cm durante 60 segundos a una intensidad promedio de 420 mW/cm².

Ensayo TNBS

El protocolo de ensayo fue similar al informado por Sashidhar *et al.* [Sashidhar R.B., Capoor, A.K., Ramana, D, Journal of Immunological Methods. 1994, 167, 121-127], y basado en Habeeb [Habeeb A.F.S.A, Analytical Biochemistry. 1966, 14, 328-336]. Brevemente, se añadieron 0,4 ml de TNBS al 0,01 % (v/v) recién preparado a 0,4 ml de rhColágeno fibrilar-MA a razón de 0,1-2 mg/ml en bicarbonato de sodio al 4 %. Después de 2 horas de reacción a 40 °C, se añadieron 0,2 ml de HCl 1 N y 0,4 ml de SDS al 10 % (v/v). La absorbancia se midió a 335 nm en un espectrofotómetro en una cubeta de poliestireno de 1 ml. Se preparó un control (blanco) con el mismo procedimiento, excepto que se añadió un tampón de bicarbonato de sodio en lugar de la solución de rhColágeno-MA. La absorción de 1-2 mg/ml de rhColágeno fibrilar natural preparado con las mismas condiciones se registró para determinar la calibración.

Caracterización reológica

Viscosidad: Las mediciones de viscosidad se realizaron en un reómetro HAAKE RHEOSTRESS600™ (Thermo Electron Corporation) con una cámara de celdas con temperatura controlada, usando una configuración de cono-placa C60/1°Ti. La viscosidad se midió en una muestra de 1 ml en un modo de rampa rotacional, con una velocidad de corte que variaba de 0,0001 a 1000 s⁻¹ a 4 °C, 25 °C y 37 °C.

Módulos de almacenamiento y pérdida de los armazones: Se investigó el comportamiento reológico de los discos reticulados de rhColágeno usando un sistema de placas paralelas que empleaba un husillo dentado PP20 y una configuración de placas dentadas de 20 mm. Para caracterizar el rhColágeno-MA no reticulado, se usaron elementos de cono-placa C60/1°Ti. Para evaluar el comportamiento reológico del rhColágeno-MA, se realizaron dos conjuntos de experimentos individualmente. En el primero, se sometieron muestras de 1 ml a fuerzas de oscilación en modo de tensión controlada, registrándose los valores del módulo de almacenamiento G' y del módulo de pérdida G'' mientras se aplicaba una tensión de corte de 5 Pa a una frecuencia de 1 Hz y a 37 °C durante 300 segundos. La separación se ajustó al 90 % de la altura de la muestra original y los valores de G' y G'' se promediaron en el intervalo de 150-300 segundos. En el segundo experimento, se ensayaron discos reticulados de 1,5 ml en oscilaciones de barrido de frecuencia a 37 °C, donde se registró G' bajo una tensión de corte de 1 Pa en un intervalo de frecuencia de 0,01-100 Hz. Para iniciar la medición, se bajó el husillo para que entrara en contacto con la superficie del hidrogel y a continuación se bajó aún más hasta que la fuerza axial del instrumento fue igual a 0,4 N. Antes de todas las mediciones, las muestras se mantuvieron en la placa cubierta con una tapa de humedad durante 1 minuto, para alcanzar el equilibrio de temperatura.

Resultados

Ensayo TNBS

El grado de modificación del rhColágeno se cuantificó usando el ensayo colorimétrico TNBS. El ensayo cuantifica el contenido molar de grupos ε-amino libres, sin reaccionar, procedentes de la lisina y la lisina hidroxilo, y posteriormente el grado de funcionalización. El grado de funcionalización de rhColágeno fibrilar en lotes 10, 15 y 20 veces diferentes se determinó mediante el ensayo TNBS, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: El grado de funcionalización del rhColágeno fibrilar de diferentes preparaciones, según lo determinado mediante un ensayo de TNBS.

Lote de rhColágeno fibrilar-MA	Grado de metacrilación [%]
10 veces	98,1
15 veces	95,5
20 veces	92,9

Los resultados indican una alta capacidad de modificación del rhColágeno fibrilar e implican que la adición del reactivo metacrílico en una relación molar de 10 puede ser preferible para recibir la funcionalización máxima del colágeno fibrilar.

Reología

1, Viscosidad

Dependencia de la temperatura de la viscosidad del rhColágeno/colágeno bovino

La figura 27 muestra la viscosidad del rhColágeno (COLLAGE™) y el colágeno bovino (PureCol) en PBS expresada en función de la velocidad de corte a T = 4 °C (línea de color azul, discontinua y continua, respectivamente) y T = 37 °C (línea de color rojo, discontinua y continua, respectivamente). El colágeno bovino (líneas continuas) muestra una clara dependencia de la temperatura de la viscosidad a velocidad de corte cero (η_0), es decir, la meseta de viscosidad a valores bajos de velocidad de corte, que tiene a 37 °C (rojo) valores de η_0 que son más de un orden de magnitud mayores que los valores a 4 °C (azul). Por el contrario, el rhColágeno (líneas discontinuas) no muestra una diferencia significativa entre los valores de η_0 a 4 °C y 37 °C. El rhColágeno neutralizado en FB (véanse los métodos) muestra un comportamiento muy similar (figura 28), es decir, la viscosidad a 4 °C y 37 °C es casi idéntica. La figura 29 muestra la viscosidad del rhColágeno fibrilar-MA a 4 °C (línea color azul) y a 37 °C (línea de color rojo). Aunque los perfiles no son idénticos, los valores de velocidad de corte cero están a aproximadamente 1.000 cP a ambas temperaturas.

Viscosidad de rhColágeno-metacrilamida

La figura 30 muestra la viscosidad del rhColágeno-MA disuelto en DMEM a 25 °C. El comportamiento típico de adelgazamiento por cizallamiento del rhColágeno observado en las figuras 27 y 28 se mantiene también para el rhColágeno-MA con y sin la adición de HA/HA-MA. Al aumentar la concentración de rhColágeno de 20 a 26 mg/ml (línea de color verde y rojo, respectivamente), la viscosidad de corte cero aumenta, así como también mediante la

adición posterior de 10 mg/ml de HA o HAMA, lo que conduce a una concentración polimérica final de 30 mg/ml.

El experto en la técnica reconocerá que el rhColágeno-MA no está reticulado y que para lograr la reticulación, es necesario añadir un fotoiniciador y luz.

2. Módulos de pérdida y almacenamiento de los armazones

En la figura 31 se presenta el análisis reológico de discos de 1 ml en el tiempo a 37 °C realizado en el primer experimento. El gráfico superior informa los módulos de pérdida y almacenamiento y la tan (δ) antes del curado por UV, mientras que el gráfico inferior informa los valores después del curado por UV (tras la adición de fotoiniciador). Los datos demuestran que el módulo de almacenamiento del rhColágeno-MA aumenta 2 veces tras la iluminación en presencia de fotoiniciador. Además, los resultados apuntan a la capacidad de controlar las propiedades del armazón modificando la concentración de rhColágeno-MA. Las altas diferencias entre los valores de G' y G'' , y los valores de tan (δ) cercanos a cero de los discos reticulados indican su comportamiento de tipo elástico. (G' - módulos de almacenamiento; G'' - módulos de pérdida; G' , el "módulo de almacenamiento/elástico", representa la fracción de energía de G^* almacenada por el gel durante la deformación y usada para recuperar la forma original posteriormente. G' mide el comportamiento elástico de un gel o cuánto puede recuperar su forma después de la deformación por cizallamiento. Por ejemplo, el caucho vulcanizado es un material puramente elástico ya que se deforma instantáneamente bajo tensión y recupera completamente su forma después de que se elimina la tensión (es decir, $G^* \approx G'$). G'' , el "módulo de pérdida/viscoso", representa la fracción de energía de G^* perdida en la deformación por cizallamiento a través de la fricción interna. G'' no está directamente relacionado con la viscosidad porque el relleno de HA no es puramente viscoso. En su lugar, este término refleja la incapacidad del gel para recuperar su forma completamente después de que se elimina la tensión de cizallamiento).

En el segundo experimento, los discos de 1,5 ml iluminados durante 60 segundos presentan valores de G' más altos, como se muestra en la figura 32. Los datos muestran que G' aumenta con la concentración de rhColágeno-MA y el grado de metacrilación, lo que indica la capacidad de controlar las propiedades de los armazones.

Ejemplo 15. Procedimiento para obtener y procesar rhColágeno a partir de plantas de tabaco.

Se cultivan plantas de tabaco modificadas genéticamente como se ha descrito anteriormente, y las hojas se cosechan y se preparan para la extracción y purificación iniciales aguas arriba (figuras 33A-C). Como se muestra en la figura 33A, las hojas se someten a trituración mecánica (etapa A), y la pulpa se elimina de la suspensión, mientras que el resto que contiene procolágeno se conserva y se somete a digestión enzimática para convertir el procolágeno en colágeno (etapas B-C). La pulpa se descarta de nuevo, y el resto que contiene colágeno se conserva de la suspensión (etapa C). Después de una etapa de acidificación, la muestra se somete a una primera centrifugación para una primera etapa de aclarado, después del cual se descarta el sedimento (etapas D-F). Después de la precipitación con AMS y una segunda centrifugación, la proteína se precipita (sedimento H) y el sobrenadante se descarta (etapas G-H). El sedimento H se puede congelar a -20 °C para su almacenamiento.

Como se muestra en la figura 33B, el sedimento H se suspende de nuevo para producir una suspensión de proteína, seguido de una tercera centrifugación, después de la cual el sedimento se descarta (etapas I-J). Se usa un filtro de profundidad para aclarar la suspensión, que se somete a una precipitación salina con NaCl para precipitar el colágeno (etapas K-L). Una cuarta centrifugación produce un sedimento de colágeno, y el sobrenadante se descarta (etapa M).

Como se muestra en la figura 33C, el sedimento de colágeno se suspende de nuevo en HCl para producir colágeno solubilizado (etapa N). Después de una filtración de 0,2-0,8 micrómetros, la ultrafiltración (UF) (concentración y diafiltración) da como resultado colágeno concentrado a granel (etapas O-P). Después de la filtración a 0,2 micrómetros y el llenado, el colágeno purificado se almacena en su recipiente final (etapa Z).

Ejemplo 16. Viscosidad y polimerización de metacrilato de rhColágeno con aditivos.

La viscosidad de 5 mg/ml de metacrilato de rhColágeno enriquecido con diferentes aditivos (metacrilato de alcohol polivinílico (PVAMA) (figuras 34 y 37), metacrilato de ácido hialurónico (HAMA) (figuras 35 y 37) y celulosa oxidada (OC) (figuras 36 y 37) en relaciones de MA de colágeno:aditivo de 5:1, 2:1 y 1:2 se muestra en las figuras 31-37. Se informa la viscosidad de 5 mg/ml de metacrilato de rhColágeno en cada figura a modo de comparación (curva de color negro). Todas las muestras se prepararon en tampón de fosfato 0,1 M a pH 7,4 + NaCl 11,3 mM (osmolaridad fisiológica) y la medición se realizó a T = 22 °C. Los datos se comparan y se resumen en la figura 37.

También se muestra la polimerización de metacrilato de rhColágeno enriquecido con diferentes aditivos con respecto a armazones típicos de 5 mg/ml de MA de colágeno + diferentes aditivos en una relación de colIMA:aditivo de 2:1 (figura 38). Se comparó colIMA solo con colIMA combinado con metacrilato de alcohol polivinílico (PVMA), metacrilato de ácido hialurónico (HAMA) o celulosa oxidada (OC). Las soluciones se mezclaron con el fotoiniciador 2-hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (0,1 %) y se iluminaron durante 20 s con luz ultravioleta (UV) (365 nm).

Ejemplo 17. Armazón inyectable de rhColágeno/plasma rico en plaquetas.

Se investigó un armazón inyectable de rhColágeno/plasma rico en plaquetas (PRP) como armazón y herramienta de curación para la tendinopatía. Se inyectó una matriz de rhColágeno de degradación lenta combinada con una fuente de factores de crecimiento (GF), tal como plasma rico en plaquetas (PRP), en las proximidades del tendón lesionado en un esfuerzo por proporcionar el soporte necesario para mejorar la curación del tendón lesionado. El tratamiento usó una matriz hecha de colágeno humano recombinante (rhColágeno) de tipo I de origen vegetal mezclado con PRP, que favorece la liberación prolongada de factores de crecimiento en el sitio lesionado y promueve la curación. El efecto de la matriz de rhColágeno-PRP se comparó con el del PRP, *in vitro* e *in vivo*, en el apoyo a la proliferación de fibroblastos, la degradación de coágulos, la liberación de GF y la curación del tendón en un modelo de rata con tendinopatía del tendón de Aquiles inducida por colagenasa. El rhColágeno-PRP demostró un rendimiento superior en comparación con el PRP solo *in vitro* e *in vivo*. Estos resultados son alentadores con respecto al uso de la matriz de rhColágeno combinada con PRP en un ensayo clínico para una indicación de tendinopatía.

Materiales y métodos

Matriz de rhColágeno

La solución monomérica de rhColágeno en HCl 10 mM (CollPlant, Ness Ziona, Israel) se fibriló mediante neutralización del pH en solución de fosfato y se reticuló en 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida 18 mM (Sigma Aldrich, Israel). A continuación, el colágeno reticulado se lavó mediante centrifugaciones repetidas en agua bidestilada y se añadió cloruro de calcio (CaCl_2) (Merck, Israel), calculado hasta una concentración final de 20 mM. Las jeringas llenas con suspensión de rhColágeno se liofilizaron y se esterilizaron terminalmente con óxido de etileno.

Preparación de plasma rico en plaquetas (PRP)

El PRP libre de granulocitos se preparó usando el kit de PRP Tropocell (ESTAR, Israel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el ensayo de proliferación celular *in vitro*, se extrajo sangre humana de voluntarios humanos sanos (número de permiso de Helsinki 2012068). Para los estudios animales *in vivo*, se extrajo sangre de ratas Hsd:Sprague DawleySD (Harlan).

Matriz de rhColágeno/PRP y preparación de control

Matriz de rhColágeno/PRP: Las jeringas que contenían rhColágeno reticulado liofilizado se hidrataron con PRP o solución salina para obtener una concentración final de 20 mg/ml de rhColágeno.

PRP activado con trombina (control): El PRP humano se mezcló con trombina purificada (Sigma Aldrich, Israel) para obtener una concentración final de 100 UI/ml.

PRP activado con CaCl_2 (control): El PRP de rata se mezcló con CaCl_2 (Merck, Israel) para obtener una concentración final de 20 mM.

Ensayo de proliferación celular in vitro

En este estudio se evaluó el efecto de los GF sobre la viabilidad y proliferación de fibroblastos dérmicos humanos normales (nHDF). La viabilidad y proliferación celular se compararon tras la difusión de GF desde una matriz compuesta por la matriz de rhColágeno reticulado combinada con PRP o desde un coágulo compuesto por PRP activado con trombina. La matriz de rhColágeno combinada con PRP o el PRP activado con trombina (200 μl cada vez), se inyectaron en transpocillos (Thincerts™ 24 pocillos de 8,0 μm , Greiner bio-one, Israel) colocados sobre una placa de 24 pocillos (Thermo scientific, Israel) y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos para permitir la formación del coágulo. Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos normales (nHDF) (5.000 células por 0,5 ml) en el fondo de cada pocillo en un medio privado de suero (medio de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM, con suero fetal bovino al 1 %, FBS, Biological Industries, Israel). Los transpocillos que contenían las matrices (ya sea la matriz de rhColágeno combinada con PRP o PRP activado con trombina) se colocaron sobre el pocillo sembrado y se añadieron 0,2 ml más de medio sobre las muestras. Se sembraron nHDF en 0,5 ml de DMEM y FBS al 1 % como control. Las muestras se ensayaron por triplicado 7 y 10 días después de la siembra usando el kit de proliferación celular WST-1 (Roche, Israel) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Estudios in vivo

Animales

Se eligieron ratas Hsd:Sprague Dawley SD que pesaban 230 g $\pm$ 20 % para los experimentos con animales. A los animales se les dio un número de identificación animal auricular único y se asignaron aleatoriamente a un grupo específico. Los animales se alojaron en jaulas ventiladas individualmente (IVC, por sus siglas en inglés) en instalaciones para animales dedicadas con calefacción, ventilación y aire acondicionado (HVAC, por sus siglas en inglés). La temperatura y la humedad se controlaron de forma continua. A los animales se les proporcionó a voluntad

una dieta comercial para roedores (Harlan Teklad TRM Ra/Mouse Diet) y se les permitió el libre acceso a agua esterilizada en autoclave. La instalación no estuvo expuesta a la luz exterior y se mantiene en ciclos alternos automáticos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con las directrices para el tratamiento y cuidado de animales de laboratorio, y todos los protocolos fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee local. No se detectaron anomalías en ninguno de los animales durante todo el período de estudio. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores y el aumento de peso corporal promedio del grupo. Todos los aumentos estaban dentro del intervalo de valores normalmente esperados al final.

Degradación de coágulos in vivo y liberación de factores de crecimiento

Se compararon el tiempo de degradación y el contenido de GF en el tiempo de la matriz de rhColágeno combinada con PRP, la matriz de rhColágeno sola o el PRP activado con CaCl_2 en un modelo de rata subcutáneo (SC) (Science in Action Ltd., Ness Ziona, Israel)

Se afeitaron y marcaron los sitios de inyección en las espaldas de 34 ratas Sprague Dawley hembra (Harlan Laboratories, Ness Ziona Israel). A cada rata se le inyectó en cuatro lugares distanciados 0,5 ml de la misma formulación en el plano dorsal, dos sitios en la porción anterior y dos sitios en la porción posterior de la espalda de la rata. Los animales se sacrificaron en los puntos temporales 1, 7, 14, 21, 30 y 45 días posteriores al tratamiento (10 o 12 animales por grupo, 2 animales por punto temporal). En cada punto temporal, se expusieron los sitios de inyección y se evaluaron macroscópicamente. La piel en los sitios de inyección se separó suavemente del músculo usando tijeras, los sitios se lavaron con 0,25 ml de DMEM, PBS al 1 % (Biological Industries, Israel) y el coágulo se extrajo y se pesó. El medio de lavado se transfirió a un tubo Eppendorf (1,5-2 ml) mientras que el coágulo extraído se transfirió a una placa de 6 o 12 pocillos. Una vez pesado, el coágulo se combinó con el medio de lavado respectivo, se cortó con tijeras y se picó con un mortero para promover la liberación de GF del coágulo al medio circundante. A continuación, los tubos Eppendorf se centrifugaron durante al menos 5 minutos para separar el sedimento del coágulo y el medio. Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80°C hasta el ensayo. Un control (T0) que contenía -0,5 ml de la formulación respectiva se formó *in vitro* siguiendo el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente sin inyectar al animal. Al final del estudio, el contenido de PDGF y VEGF en los sobrenadantes conservados se evaluó mediante ELISA (PDGF de ratón/rata Quantikine ELISA y VEGF de rata Quantikine ELISA, R&D Systems, Israel).

Tendinopatía in vivo inducida en ratas

Se compararon las propiedades curativas de la matriz de rhColágeno combinada con PRP y de PRP solo en un modelo de tendinopatía inducida por collagenasa en 36 ratas Sprague Dawley macho (18 ratas por grupo, 6 animales por punto temporal). El experimento se realizó en Harlan Laboratories Israel Ltd. (Ness Ziona, Israel).

Se realizó una incisión en la piel sobre la porción proximal de la pata posterior derecha de la rata sobre el tendón calcáneo común. Con un aumento adecuado, se identificó y se aisló la rama media del tendón y se indujo la tendinopatía inyectando 0,3 mg de collagenasa (10 mg/ml, Sigma) debajo de la vaina del tendón calcáneo común usando una jeringa de insulina de 0,5 ml. Finalmente, se cerró la piel con suturas subcutáneas interrumpidas usando Vicryl 4/0. Una semana después de la inducción de la tendinopatía, se realizó una incisión punzante en la vaina del tendón usando un bisturí oftálmico corneal/escleral. A continuación, se creó un túnel debajo de la vaina del tendón usando una cánula y se inyectaron 50 μl de rhColágeno combinado con PRP o PRP solo en el canal creado previamente. Los animales se sacrificaron a los 3, 7 y 14 días posteriores al tratamiento. Los tendones tratados se extirparon y se conservaron para la evaluación histopatológica.

Histología

Los tejidos se incluyeron en parafina y se cortaron en serie en muestras de 4-5 micrómetros de grosor. Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el examen histopatológico y fueron evaluados con enmascaramiento por un patólogo.

Resultados

Ensayo de proliferación celular in vitro

En este estudio se comparó la viabilidad y proliferación de células sembradas en la proximidad de una matriz compuesta de rhColágeno combinado con PRP y un coágulo compuesto de PRP activado con trombina. Las células sembradas en pocillos no tratados se usaron como control. Las matrices (ya sea compuestas por rhColágeno combinado con PRP o PRP activado con trombina) se colocaron en transpocillos en la parte superior de los pocillos sembrados para permitir la difusión de GF desde las matrices al pocillo sin estar en contacto directo con las capas de células. El número de células vivas los días 7 y 10 se informa (figura 39 superior) como un promedio de dos experimentos diferentes (3 repeticiones por experimento) donde se extrajo PRP de dos donantes de sangre diferentes. Como se muestra en la figura 39, la viabilidad celular (los días 7 y 10) en presencia de GF liberados de la matriz de

rhColágeno combinada con PRP es significativamente mayor que en el coágulo de PRP activado con trombina o en el control. Además, mientras que en presencia de la matriz de rhColágeno combinada con PRP el número de células aumentó del día 7 al día 10, en presencia de PRP activado con trombina y en el grupo control el número de células disminuyó, mostrando que tanto la viabilidad celular como la proliferación son considerablemente superiores en presencia de la matriz de rhColágeno. Los datos se confirmaron por análisis de microscopía (figura 39 inferior). Las células cultivadas en presencia de la matriz de rhColágeno combinada con PRP (figura 39 inferior, panel A) muestran una forma alargada y que ya llegaron a la confluencia completa 7 días después de la siembra, mientras que las células cultivadas en presencia de PRP activado con trombina apenas estaban vivas, lo que puede indicar un efecto tóxico de la trombina en esta configuración experimental. (Figura 39 Inferior, panel B). Las células cultivadas en presencia de medio únicamente mostraron una viabilidad muy limitada (figura 39 Inferior, panel C).

Perfil de degradación de matrices in vivo y liberación de factores de crecimiento

Perfil de degradación de matrices

El perfil de degradación de las formulaciones inyectadas se determinó pesando las matrices en diferentes puntos temporales después de las inyecciones subcutáneas en ratas.

Tras la inyección de PRP activado, el material desapareció ya el día 1 (figura 40), lo que sugiere una degradación completa del coágulo de fibrina durante las primeras 24 horas. Por otro lado, la matriz de colágeno recombinante sola o combinada con PRP tuvo un perfil de degradación de dos fases (figura 40) que comenzó con una disminución pronunciada del peso durante el primer día seguida de una tasa de degradación relativamente más lenta que condujo a la eliminación completa después de 30-45 días (peso final <0,5 % del peso inicial).

Contenido de factores de crecimiento

El contenido de GF en el sitio de inyección en función del tiempo se evaluó mediante ELISA para PDGF y VEGF (figuras 41A-B). El contenido de PDGF en el tiempo 0 fue similar en la matriz de rhColágeno junto con PRP y en los tratamientos con PRP activado (figura 41A), lo que sugiere que el contenido de PDGF el día 0 es una contribución única de las plaquetas ricas en GF aportadas por el PRP. Sin embargo, tras la inyección de PRP solo, el contenido de PDGF en el sitio de inyección fue inferior al límite de detección ya 1 día después de la inyección y permaneció indetectable durante todo el estudio, de acuerdo con la rápida degradación del coágulo (figura 40). Se muestra una imagen diferente cuando se incorporó PRP en la matriz de rhColágeno (figura 41A). El contenido de PDGF aumentó gradualmente desde el día 1 hasta el día 14 y disminuyó de nuevo hasta eliminarse por completo hacia el día 45, en concomitancia con la degradación de los armazones (figura 40). Curiosamente, el contenido de PDGF en el grupo de matriz de rhColágeno sola aumentó a partir del día 7 y siguió el patrón mostrado por el grupo de matriz combinada con PRP. El contenido de VEGF el día 0 fue inferior al límite de detección para todas las formulaciones y se mantuvo en el nivel inicial en el grupo de PRP activado (figuras 41A-B y 42). El perfil de VEGF de la matriz de rhColágeno combinada con PRP muestra un rápido aumento en el contenido de VEGF alrededor del día 7 seguido de una pronunciada disminución hasta el día 14 y una meseta hasta el día 30, el VEGF finalmente disminuye en el día 45 en concomitancia con la degradación del almacén (figura 41B).

El aumento de los GF observado desde el día 1 al 14 en el análisis de PDGF y desde el día 0 al día 7 en el análisis de VEGF atestigua la capacidad del almacén de rhColágeno para permitir la acumulación de GF, reflejando probablemente células que migran y proliferan en el almacén. La integración del contenido nominal de PDGF y VEGF a lo largo de todo el estudio para cada formulación se resume en la figura 42. Está claro que el contenido de GF en el sitio de inyección es mucho mayor tras la inyección de la matriz de rhColágeno sola o combinada con PRP en comparación con PRP activado solo.

Tendinopatía in vivo inducida en ratas

Las propiedades curativas de la matriz de rhColágeno combinada con PRP en comparación con PRP solo se evaluaron en un modelo de rata para tendinopatía y se evaluaron mediante análisis histopatológico en diferentes puntos temporales. La curación y la inflamación del tendón se cuantificaron puntuando el nivel de fibrosis madura, la presencia de células inflamatorias mononucleares y la presencia de tejido de granulación inmadura (puntuación 0-5 como se describe en la Tabla 7).

Tabla 7. Puntuación histopatológica

Puntuación	Descripción
0	Sin cambio
1	Hasta el 10 % del área del tejido seccionado está afectada por la lesión
2	Hasta el 25 % del área del tejido seccionado está afectada por la lesión

(continuación)

Puntuación	Descripción
3	Hasta el 50 % del área del tejido seccionado está afectada por la lesión
4	Hasta el 75 % del área del tejido seccionado está afectada por la lesión
5	Más del 75 % del área del tejido seccionado está afectada por la lesión

Los valores acumulativos de las puntuaciones histopatológicas asociadas con cada tratamiento se representan en las figuras 43A-C. El grupo tratado con la matriz de rhColágeno combinada con PRP mostró una fibrosis ligeramente más madura en comparación con el grupo tratado con PRP, específicamente el día 3 y 14. Esto es consistente y se correlaciona con el nivel inferior de granulación inmadura mostrado por el grupo tratado con la matriz de rhColágeno combinada con PRP el día 14 (figura 43C). Además, en la figura 43B, el grupo tratado con la matriz de rhColágeno combinada con PRP muestra una disminución de la inflamación como lo indica la baja presencia de células inflamatorias mononucleares en todos los puntos temporales, especialmente el día 3 y 14. En general, los datos demuestran que el tratamiento del tendón lesionado con la matriz de rhColágeno combinada con PRP promueve una curación más rápida como lo demuestra el mayor nivel de fibrosis madura y el menor nivel de tejido de granulación inmadura acompañado de una importante disminución de células mononucleares inflamatorias en comparación con el tratamiento estándar de inyección de PRP

Análisis

Los daños a los tejidos blandos, incluidas las lesiones en tendones y ligamentos, son muy comunes y causan una carga clínica significativa. Aunque existen varios tratamientos disponibles, su beneficio clínico aún es limitado. Esto fomentó la búsqueda de nuevas alternativas con la intención de mejorar la curación y reducir el tiempo de recuperación. Se desarrolló una matriz inyectable compuesta por colágeno recombinante de tipo I que, una vez mezclado con PRP, forma un compuesto de colágeno-fibrina-PRP que se degrada lentamente, atrae la migración y proliferación celular en el almacén de colágeno y permite la liberación prolongada de GF en el sitio lesionado, apoyando de este modo mejor el proceso de curación. Los experimentos *in vitro* (figura 39) mostraron una viabilidad y proliferación de nHDF considerablemente superiores en las proximidades de la matriz de rhColágeno combinada con PRP en comparación con PRP activado con trombina. Los resultados demostraron que los factores de crecimiento sostenido liberados de la matriz de colágeno promueven y mejoran la proliferación celular. El colágeno de tipo I, cuando se combina con PRP, sigue proporcionando un entorno de apoyo que promueve y mejora la proliferación celular incluso cuando no está en contacto directo con la capa celular. Las inyecciones SC en ratas mostraron por primera vez que el coágulo de fibrina que contenía GF formado *in situ*, tras la inyección de PRP, se degrada ya en veinticuatro horas y, en consecuencia, el contenido de GF en el sitio de la inyección es inferior al límite de detección de ELISA (figuras 41A-B). Una vez que las plaquetas forman complejos con la matriz de rhColágeno, los GF se liberan durante 45 días, tiempo que coincide con la degradación del almacén (figuras 40 y 41A-B). Es interesante observar que el perfil de contenido de GF no es monótono como se hubiera esperado de un perfil de liberación estándar. El perfil de PDGF en la matriz de rhColágeno con tratamiento de PRP (figuras 41A-B) demostró una primera disminución pronunciada el primer día, muy similar al caso del PRP solo, seguida, sin embargo, de un aumento gradual hasta el día 21 y una disminución final para alcanzar niveles indetectables en concomitancia con la degradación del almacén. Curiosamente, el rhColágeno solo mostró un patrón similar de aumento gradual en el contenido de PDGF durante las primeras semanas y disminución hacia la degradación completa del almacén. Por lo tanto, el almacén de rhColágeno con PRP combina los beneficios proporcionados por el PRP atrapado (liberación temprana de GF) con los proporcionados por el propio almacén de rhColágeno, que promueve y mejora en gran medida el reclutamiento y la proliferación celular. En cuanto al perfil de contenido de VEGF, mientras que, tras la inyección de PRP, el nivel de VEGF se mantuvo extremadamente bajo durante todo el estudio, la inyección de la matriz de rhColágeno combinada con PRP dio como resultado un aumento en el nivel de VEGF en la primera semana para finalmente disminuir en concomitancia con la degradación del almacén. Curiosamente, a diferencia de PDGF, el nivel de VEGF en el grupo tratado con la matriz de rhColágeno sola fue aún más alto que en el grupo de PRP solo, pero mostró un perfil diferente al de la matriz de rhColágeno con PRP, especialmente el día 7. Esta observación enfatiza la contribución del PRP al nivel de GF una vez combinado con el almacén de colágeno. Finalmente, las propiedades curativas del rhColágeno y el PRP se compararon con el PRP en un modelo de rata para tendinopatía del tendón calcáneo común (tendón de Aquiles). La evaluación histológica confirmó la capacidad más rápida de la matriz de rhColágeno combinada con PRP para construir tejido fibrótico maduro, lo que es consistente con la capacidad del almacén para promover el reclutamiento y la proliferación de células como se anticipó en los experimentos anteriores. Además, el análisis histológico también demuestra que una vez que el sitio lesionado se trata con la matriz de rhColágeno combinada con PRP, la inflamación disminuye sustancialmente en comparación con el tratamiento estándar con PRP solo.

Este estudio demuestra los efectos biológicos, *in vitro* e *in vivo*, de un almacén inyectable compuesto por colágeno humano recombinante de tipo I reticulado. Una vez combinado con una fuente autóloga de GF tal como PRP, el almacén formado acelera la curación de las lesiones de los tejidos blandos, controlando la respuesta inflamatoria y

promoviendo la formación más rápida de nuevo tejido sano. Los resultados sugieren que las propiedades curativas mejoradas residen en la combinación única de rhColágeno y PRP autólogo que extiende la liberación de GF. Los datos respaldan el uso de la matriz de rhColágeno combinada con PRP en un ensayo clínico para tendinopatía.

5 Ejemplo 18. Uso de un colágeno humano recombinante de origen vegetal como relleno dérmico.

Para reducir la inmunogenicidad, promover la regeneración tisular y proporcionar un relleno dérmico más uniforme y potencialmente más duradero con propiedades reológicas mejoradas, en comparación con los colágenos humanos y bovinos de origen tisular, se produce y se aísla un colágeno humano transgénico (rhColágeno) de una planta (p. ej., una planta de tabaco modificada genéticamente) y a continuación se usa como relleno dérmico. Típicamente, la planta modificada genéticamente comprende una secuencia expresable de al menos una secuencia génica de ácido desoxirribonucleico (ADN) humano seleccionada del grupo que consiste en: COL1, COL2, P4H-alfa, P4H-beta y LH3. Típicamente, el colágeno humano de origen vegetal comprende al menos una cadena alfa-1 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 3 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y al menos una cadena alfa-2 de colágeno humano modificada como se expone en la SEQ ID NO: 6 y como se expresa en la planta modificada genéticamente; y la planta genéticamente modificada expresa además una prolil-4-hidroxilasa (P4H) exógena (p. ej., una P4H humana o de otro mamífero). Opcionalmente, la planta modificada genéticamente expresa además un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consiste en lisil hidroxilasa (LH), proteasa N y proteasa C. Por ejemplo, la cadena alfa-1 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 1, y/o la cadena alfa-2 de colágeno humano está codificada por una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2. Opcionalmente, la cadena alfa-1 y/o la cadena alfa-2 de colágeno humano se dirigen a una vacuola de la planta o la planta genéticamente modificada y se digieren con ficina, lo que da como resultado atelocolágeno humano.

Opcionalmente, el rhColágeno se modifica o se formula con otras sustancias, incluyendo las conocidas en la técnica para rellenos dérmicos. Los ejemplos de modificación incluyen, pero sin limitación, metacrilación y/o tiolación. Los ejemplos de otras sustancias incluyen, pero sin limitación, ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de cualquiera de estos. Los ejemplos de otra sustancia incluyen, pero sin limitación, ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa, nanocelulosa cristalina (CNC) o una combinación de los mismos. Los derivados modificados de HA, PVA, PEG u OC incluyen, pero sin limitación, derivados fotopolimerizables. Las modificaciones de HA, PVA, PEG u OC incluyen, pero sin limitación, metacrilación y/o tiolación. Los ejemplos de otras sustancias incluyen, pero sin limitación, agentes de polimerización o iniciadores, tales como un fotoiniciador (p. ej., sensible a la luz visible, ultravioleta (UV) o infrarroja). Los ejemplos de fotoiniciadores de luz visible incluyen, pero sin limitación, eosina Y+ trietanolamina o riboflavina. Los ejemplos de fotoiniciadores ultravioleta incluyen, pero sin limitación, fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinato de litio (LAP) o 1-[4 2-hidroxi-1-[4-(2-hidroxietoxi)fenil]-2-metilpropan-1-ona (IRGACURE® 2959).

Una propiedad inherente del colágeno extraído de tejido es la gelificación a temperatura ambiente. A concentraciones relativamente bajas (p. ej., 5-15 mg/ml) en tampón fisiológico, el colágeno extraído de tejido forma un gel cuando se transforma de frío (aproximadamente 4 °C) a temperatura ambiente.

En cambio, el rhColágeno tiene una viscosidad relativamente baja (en la misma concentración y formulación) que permite la inyección a través de agujas o cánulas de calibre estrecho (calibre 27 a calibre 33) usando una fuerza de expresión relativamente reducida, así como una mejor penetración en espacios más pequeños y una mayor flexibilidad en la modulación posterior a la inyección (esculpido).

El rhColágeno se pone en una jeringa que tiene una aguja o cánula de calibre fino (calibre 27 a calibre 33) y se inyecta en una cavidad o espacio debajo de la dermis. A continuación, el rhColágeno inyectado se moldea, se esculpe o se manipula de otro modo en la posición deseada (p. ej., mediante masaje manual o con un instrumento de moldeado o esculpido, tal como un depresor quirúrgico). La polimerización puede iniciarse antes, durante o después de este proceso mediante la exposición a una fuente de luz (p. ej., un diodo emisor de luz (LED), láser o lámpara de xenón) ubicada sobre o por encima de la dermis que recubre la formulación inyectada.

55 Ejemplo 19. Uso de un colágeno humano recombinante de origen vegetal modificado formulado con un fotoiniciador y un aditivo

El rhColágeno se modifica mediante metacrilación, como se describe en el Ejemplo 18. El rhColágeno modificado se prepara como una formulación de solución polimerizable con un fotoiniciador (p. ej., eosina Y + trietanolamina o riboflavina). Se incluyen ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa, nanocelulosa cristalina (CNC) o alguna combinación de los mismos.

La formulación se pone en una jeringa que tiene una aguja o una cánula de calibre fino (calibre 27 a calibre 33) y se inyecta en una cavidad o espacio debajo de la dermis. A continuación, la formulación inyectada se moldea, se esculpe

o se manipula de otro modo, ya sea manualmente o con un instrumento quirúrgico apropiado, en la posición deseada durante o después de la exposición a una fuente de luz (p. ej., una fuente de luz visible), como se describe en el Ejemplo 18.

- 5 Ejemplo 20. Uso de un colágeno humano recombinante de origen vegetal modificado formulado con un fotoiniciador y un aditivo modificado.

10 El rhColágeno modificado se modifica mediante metacrilación o tiolación como en el Ejemplo 19. El rhColágeno modificado se prepara como una formulación de solución polimerizable con un fotoiniciador (p. ej., eosina Y+ trietanolamina o riboflavina), como se describe en el Ejemplo 18. Un derivado modificado de ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC) o alguna combinación de los mismos se incluye y se modifica mediante metacrilación o tiolación.

15 La formulación se pone en una jeringa que tiene una aguja o una cánula de calibre fino (calibre 27 a calibre 33) y se inyecta en una cavidad o espacio debajo de la dermis. A continuación, la formulación inyectada se moldea, se esculpe o se manipula de otro modo, ya sea manualmente o con un instrumento quirúrgico apropiado, en la posición deseada durante o después de la exposición a una fuente de luz (p. ej., una fuente de luz visible), como se describe en el Ejemplo 18.

- 20 Ejemplo 21. Inyectabilidad y viscosidad comparativas de ácido hialurónico reticulado con colágenos.

25 Como se muestra en la figura 44, la fuerza de expresión (newtons, N) necesaria para inyectar ácido hialurónico (HA) reticulado (curva de □ de color negro) se comparó con la fuerza de expresión necesaria para inyectar ácido hialurónico (HA) reticulado con colágeno monomérico (curva de ▼) o colágeno fibrilado (curva de ▲). (HA reticulado, 20 mg/ml; HA reticulado, 20 mg/ml, rhCol monomérico, 7,5 mg/ml; HA reticulado, 20 mg/ml, colágeno fibrilado, 10 mg/ml)

30 Como se muestra en la figura 45, la fuerza de expresión (newtons, N) necesaria para inyectar HA reticulado se comparó con la fuerza necesaria para inyectar una formulación de HA doblemente reticulado-colágeno (curva de color gris). Las dos curvas fueron en gran medida similares.

35 Como se muestra en la figura 46, la viscosidad del ácido hialurónico (HA) reticulado (curva de color negro) se comparó con la viscosidad del ácido hialurónico (HA) reticulado con colágeno monomérico (curva de ▼) o colágeno fibrilado (curva de ▲). La viscosidad del HA reticulado con colágeno fibrilado fue menor que la del HA reticulado con colágeno monomérico, pero aún mayor que la del HA reticulado solo. Las concentraciones fueron las de la figura 44.

40 Como se muestra en la figura 47, la viscosidad del ácido hialurónico (HA) reticulado se comparó con la viscosidad de una formulación de ácido hialurónico (HA) doblemente reticulado-colágeno (curva de color gris). La viscosidad del HA doblemente reticulado-colágeno fue mayor que la del HA reticulado solo.

45 La adición de rhColágeno, ya sea monomérico o fibrilado, reticulado o no reticulado, a un relleno dérmico de HA reticulado no aumentó significativamente la fuerza de expresión, lo que permitió un rendimiento similar para el médico, pero, por otro lado, aumentó significativamente la viscosidad del material, lo que permitió un mejor levantamiento de la piel tras la inyección.

- 45 Ejemplo 22. Polimerización transdérmica de metacrilato de colágeno humano recombinante (rhColágenoMA).

50 Como se muestra en las figuras 48A-B, una solución líquida de metacrilato de colágeno humano recombinante (rhColágenoMA) con eosina Y/TEA como fotoiniciador, inyectada debajo de un parche de piel de ratón (figura 48A), se polimerizó por vía transdérmica iluminando la piel con luz LED blanca de una linterna LED blanca durante 6 minutos. El rhColágenoMA se polimerizó y se integró en el tejido de la piel (figura 48B).

El rhColágenoMA se polimeriza debajo de la piel cuando se ilumina durante 6 minutos con una pequeña linterna LED en presencia de eosina Y/TEA como fotoiniciador.

- 55 Ejemplo 23. Formulación de rellenos dérmicos doblemente reticulados: Síntesis en dos etapas

60 *Objetivo:* Desarrollar rellenos dérmicos inyectables para su uso en la mejora del aspecto de la superficie de la piel con fines estéticos o clínicos. Los rellenos dérmicos están compuestos por colágeno humano recombinante de tipo I (rhColágeno) o su forma modificada, rhColágeno con metacrilato (MA-rhCol) y ácido hialurónico (HA) reticulado.

65 El producto doblemente reticulado, en donde el HA reticulado se reticula adicionalmente con rhColágeno (Fig. 49), está diseñado para ser un almacén en donde el ácido hialurónico proporcione el soporte estructural y el relleno de huecos, mientras que el rhColágeno mejora la proliferación celular promoviendo la regeneración tisular. El almacén finalmente se degradará dejando el tejido recién formado. Otro objetivo es analizar el relleno dérmico doblemente reticulado, examinando el efecto de levantamiento (aumento de tejido) proporcionado por el HA reticulado, con la regeneración tisular promovida por el rhColágeno de tipo I.

*Métodos:**Doble reticulación**- Reticulación de HA -*

Se disolvió ácido hialurónico de alto peso molecular (intervalo 700 KDa-3 MDa, preferentemente 1,5 MDa) en condiciones alcalinas (pH 12-13, p. ej., en Na(OH) 0,3 N) a una concentración que variaba de 50 a 200 mg/ml (preferentemente 100 mg/ml). Se añadió el agente de reticulación 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) al disolvente en una relación que variaba del 1 al 50 % de las cantidades de disacáridos de HA (preferentemente el 6, 8, 10 %) antes de disolver el HA. En algunos aspectos de la formulación, el HA comprende HA con metacrilato (MA-HA).

La reticulación de HA se realizó a temperatura ambiente durante 24 h.

Adición de HA de menor peso molecular y neutralización

Se disolvió HA de menor peso molecular (50 KDa a 1000 KDa, preferentemente de 300 a 700 KDa) que variaba del 1 al 30 % de la cantidad total de HA (preferentemente el 5-10 %) en agua a una concentración que variaba de 10 a 100 mg/ml (preferentemente 30 mg/ml). En algunos aspectos de la formulación, el HA comprende HA con metacrilato (MA-HA).

Antes de mezclar el HA no reticulado con el HA reticulado, se añade HCl al HA no reticulado en una cantidad necesaria para neutralizar el pH del HA reticulado. Se añaden tampón fosfato (PB) y NaCl a una concentración final de PB 0,1 M y NaCl 0,2 M.

Neutralización de rhColágeno

Antes de mezclar el rhColágeno con HA, el rhColágeno se lleva a 0,1 M en PB + NaCl 0,2 M.

Mezcla de HA + rhColágeno

El HA (HA reticulado + HA no reticulado) se mezcla con rhColágeno en relación de HA:rhColágeno que varía entre (6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6) y se mantiene a 2-8 °C. La concentración final de HA está entre aproximadamente 5-50 mg/ml. La concentración final de rhColágeno o MA-rhColágeno está entre aproximadamente 1-50 mg/ml.

Segunda reticulación

Cuando el HA y el rhColágeno se mezclaron bien, se realizó una segunda reticulación con metyoduro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC): Se disolvió una cantidad de EDC igual a 10 a 100 veces (preferentemente 50 veces) la cantidad de aminas libres en el rhColágeno (PB 0,1 M + NaCl 0,2 M), se añadió a la mezcla reticulada de HA-rhColágeno y se mezcló. La segunda reticulación se realizó en la oscuridad durante 2-3 h a 2-8 °C.

Dialisis

A continuación, el material doblemente reticulado se dializó frente a PBS, HCl 1 mM o frente a un tampón con bajo contenido de fosfato (preparación del tampón con bajo contenido de fosfato: (a) Solución madre: Fosfato de sodio dibásico 162 mM llevado a pH 11,2 con Na(OH) 10 N; (b) dilución de la solución madre 1:1000 en HCl 0,1 mM).

Evolución reológica y mecánica

Se midieron los módulos de almacenamiento y pérdida, p. ej., por ejemplo, usando un instrumento HAAKE-RHEO STRESS 600™ (THERMO SCIENTIFIC™) usando una configuración de cono (1 grado) frente a placa (C35/1). Se realizaron mediciones de barrido de frecuencia a una deformación constante (p. ej., 0,8 %) con un intervalo de frecuencias (p. ej., 0,02-100 Hz). Opcionalmente, se ensayaron diversas relaciones o relaciones de reticulación de uno o ambos componentes. La primera y la segunda reticulación se pueden ajustar para controlar los módulos de almacenamiento y pérdida del producto final.

Se tomaron mediciones de inyectabilidad, p. ej., usando una máquina MULTITEST 1-i MECMESIN™ en función del desplazamiento del émbolo (mm) para observar la fuerza de expresión.

Inyectabilidad

Se tomaron mediciones de inyectabilidad usando una máquina MULTITEST 1-i MECMESIN™, como se ha descrito

anteriormente. Se usaron jeringas LUER-LOK™ de 1 ml (BECTON-DICKINSON™) y agujas 30G para las Formulaciones 2, 2A y 3 (Tabla 8). La fuerza de expresión en función del desplazamiento del émbolo de las Formulaciones 2, 2A y 3 doblemente reticuladas representativas (Tabla 8) se comparó con un relleno dérmico disponible comercialmente, también usando una aguja 30G.

Estudios en animales

Se inyectaron por vía subcutánea 200 microlitros de la Formulación 2 o 2A, o el control en la espalda de ratas Sprague Dawley. Se realizó la histología después de 1 semana.

Resultados:

Un experto en la técnica apreciará que la doble reticulación en dos etapas usa aquí dos tipos de agente de reticulación. La 1.^a etapa incluye HA y BDDE como agente de reticulación. En la segunda etapa se añaden colágeno y HA no reticulado y la reticulación se logra usando EDC. Se espera que la diferencia en la química de reticulación y la secuencia de acciones, en comparación con todos los demás métodos de preparación de relleno dérmico, dé como resultado composiciones de relleno dérmico que tengan diferentes propiedades, incluyendo propiedades mecánicas, interacción tisular y tasa de degradación.

Se realizaron formulaciones de HA:rhColágeno usando los métodos anteriores, con las formulaciones representativas mostradas en la Tabla 8.

Tabla 8. Formulaciones de composiciones.

Formulación	Relación de reticulación de HA	Relación de HA:rhColágeno	Comentarios
1	10 %	2:1	Dializada frente a solución salina tamponada con fosfato
1A	10 %	2:1	Dializada frente a HCl 1 mM y neutralizada
2	6 %	2:1	Dializada frente a solución salina tamponada con fosfato
2A	6 %	2:1	Dializada frente a HCl 1 mM y neutralizada
3	8 %	2:1	Dializada frente a solución salina tamponada con fosfato

Evolución reológica y mecánica

Como se muestra en la figura 50, los módulos de almacenamiento (líneas continuas) y pérdida (líneas discontinuas) de las formulaciones doblemente reticuladas representativas (Tabla 8) fueron comparables a los del relleno dérmico disponible comercialmente. En la figura 51 se muestra una comparación de los módulos de almacenamiento y pérdida de estas formulaciones y este relleno comercial a $f = 1$ Hz.

La primera y la segunda reticulación se pueden ajustar para controlar los módulos de almacenamiento y pérdida del producto final. Como se muestra en la figura 52, la fuerza de expresión requerida para inyectar las formulaciones doblemente reticuladas a través de una aguja 30G fue significativamente menor que la fuerza de expresión requerida para inyectar el relleno dérmico disponible comercialmente.

Histología y estudios en animales

Se realizaron estudios en animales como se ha descrito anteriormente. Las Formulaciones 2 y 2A (véanse las Tablas 8 y 9) se compararon con un producto de relleno dérmico disponible comercialmente después de inyecciones subcutáneas. La inflamación es la primera etapa en el proceso de regeneración, siempre que no sea demasiado grave.

Las puntuaciones histológicas promedio el día 7 después de las inyecciones subcutáneas se comparan con el relleno dérmico disponible comercialmente en la Tabla 9.

Tabla 9. Puntuaciones histológicas del día 7.

	Puntuación de inflamación	% de linfocitos	% de macrófagos	% de neutrófilos	Puntuación de necrosis	Puntuación de fibrosis
Formulación 2	2	50	40	10	0	2

(continuación)

	Puntuación de inflamación	% de linfocitos	% de macrófagos	% de neutrófilos	Puntuación de necrosis	Puntuación de fibrosis
Formulación 2A	2,25	42,5	42,5	15	0	2
Material disponible comercialmente/control	1333333	36,66667	5333333	10	0	1,333

Como se muestra en la Tabla 9, las formulaciones doblemente reticuladas tienen una puntuación de fibrosis más alta y un nivel de inflamación más alto que el relleno dérmico disponible comercialmente, lo que indica un proceso más avanzado de regeneración tisular.

La figura 56 muestra imágenes histológicas representativas el día 7 después de la inyección subcutánea de las Formulaciones 2, 2A o el control. Las flechas señalan la reacción inflamatoria mejorada en la Formulación 2 y 2A (pero aún no grave) que indica el inicio de la regeneración tisular. Las "ampollas" se refieren a las ampollas formadas por el material inyectado.

Las puntuaciones histológicas para las muestras que se muestran en la figura 56 se presentan como un gráfico de barras en la figura 57, en donde las puntuaciones de inflamación y de fibrosis más altas para las Formulaciones 2 y 2A doblemente reticuladas indican que mostraron una regeneración tisular mejorada en comparación con el control.

Resumen/Conclusión

Se han desarrollado formulaciones doblemente reticuladas para facilitar la inyección a través de agujas de 27 a 32 G y una amplia gama de rigidez G'-G". Los resultados histológicos después de una inyección de una semana muestran una iniciación mejorada del proceso de regeneración tisular.

Ejemplo 24. Relleno dérmico fotocurable

Objetivo: Analizar las propiedades de un relleno dérmico fotocurable. La formulación fotocurable es una semi-IPN antes del curado y termina siendo una IPN (red interpenetrada) después del curado. Es decir, dos redes enredadas, cada una reticulada consigo misma y no reticulada con la otra.

Métodos:

Se añadió una mezcla de rhColágeno y rhColágeno con metacrilato a HA ya reticulado, reticulado como en el Ejemplo 23, a una concentración final de 1-10 mg/ml, en donde la relación entre el rhColágeno con metacrilato y sin metacrilato es de 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 0:1, 2:1, 3:1 o 4:1. El intervalo de concentración final de MA-rhColágeno es de 0-12 mg/ml y el intervalo de concentración final de rhColágeno no modificado es de 0-12 mg/ml. La relación del HA reticulado con respecto al MA-rhColágeno es de 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1. La concentración final de HA es de 12-25 mg/ml, la concentración final de rhColágeno (MA + no modificado) es de 1-24 mg/ml.

Se añadió un fotoiniciador de luz visible a la mezcla (p. ej., composiciones de eosina Y, trietanolamina y N-vinilpirrolidona).

Estudios reológicos

Se vertieron muestras de 1,6 ml de cada una de las Formulaciones 4, 5 y 6 representativas y el control (véase la Tabla 10 a continuación) en moldes cilíndricos y cilindros de 2 cm de diámetro y 0,5 mm de altura y se curaron mediante una cantidad constante de iluminación de luz visible usando una linterna LED blanca durante 6 minutos.

Se mezclaron formulaciones de ácido hialurónico (HA) altamente reticulado con combinaciones de rhColágeno y/o metacrilato de rhColágeno en 3 relaciones representativas diferentes con una cantidad constante de fotoiniciador de luz visible, usando los métodos anteriores, como se muestra en la Tabla 10. Se mezcló HA altamente reticulado con BDDE (pero podría ser cualquier otro agente de reticulación también, o incluso un relleno comercial estándar hecho solo de HA reticulado) con rhCol y rhColMA en diferentes relaciones. El resultado es una reticulación del HA y una reticulación del rhColMA enredado después del curado. Esto forma una red interpenetrada donde el HA se reticula consigo mismo y el colágeno se reticula consigo mismo dentro de la red de HA.

Tabla 10. Formulaciones ensayadas antes y después del fotocurado.

	HA reticulado	MA de rhColágeno	rhColágeno
Control (HA reticulado)	23 mg/ml	-	-
Formulación 4	19 mg/ml	2,5	
Formulación 5	19 mg/ml	1,25	1,25
Formulación 6	19 mg/ml	0,64	1,83

Se midieron los módulos de almacenamiento y pérdida antes y después de la iluminación como se describe a continuación.

5

a. Antes del curado

Los módulos de almacenamiento y pérdida se midieron usando un instrumento HAAKE-RHEO STRESS 600™ (THERMO SCIENTIFIC™) usando una configuración de cono (1°) frente a una configuración de placa (C35/1). Las mediciones de barrido de frecuencia se realizaron a una deformación constante del 0,8 % con una frecuencia que variaba de 0,02 Hz a 100 Hz.

10

b. Después del curado

Los módulos de almacenamiento y pérdida de los cilindros fotocurados se midieron usando un instrumento HAAKE-RHEO STRESS 600™ (THERMO SCIENTIFIC™) usando una configuración de placa dentada frente a placa (PP20). Las mediciones de barrido de frecuencia se realizaron a una tensión de corte constante de 3 Pa con una frecuencia que variaba de 0,02 Hz a 100 Hz, bajo una carga normal constante de 0,3 N.

15

Inyectabilidad

20

Se tomaron mediciones de inyectabilidad usando una máquina MULTITEST 1-i MECMESIN™, como se ha descrito anteriormente para las Formulaciones 4, 5 y 6 y para el HA altamente reticulado como control. Se usaron jeringas LUER-LOK™ de 1 ml (BECTON-DICKINSON™) y agujas 30G para todas las muestras (Tabla 10). La fuerza de expresión en función del desplazamiento del émbolo (12 mm/min) de las Formulaciones 4, 5 y 6 representativas (Tabla 10) se comparó con el HA altamente reticulado.

25

Estudios en animales

Se realizaron estudios en animales como se ha descrito anteriormente. La Formulación 4 (véanse las Tablas 10 y 11) se comparó con HA altamente reticulado después de inyecciones subcutáneas en la espalda de ratas.

30

Resultados:

Evolución reológica y mecánica

35

La figura 53 muestra una comparación de los módulos de almacenamiento antes y después del fotocurado de las Formulaciones 4, 5 y 6 con HA altamente reticulado (véase la Tabla 10). En la figura 54 se muestra una comparación de los módulos de almacenamiento y pérdida de estas formulaciones, tanto antes como después del fotocurado, y HA altamente reticulado (no curable) a una frecuencia de $f = 1$ Hz. La flecha representa "Tendencia": La rigidez aumenta a medida que aumenta la cantidad de rhColMA.

40

Inyectabilidad

Como se muestra en la figura 55, la fuerza de expresión requerida para la inyección de las Formulaciones 4, 5 y 6 a través de una aguja de 30 G fue menor que la fuerza de expresión requerida para el HA reticulado solo, lo que permite una utilización más sencilla para el médico y una inyección más sencilla en las líneas finas y las zonas delicadas del paciente. Sin embargo, después del fotocurado *in situ* (después de la inyección), la rigidez del material se puede ajustar para que sea significativamente mayor que la del HA reticulado solo (véanse las figuras 53 y 54).

50

Histología y estudios en animales

La puntuación histológica promedio de la Formulación 4 el día 7 de las inyecciones subcutáneas se comparó con la del HA altamente reticulado en la Tabla 11.

55

Tabla 11. Puntuaciones histológicas del día 7.

	Puntuación de inflamación	% de linfocitos	% de macrófagos	% de neutrófilos	Puntuación de necrosis	Puntuación de fibrosis
Formulación 4	1,5	42,5	50	7,5	0	1,5
Material disponible comercialmente/control	1333333	36,66667	53,33333	10	0	1,333

Como se muestra en la Tabla 11, la Formulación 4 tiene una puntuación de fibrosis más alta y un nivel de inflamación más alto que el HA altamente reticulado, lo que indica un proceso más avanzado de regeneración tisular.

La figura 58 y la figura 59 muestran que la Fórmula 4 tiene una puntuación de inflamación y una puntuación de fibrosis más altas que el relleno dérmico de control, lo que indica un inicio mejorado del proceso de regeneración tisular con el relleno dérmico de Fórmula 4.

Conclusión/Resumen

El relleno fotocurable se desarrolló para tener una rigidez relativamente baja antes de la inyección, lo que permite una inyección fácil a través de agujas de 27-32G, pero una mejora significativa en la rigidez (ajustable) después del fotocurado. La rigidez se puede ajustar controlando la relación final entre rhCol y rhColMA. Esta tecnología permite al médico esculpir el relleno a la forma deseada antes de fijarlo con la iluminación de fotocurado. El material inyectado se adhiere firmemente al tejido circundante. Los resultados preliminares *in vivo* indican el inicio del proceso de regeneración.

Ejemplo 25. Estudios *in vivo* en animales: Inyección independiente de componentes de relleno dérmico

Objetivo: Inyectar por vía subcutánea por separado HA o su derivado con metacrilato y rhColágeno con metacrilato en una fase semilíquida y reticularlos *in situ* (la reticulación es de rhColMA a rhColMA), después de la inyección, mediante iluminación con luz blanca a través de la piel. Este enfoque permite una inyección más sencilla y el esculpido *in situ* de la forma del material, justo antes de fijarlo mediante polimerización con luz. Usando un modelo de rata subcutáneo, se evaluarán la proliferación celular, el aumento de tejido y las características de degradación de la matriz en el tiempo.

Métodos: En este modelo, los componentes de la formulación de muestra (HA o su derivado con metacrilato, y rhColágeno con metacrilato y fotoiniciador) para la evaluación se inyectarán por vía subcutánea en la espalda de ratas Sprague Dawley macho y se hará un seguimiento de los sitios de inyección durante hasta 20 días. Las inyecciones se realizarán aproximadamente al mismo tiempo (inmediatamente una después de la otra), en el mismo lugar. Las soluciones de los componentes se pueden masajear *in situ* antes o al mismo tiempo que se realiza la reticulación o después de esta. Se elige el modelo de rata subcutáneo porque es el modelo más sencillo para estimar la biocompatibilidad, el efecto de levantamiento y la persistencia. Además, Hillel *et al.* publicaron un estudio de validación para este modelo específico (Dermatol Surg 2012; 38:471-478).

Los animales se sedarán con ketamina/xilasina antes de cada tratamiento. Se afeitará la espalda del animal y se marcarán los sitios de inyección en la piel afeitada. A cada rata se le inyectarán 0,2 ml de la formulación usando una aguja 27,5-32G en lugares distanciados en el plano dorsal, en general, 6 inyecciones por rata.

Las formulaciones se reticularán después de la inyección mediante la iluminación transdérmica del sitio de inyección con una linterna LED de luz blanca durante 2 minutos.

Se observará a todos los animales para determinar la morbilidad y la mortalidad dos veces al día durante todo el período del estudio. Cada tres días (puntos temporales de 0, 1, 4, 7, 11, 14, 18 y 21 días posteriores a las inyecciones) se medirá la altura, el ancho y la longitud de cada ampolla con un calibrador y se calculará el volumen elipsoide de cada ampolla $[(4/3)(\pi)(1/2 \text{ de altura})(1/2 \text{ de longitud})(1/2 \text{ de ancho})]$.

Los animales serán sacrificados en los puntos temporales, por ejemplo, pero sin limitación, 7, 14 y 21 días posteriores al tratamiento.

En cada punto de escarificación, se expondrán los sitios de inyección y se evaluarán macroscópicamente, y las ampollas se recogerán para su evaluación histológica. Los sitios de inyección (incluidas las ampollas) se extirparán con la piel suprayacente y se fijarán en formalina al 4 % y se incorporarán en parafina.

Histología

Preparación de portaobjetos

5 Los bloques de parafina se seccionarán con un grosor de aproximadamente 3-5 micrómetros, se colocarán en un portaobjetos de vidrio, se teñirán con hematoxilina y eosina (H&E) y tricrómico de Masson y se cubrirán con una máquina automatizada. La evaluación histológica de todos los portaobjetos se realizará usando un microscopio óptico (Olympus BX60, n.º de serie 7D04032).

Se tomarán imágenes con un aumento de x4. La adquisición de imágenes se realizará solo en cambios patológicos y de animales representativos.

10 *Resultados:*

Se esperan resultados similares a los obtenidos en el Ejemplo 24, en donde la inyección separada e independiente de los componentes del relleno dérmico fotocurable puede proporcionar un mayor caso de inyección, por ejemplo, debido a la disminución de la viscosidad de los componentes en comparación con la mezcla de formulación.

15 Aunque los rellenos dérmicos, incluyendo los armazones promotores del crecimiento celular, y usos de los mismos se han descrito junto con aspectos específicos de la divulgación de los mismos, resulta evidente que muchas alternativas, y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una solución polimerizable que comprende:

- (i) un colágeno humano recombinante (rhColágeno) de tipo 1 de origen vegetal reticulable;
- (ii) un fotoiniciador; y
- (iii) un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos;

para su uso en un método terapéutico de aumento de tejido que comprende:

- (a) introducir una solución polimerizable en el espacio tisular debajo de una epidermis; y
- (b) aplicar luz a la superficie de la epidermis superficial a dicho espacio para inducir la polimerización.

2. La solución polimerizable para su uso de la reivindicación 1, en donde dichos componentes de la solución polimerizable se introducen en el espacio tisular juntos como una mezcla o de forma independiente aproximadamente en el mismo lugar y aproximadamente en el mismo momento, en donde, cuando se introducen en el espacio tisular de forma independiente, el rhColágeno y el fotoiniciador se introducen juntos e independientemente de: dicho ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, dicho poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, dicho polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o dicho modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o dicho derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o dicho derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o dicho derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o dicho derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o dicho derivado modificado de la misma, o dicha combinación de los mismos, se introducen en el espacio tisular de forma independiente aproximadamente al mismo tiempo.

3. La solución polimerizable para su uso de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho método terapéutico incluye además una etapa de moldeo o esculpido de la solución polimerizable o los componentes de la solución polimerizable, en una configuración deseada en el espacio tisular, en donde dicha etapa es concomitante con, o posterior a, la etapa de aplicación de luz, y en donde la etapa de moldeo o esculpido reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o una combinación de los mismos.

4. La solución polimerizable para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde

- (a) el rhColágeno es un rhColágeno con metacrilato o tiolato; o
- (b) el derivado modificado de ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprende un derivado con metacrilato o tiolato; o
- (c) el ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprenden un ácido hialurónico (HA) reticulado, poli(alcohol vinílico) (PVA) reticulado, polietilenglicol (PEG) reticulado, celulosa oxidada (OC) reticulada, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado, fosfato de tricalcio (TCP) reticulado, hidroxiapatita de calcio (CaHA) reticulada, carboximetilcelulosa reticulada o nanocelulosa cristalina (CNC) reticulada; o
- (d) una combinación de (a) y (b), o (a) y (c);

en donde, cuando se selecciona rhColágeno con metacrilato y cuando se selecciona ácido hialurónico o un derivado del mismo o ácido hialurónico reticulado o un derivado reticulado de ácido hialurónico, la relación de HA o el derivado del mismo o el HA reticulado o el derivado del HA reticulado con respecto a rhColágeno con metacrilato es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

5. Un uso no terapéutico de una solución polimerizable que comprende:

- (i) un colágeno humano recombinante (rhColágeno) de tipo 1 de origen vegetal reticulable;
- (ii) un fotoiniciador; y
- (iii) un ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, un poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, un polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o un derivado modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o un derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o un derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o un derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o un derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o un derivado modificado de la misma, o una combinación de los mismos;

en donde dicho uso no terapéutico es en un método cosmético de aumento de tejido que comprende:

- (a) introducir una solución polimerizable en el espacio tisular debajo de una epidermis; y
- (b) aplicar luz a la superficie de la epidermis superficial a dicho espacio para inducir la polimerización.

6. El uso no terapéutico de la reivindicación 5, en donde dichos componentes de la solución polimerizable se introducen en el espacio tisular juntos como una mezcla o de forma independiente aproximadamente en el mismo lugar y aproximadamente en el mismo momento, en donde, cuando se introducen en el espacio tisular de forma independiente, el rhColágeno y el fotoiniciador se introducen juntos e independientemente de: dicho ácido hialurónico (HA) o un derivado modificado del mismo, dicho poli(alcohol vinílico) (PVA) o un derivado modificado del mismo, dicho polietilenglicol (PEG) o un derivado modificado del mismo, celulosa oxidada (OC) o dicho modificado de la misma, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) o dicho derivado modificado de las mismas, fosfato de tricalcio (TCP) o dicho derivado modificado del mismo, hidroxiapatita de calcio (CaHA) o dicho derivado modificado de la misma, carboximetilcelulosa o dicho derivado modificado de la misma, nanocelulosa cristalina (CNC) o dicho derivado modificado de la misma, o dicha combinación de los mismos, se introducen en el espacio tisular de forma independiente aproximadamente al mismo tiempo.

7. El uso no terapéutico de la reivindicación 5 o 6, en donde dicho método cosmético incluye además una etapa de moldeado o esculpido de la solución polimerizable o los componentes de la solución polimerizable, en una configuración deseada en el espacio tisular, en donde dicha etapa es concomitante con, o posterior a, la etapa de aplicación de luz, y en donde la etapa de moldeado o esculpido reduce líneas, pliegues, líneas finas, arrugas o cicatrices, o una combinación de los mismos.

8. El uso no terapéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en donde

- (a) el rhColágeno es un rhColágeno con metacrilato o tiolato; o
- (b) el derivado modificado de ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprende un derivado con metacrilato o tiolato; o
- (c) el ácido hialurónico (HA), poli(alcohol vinílico) (PVA), polietilenglicol (PEG), celulosa oxidada (OC), microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), fosfato de tricalcio (TCP), hidroxiapatita de calcio (CaHA), carboximetilcelulosa o nanocelulosa cristalina (CNC) comprenden un ácido hialurónico (HA) reticulado, poli(alcohol vinílico) (PVA) reticulado, polietilenglicol (PEG) reticulado, celulosa oxidada (OC) reticulada, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA) reticulado, fosfato de tricalcio (TCP) reticulado, hidroxiapatita de calcio (CaHA) reticulada, carboximetilcelulosa reticulada o nanocelulosa cristalina (CNC) reticulada; o
- (d) una combinación de (a) y (b), o (a) y (c);

en donde, cuando se selecciona rhColágeno con metacrilato y cuando se selecciona ácido hialurónico o un derivado del mismo o ácido hialurónico reticulado o un derivado reticulado de ácido hialurónico, la relación de HA o el derivado del mismo o el HA reticulado o el derivado del HA reticulado con respecto a rhColágeno con metacrilato es 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 o 0:1.

Esquema de clonación

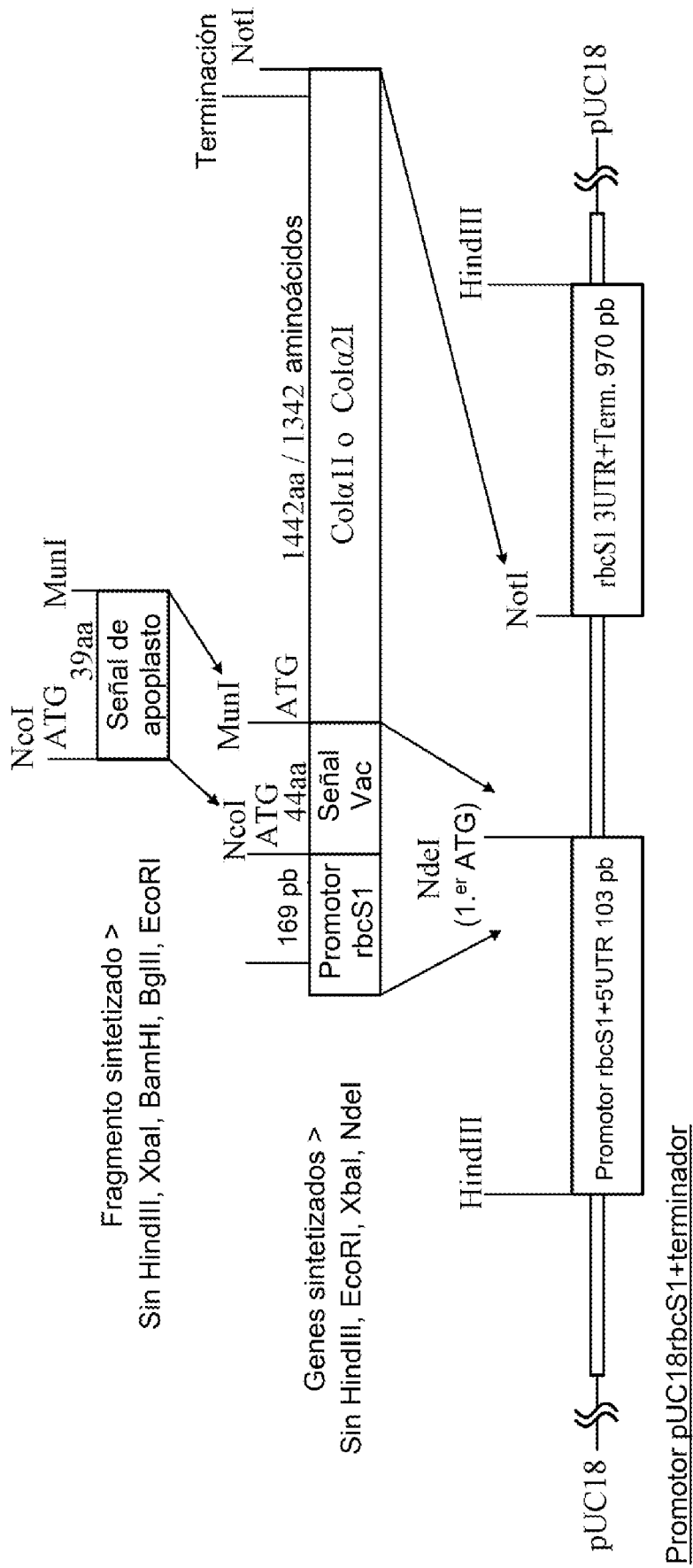


Fig. 1a

Esquema de clonación

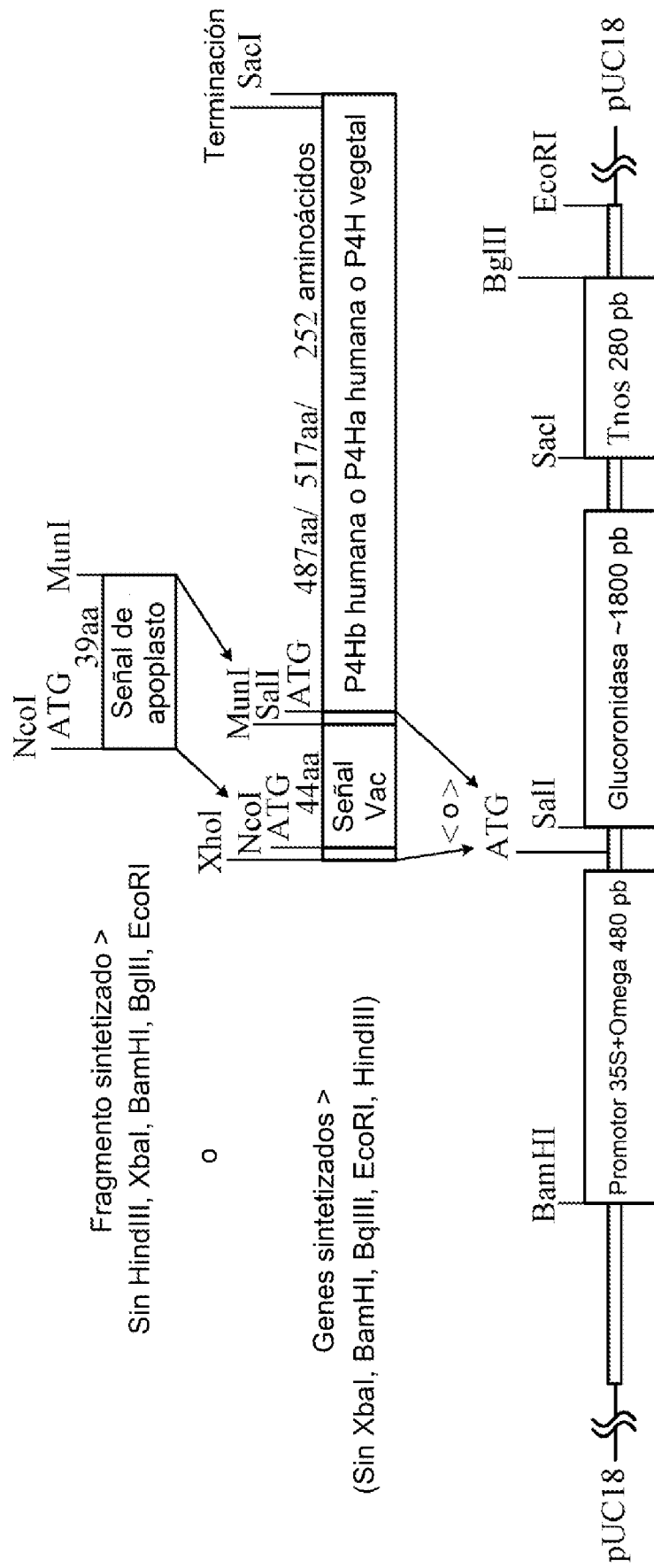


Fig. 1b

Esquema de clonación

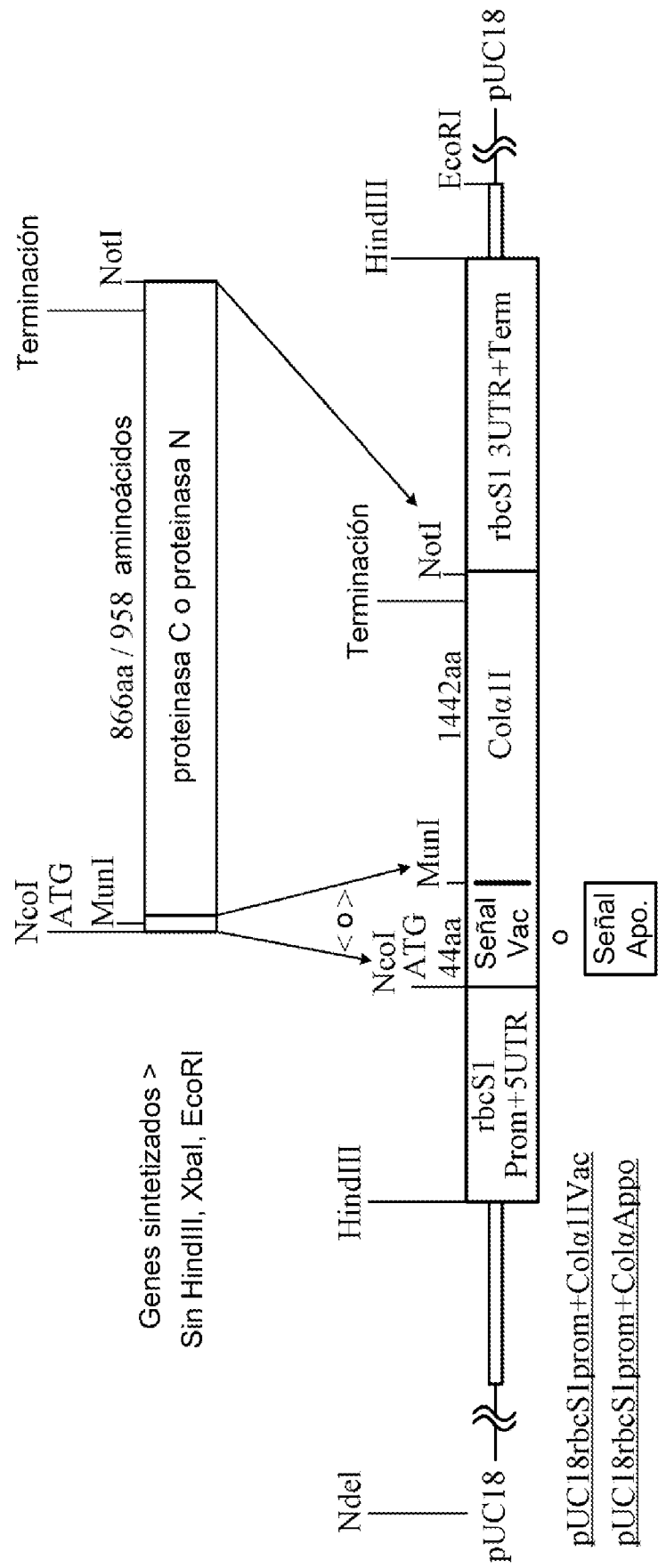


Fig. 1c

Esquema de clonación

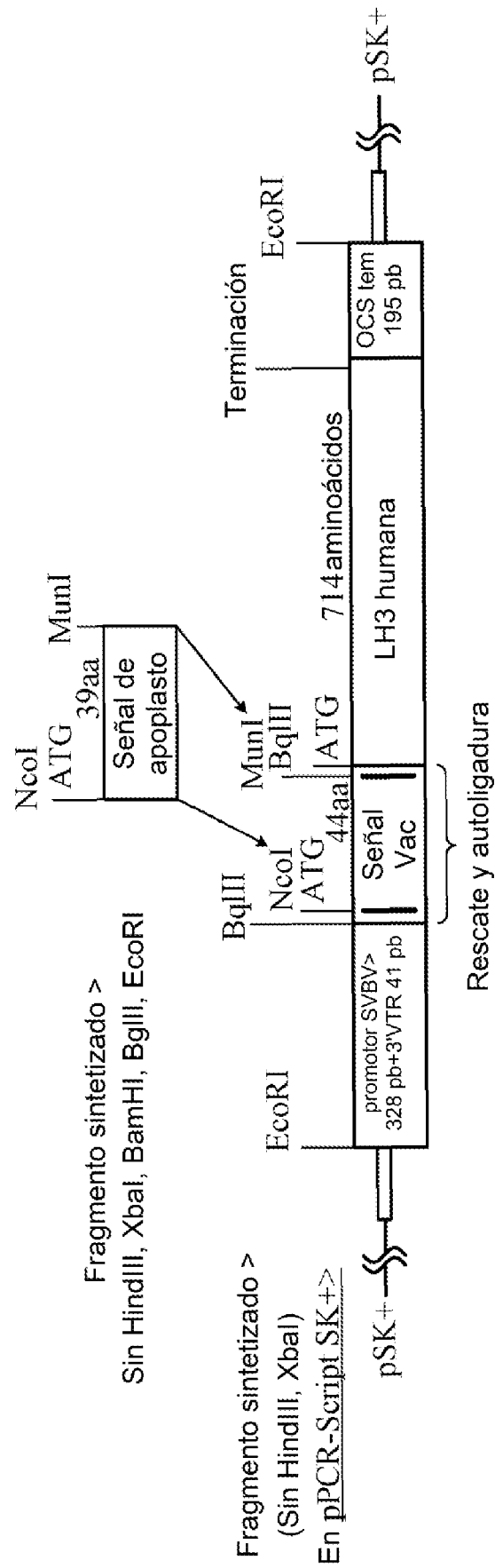


Fig. 1d

Vacuola		Citoplasma		Apoplasma	
2	Cole a1 (I)	1	Cole a1 (I)	7	Cole a1 (I)
	Cole a2 (I)		Cole a2 (I)		Cole a2 (I)
3	Cole a1 (I) P4Hb	5	Cole a1 (I) P4Hb	8	Cole a1 (I) P4Hb
	Cole a2 (I) P4Ha		Cole a2 (I) P4Ha		Cole a2 (I) P4Ha
4	Cole a1 (I) P4Hb	6	Cole a1 (I) P4Hb	9	Cole a1 (I) P4Hb
	Cole a2 (I) P4H vegetal		Cole a2 (I) P4H vegetal		Cole a2 (I) P4H vegetal
10	Proteasa C	11	Proteasa C	12	Proteasa C
	Proteasa N		Proteasa N		Proteasa N
13	Cole a1 (I) P4Hb LH3	14	Cole a1 (I) P4Hb LH3	15	Cole a1 (I) P4Hb LH3
	Cole a2 (I) P4Ha		Cole a2 (I) P4Ha		Cole a2 (I) P4Ha
20	P4Hb LH3			21	P4Hb LH3
	P4Ha				P4Ha

Fig. 2

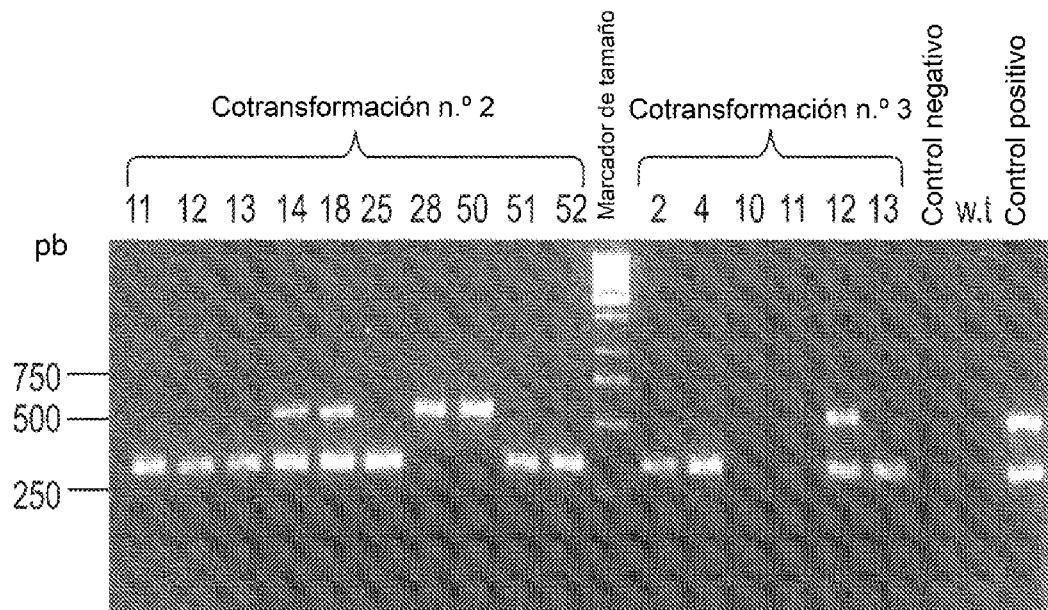


Fig. 3

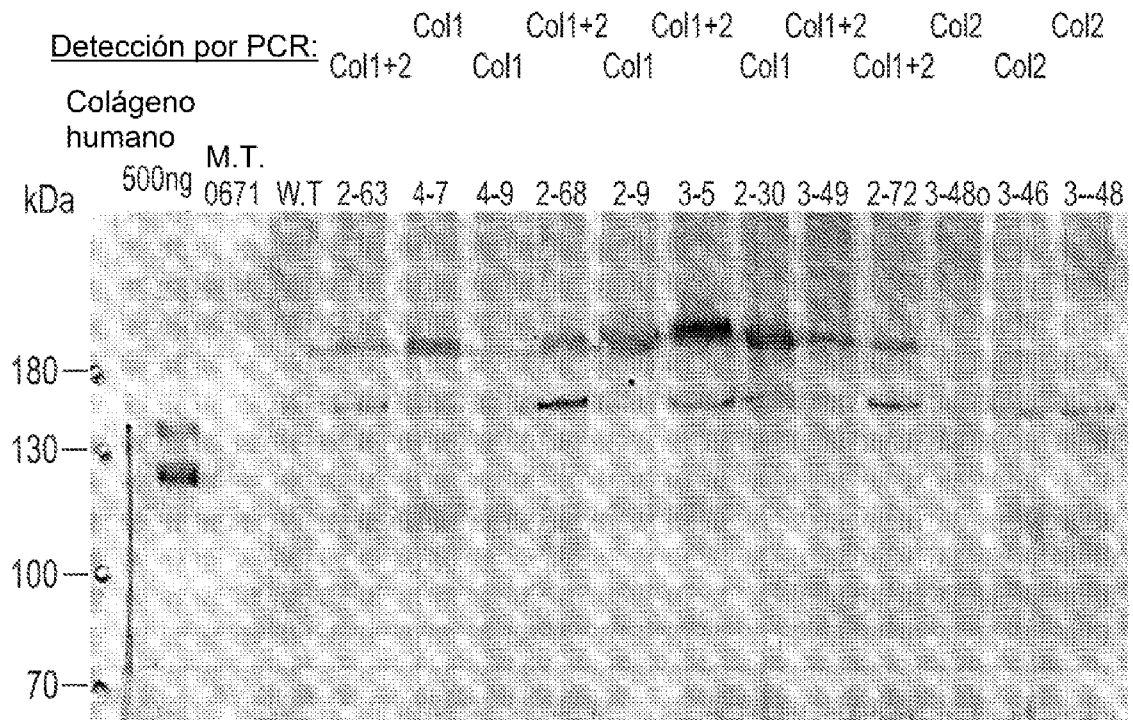


Fig. 4

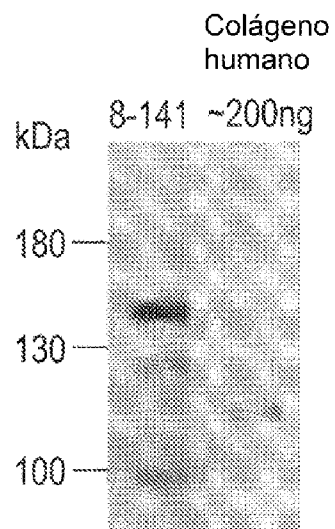


Fig. 5

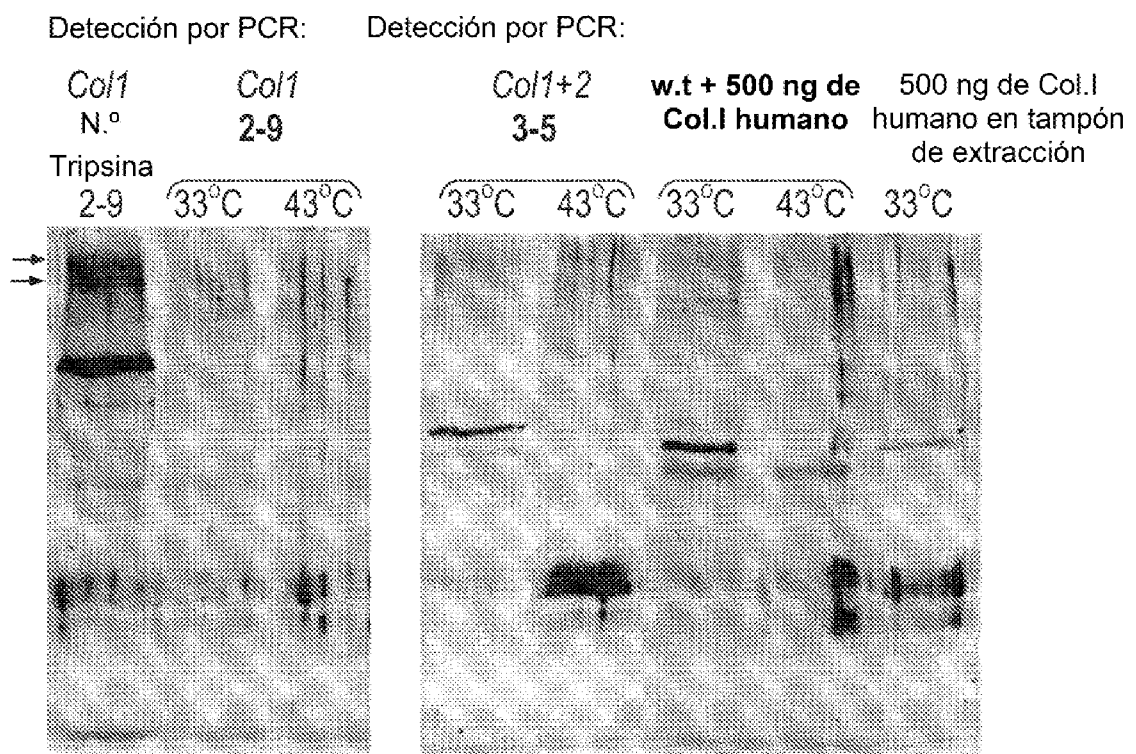


Fig. 6a

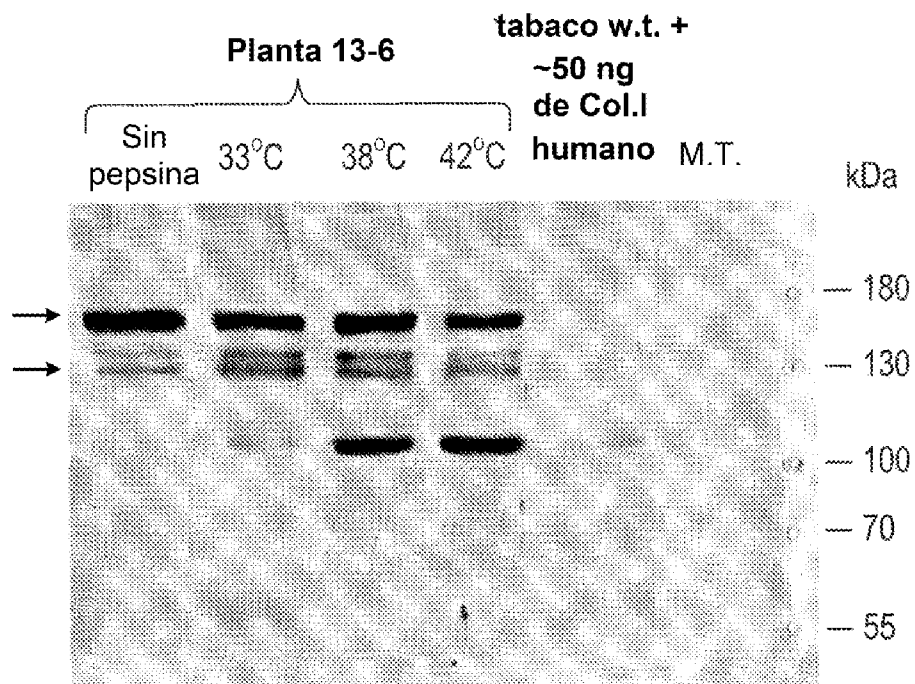


Fig. 6b

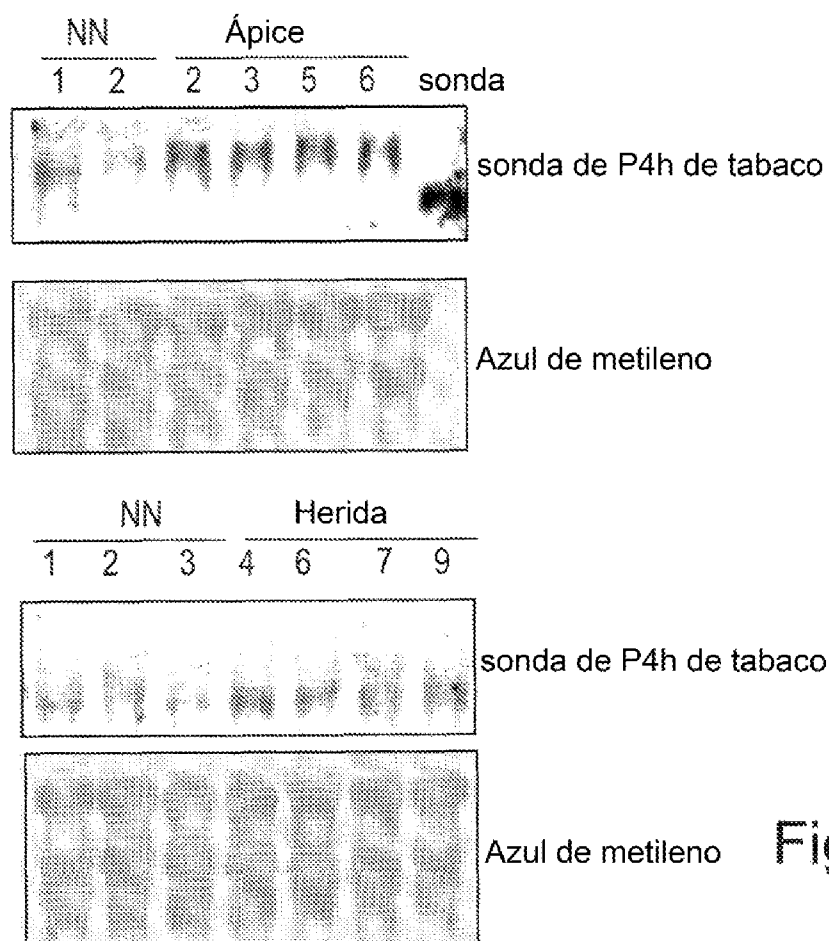


Fig. 7

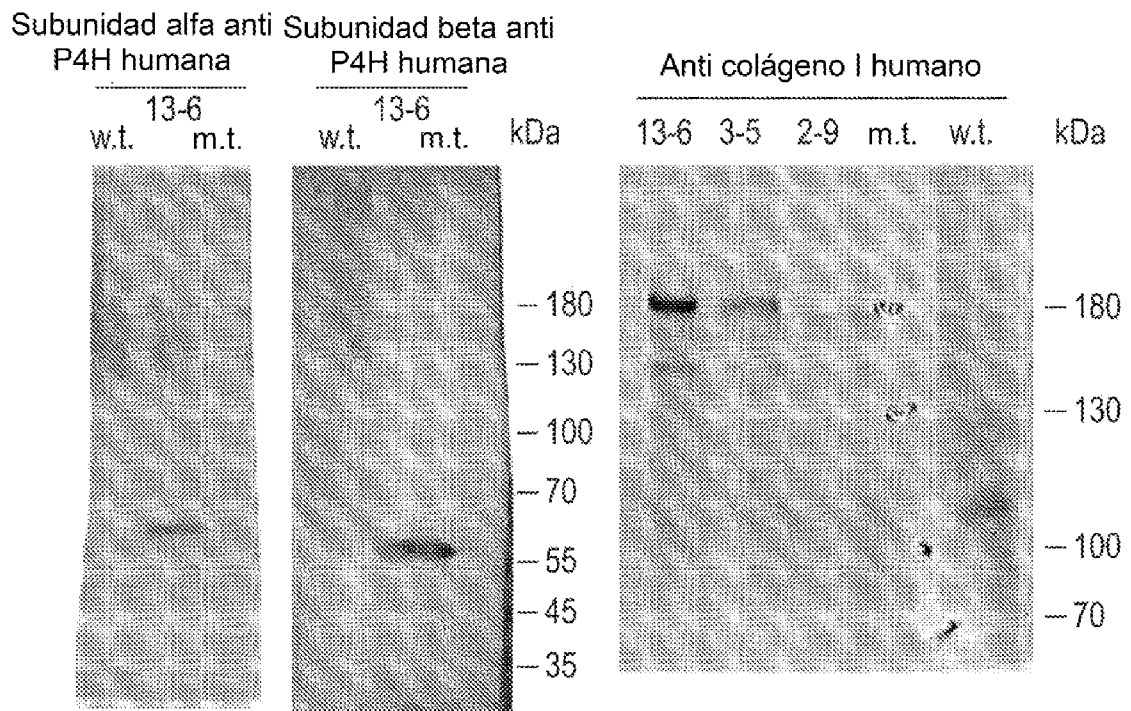
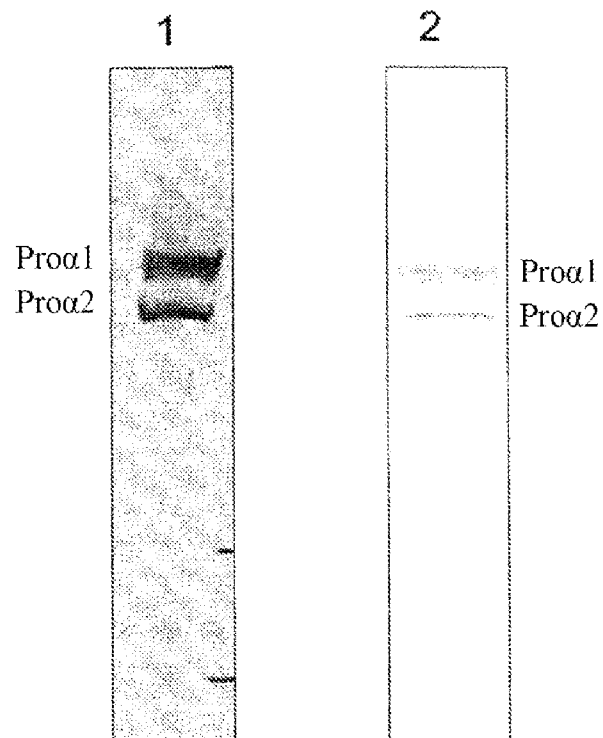


Fig. 8

Fig. 9



1 2 M.T. cerdo

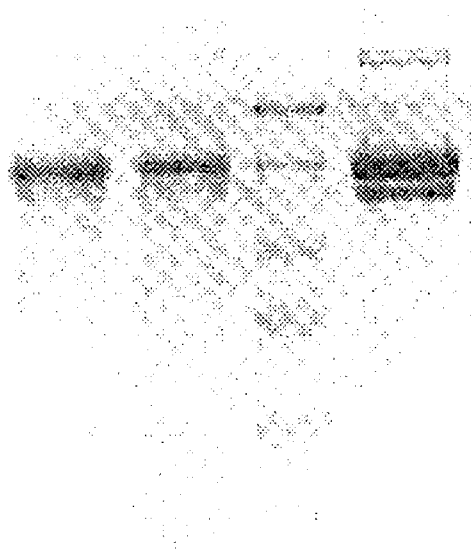


Fig. 10

M.T. cerdo 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 cerdo

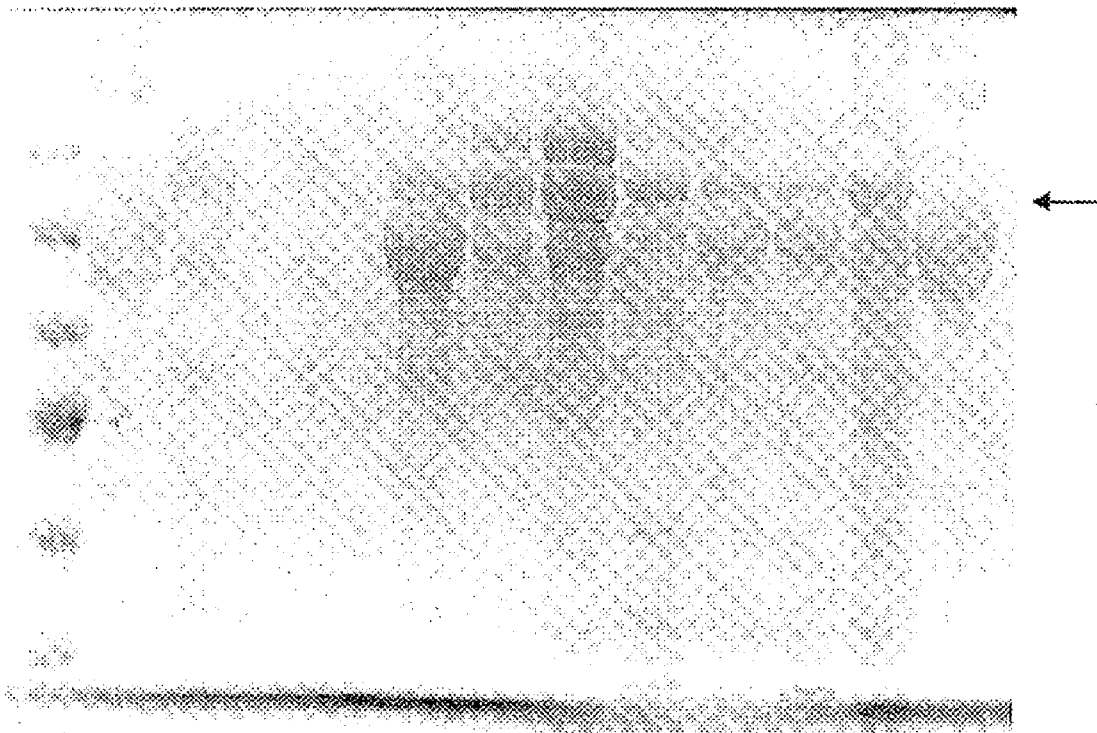


Fig. 11

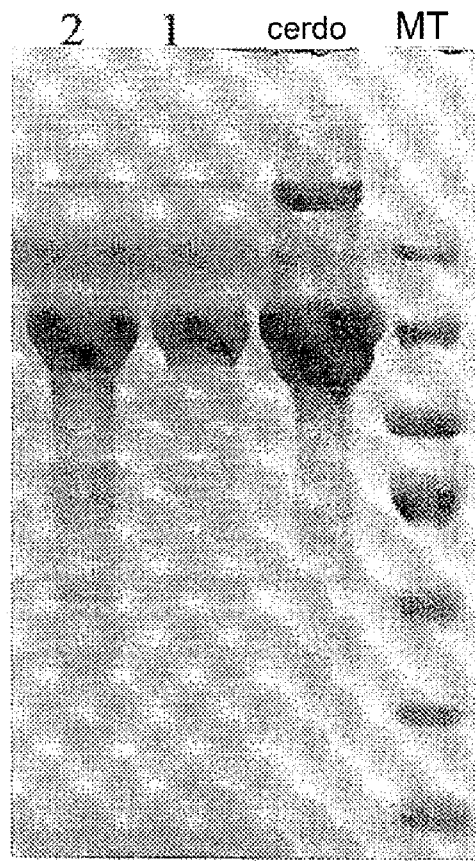


Fig. 12

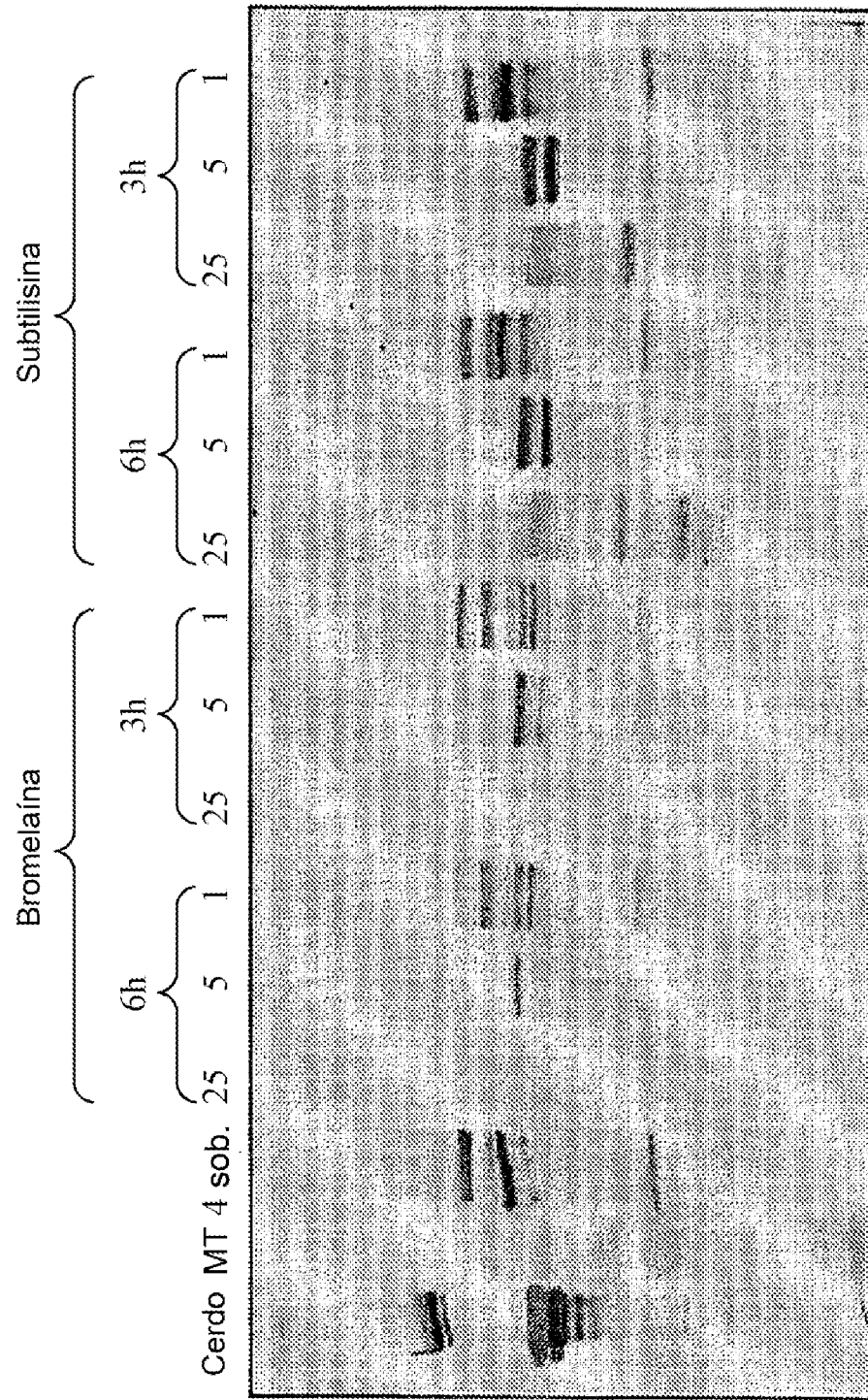


Fig. 13

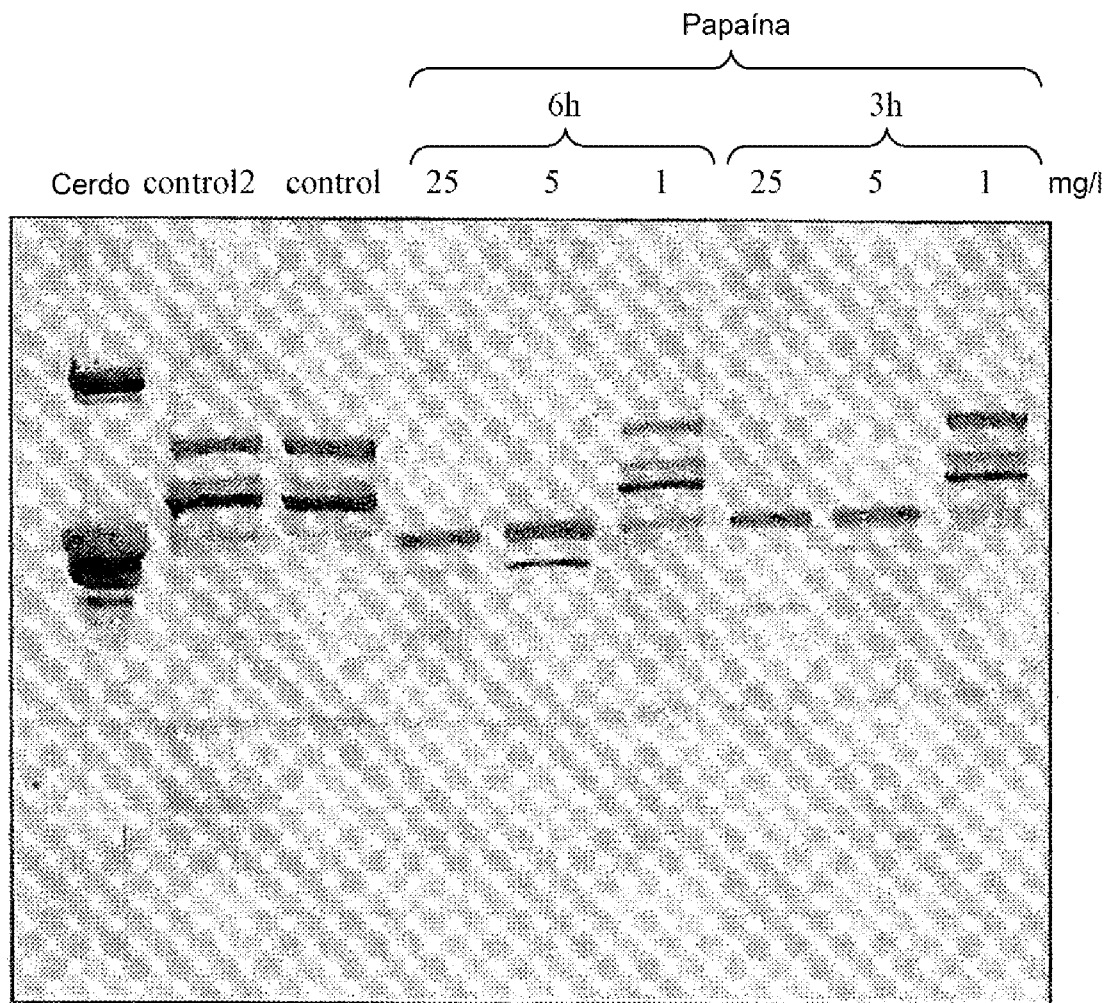


Fig. 14

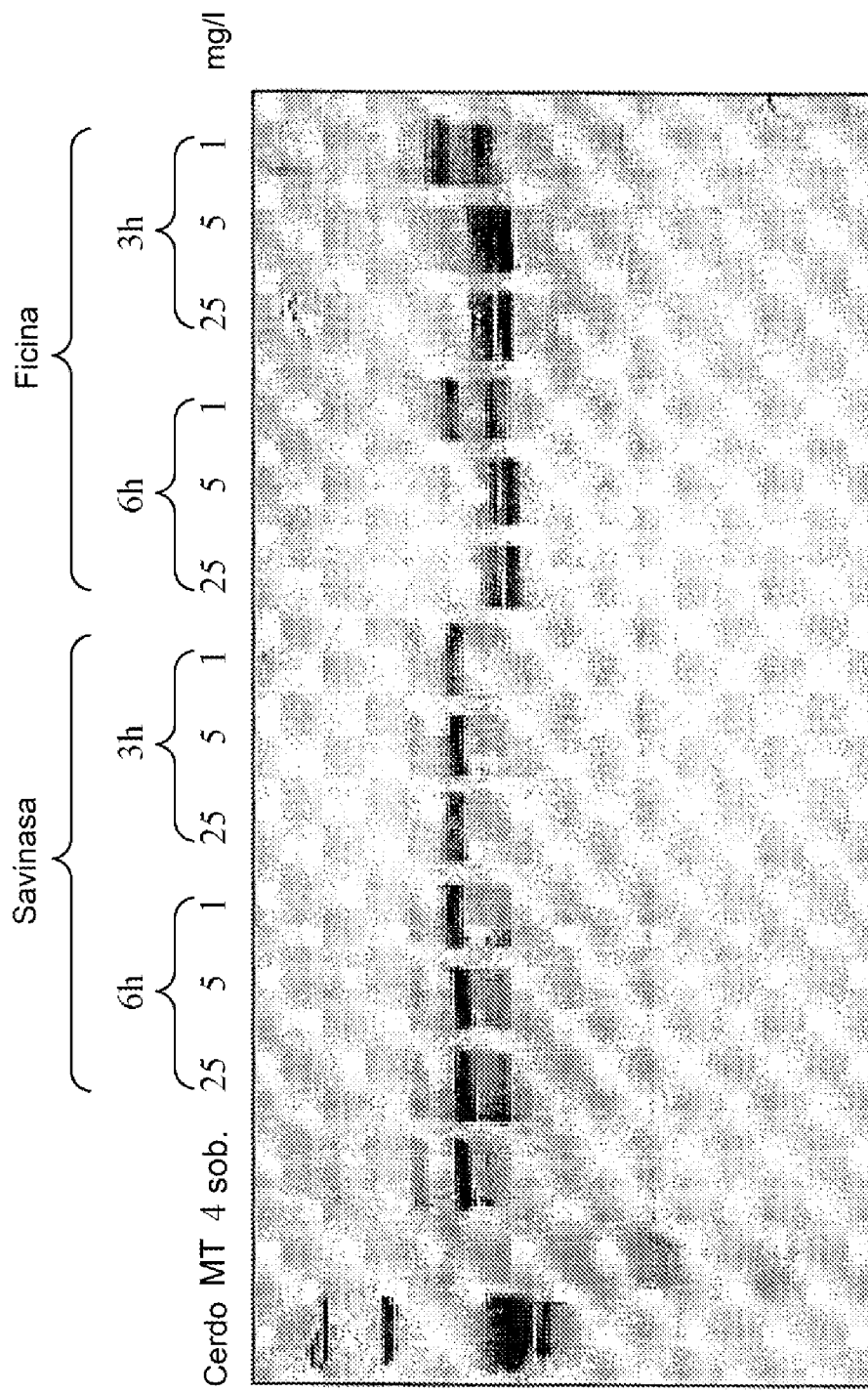


Fig. 15

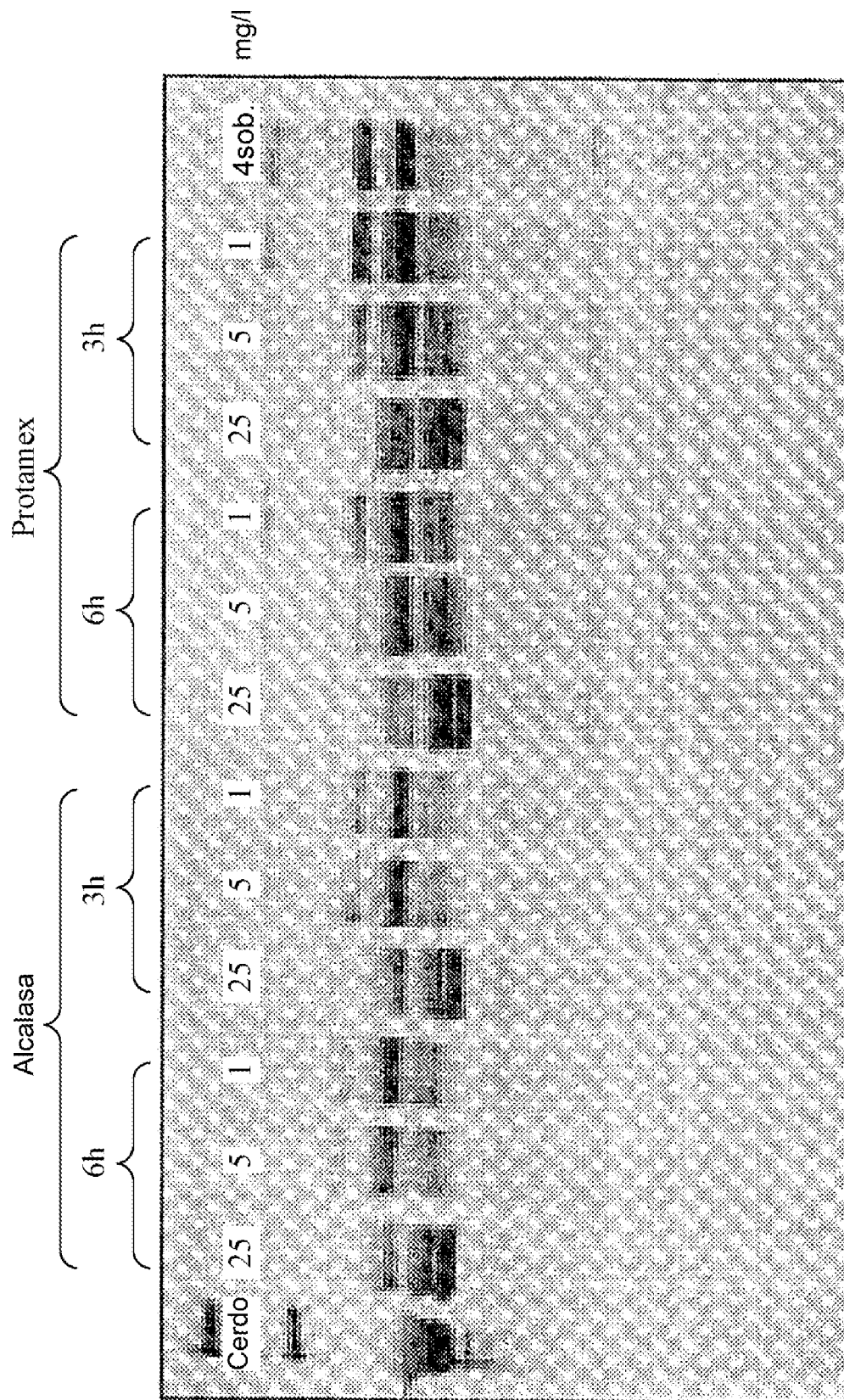


Fig. 16

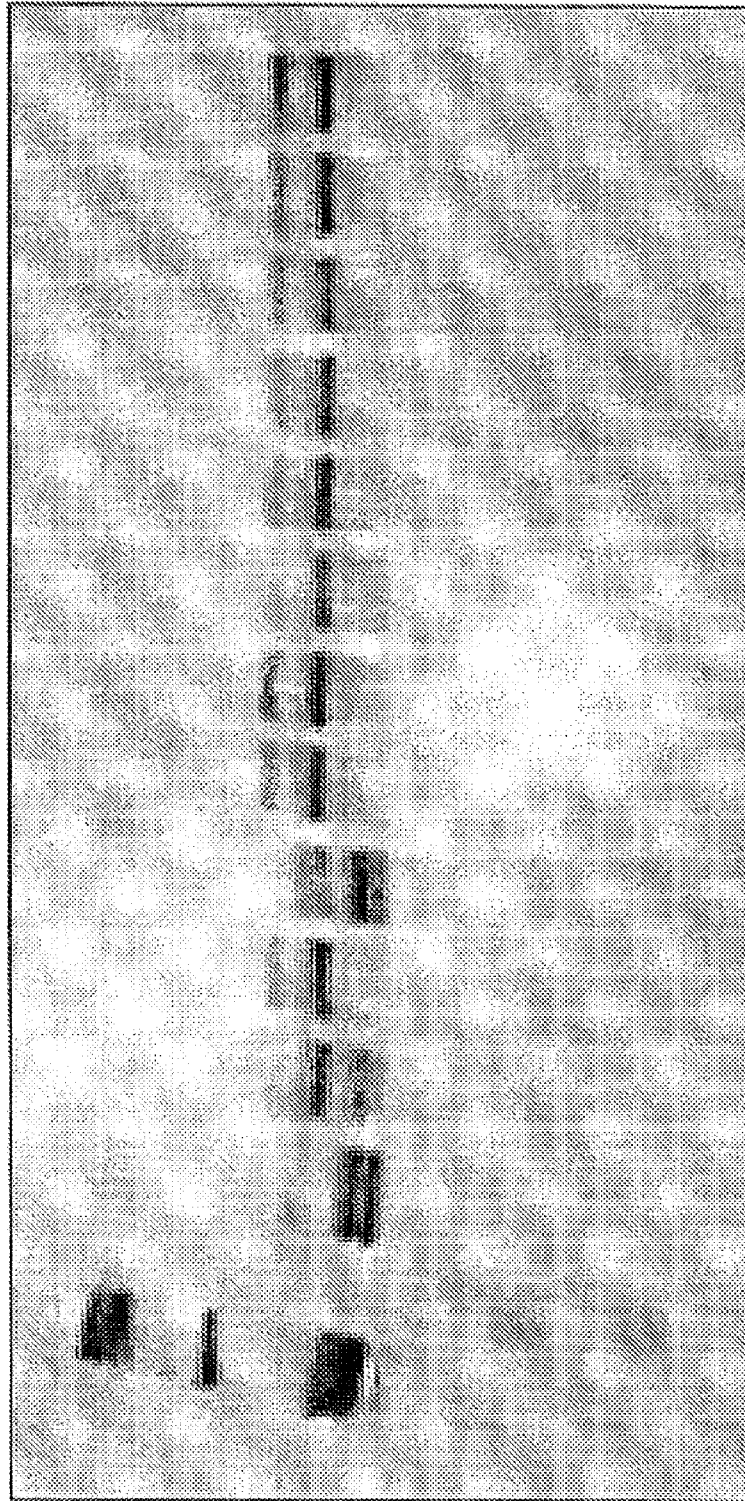
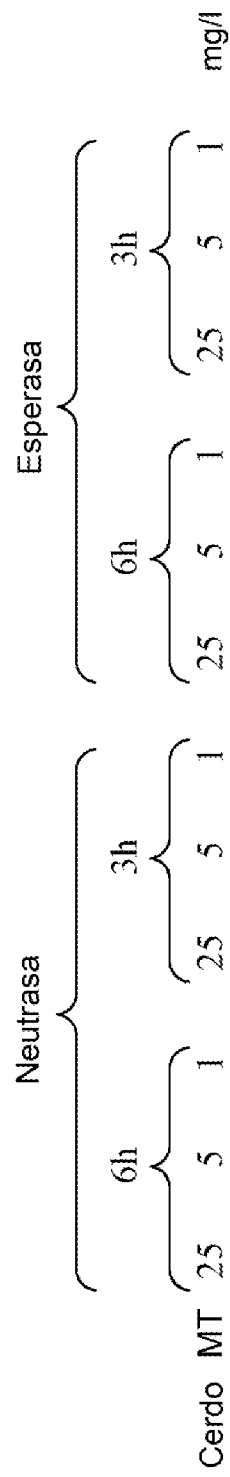


Fig. 17

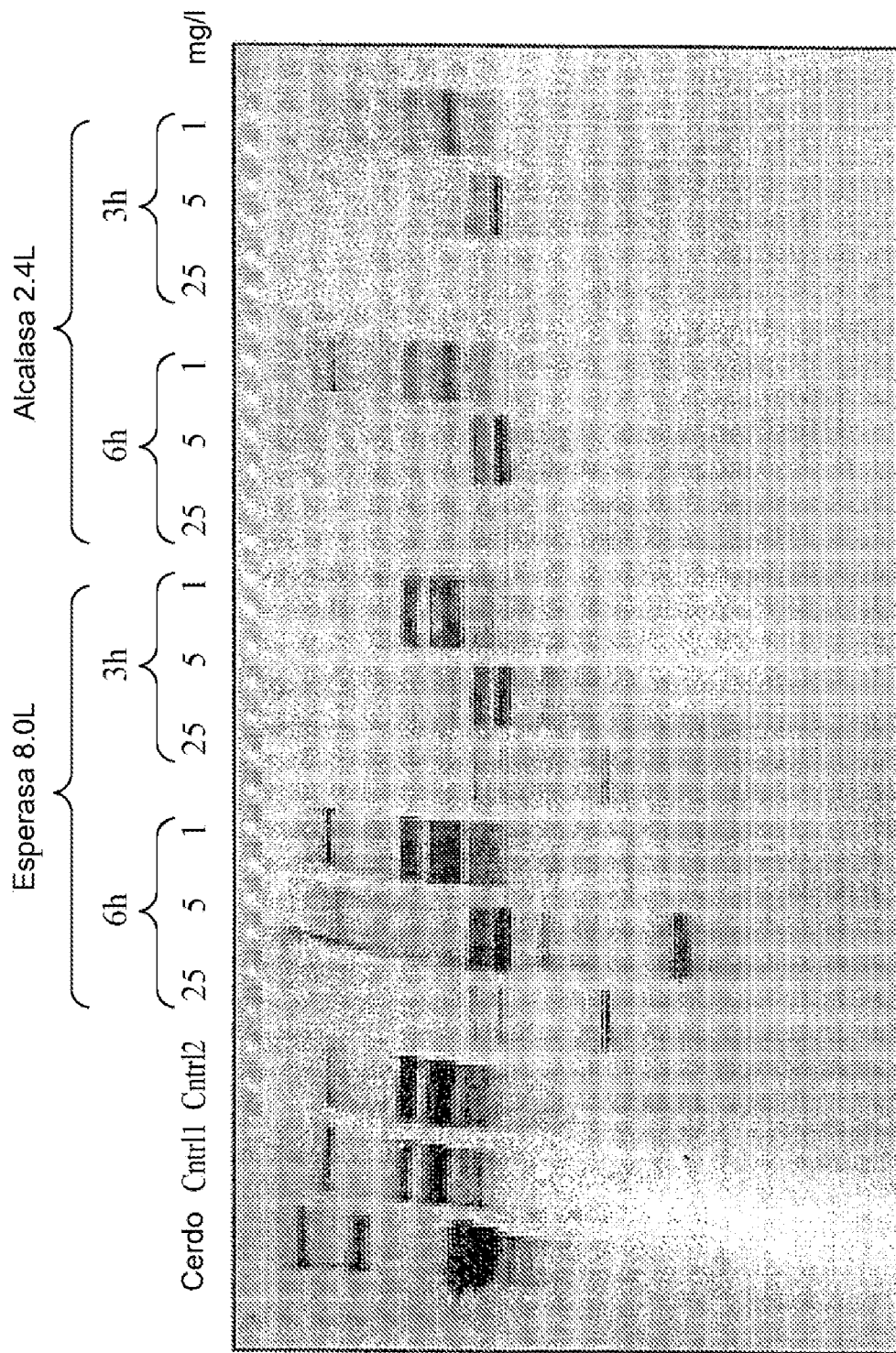


Fig. 18

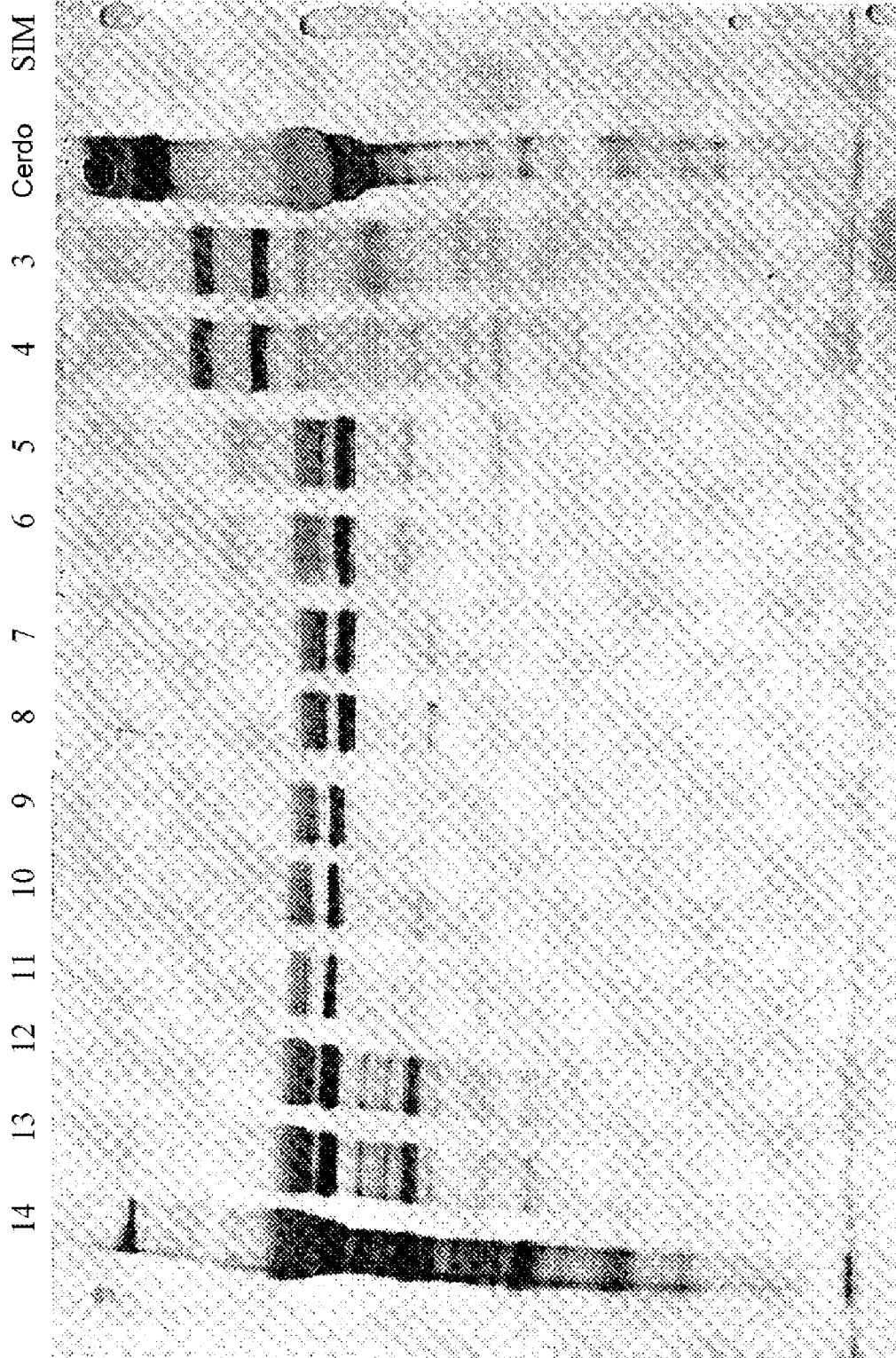


Fig. 19

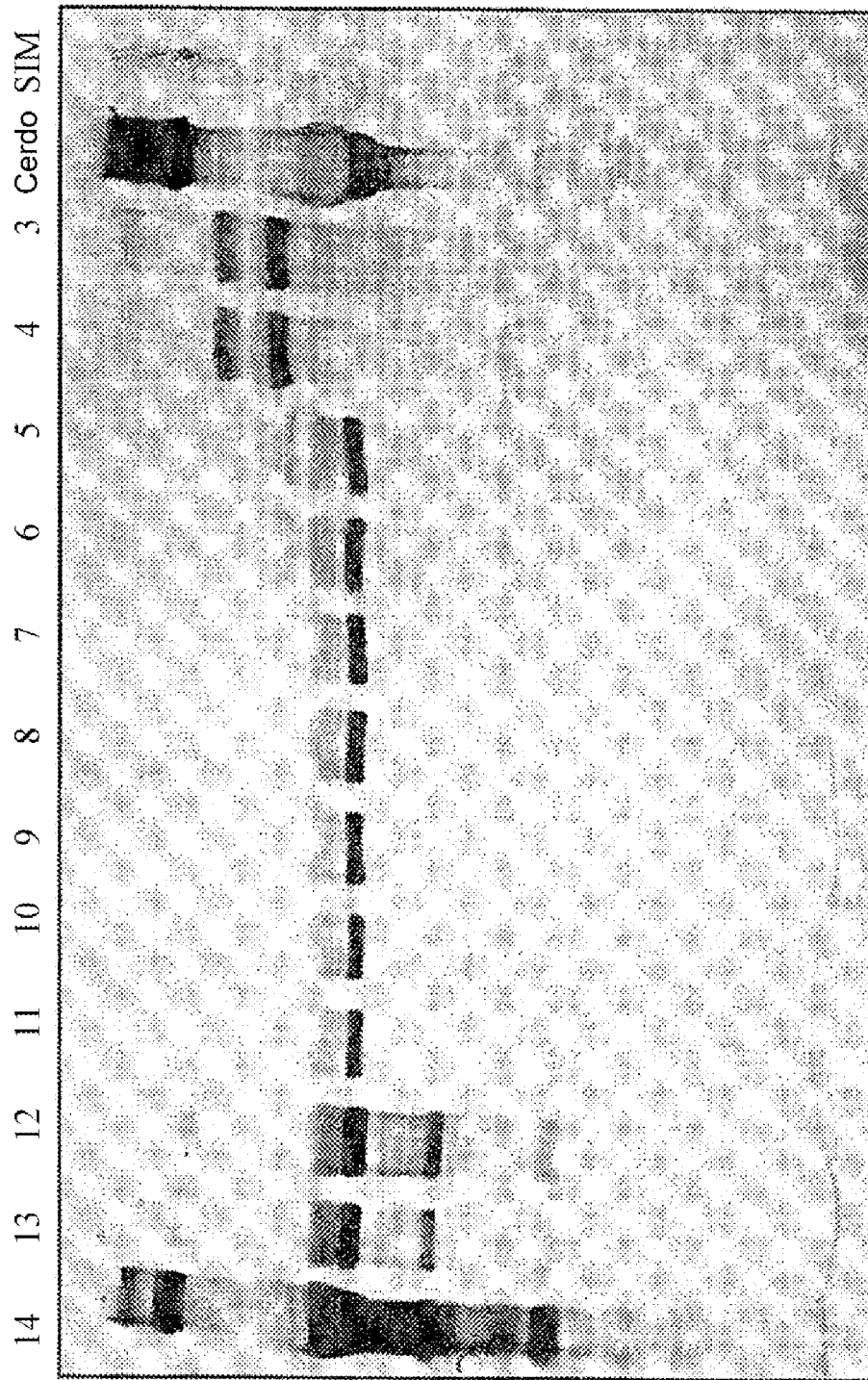


Fig. 20

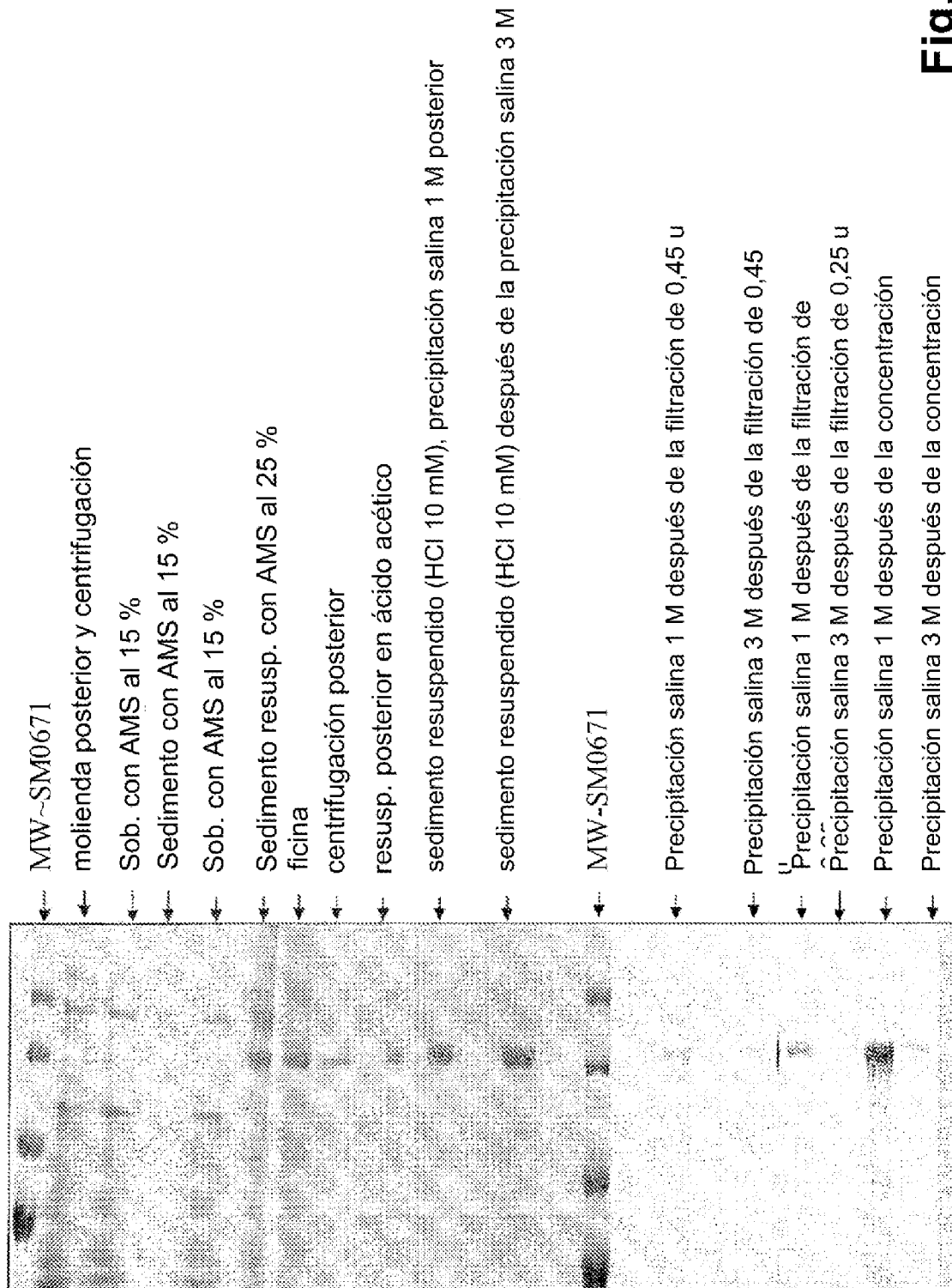


Fig. 21

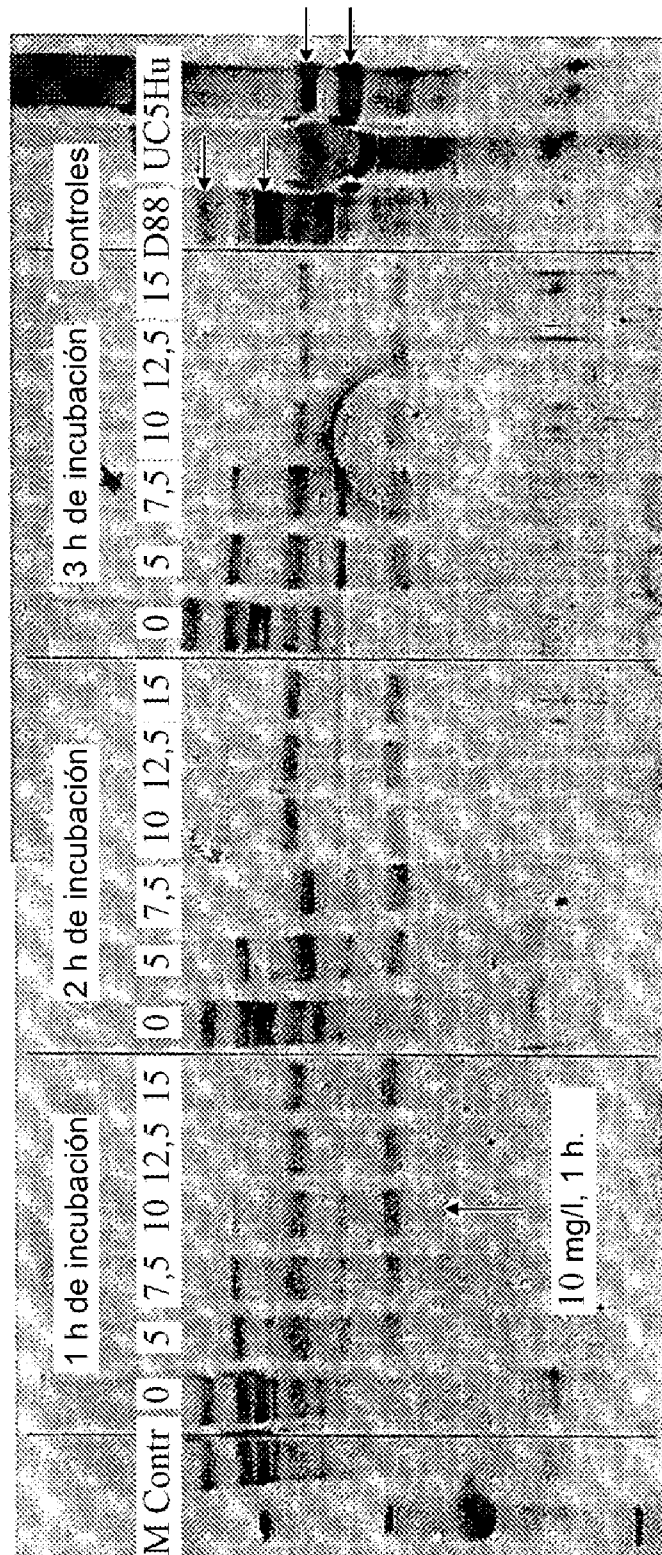


Fig. 22

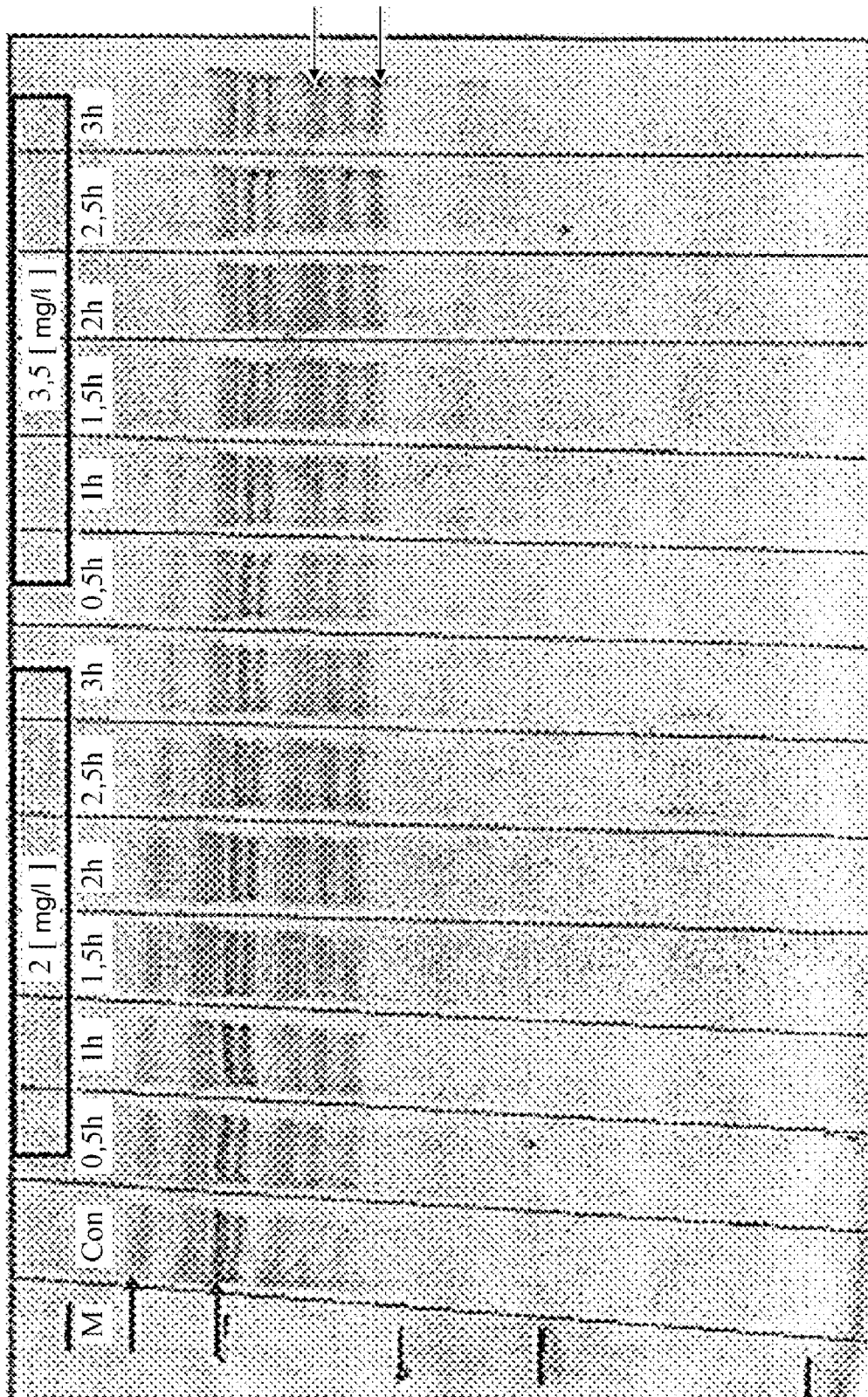


Fig. 23A

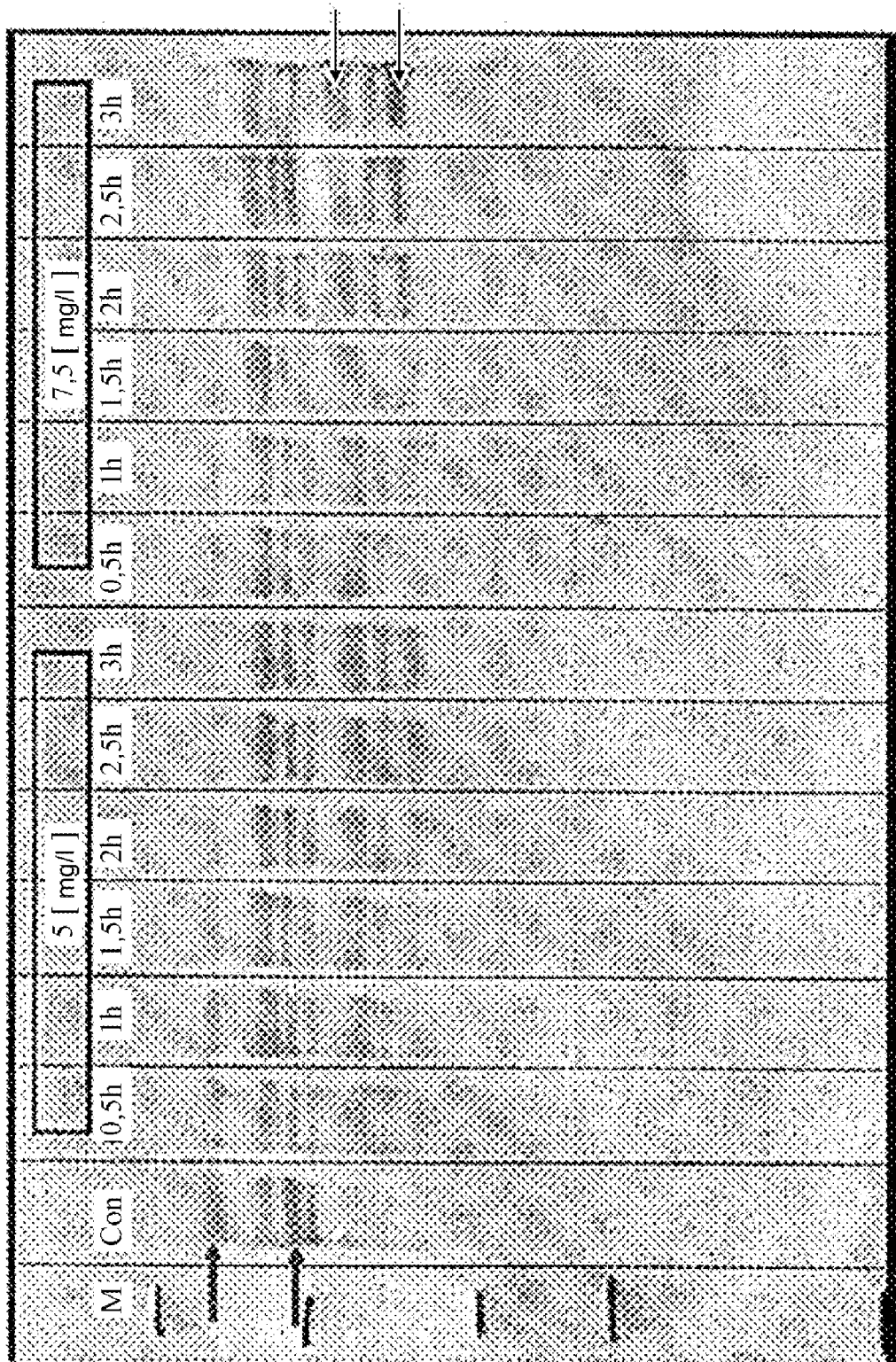


Fig. 23B

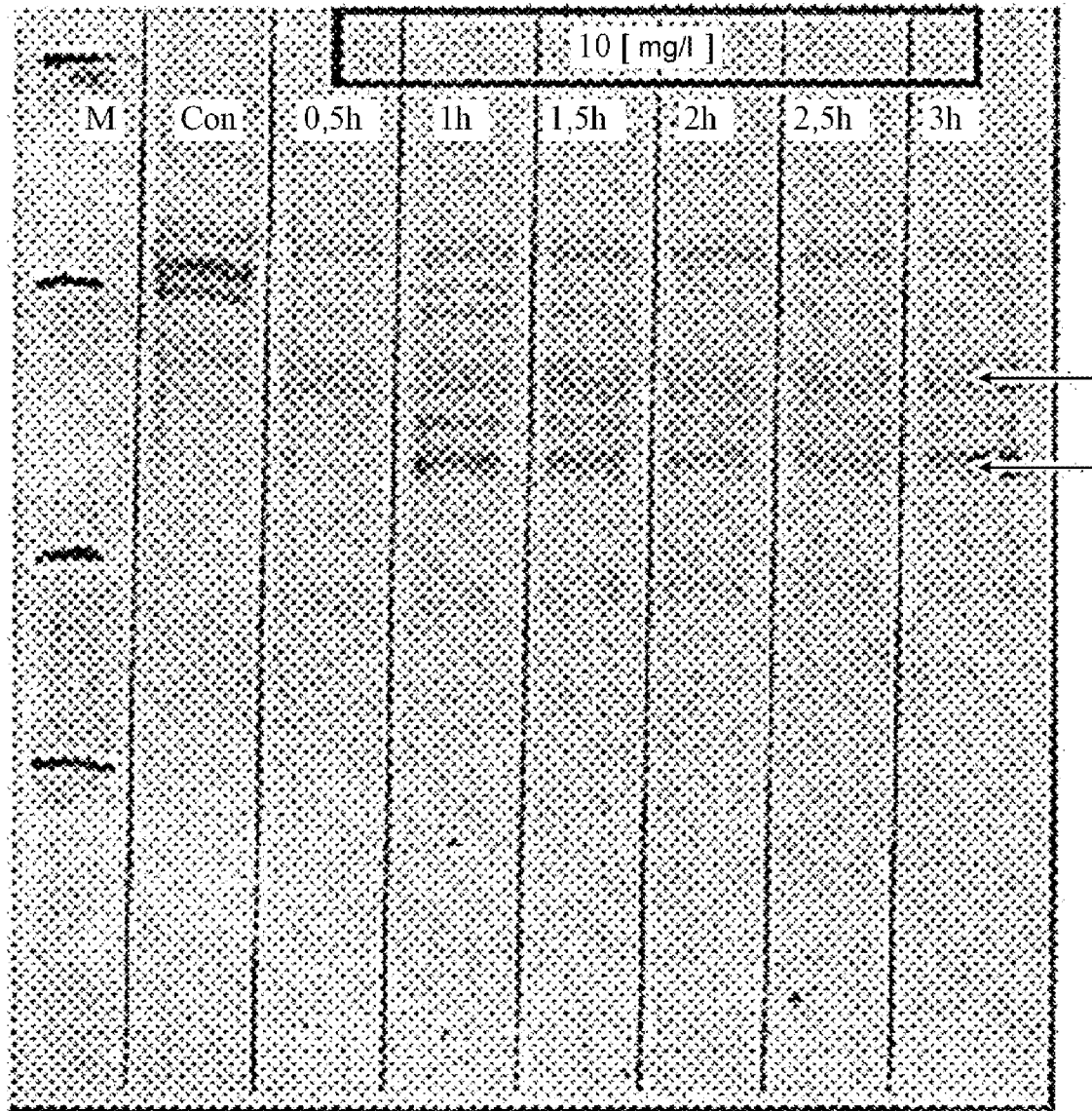


Fig. 23C

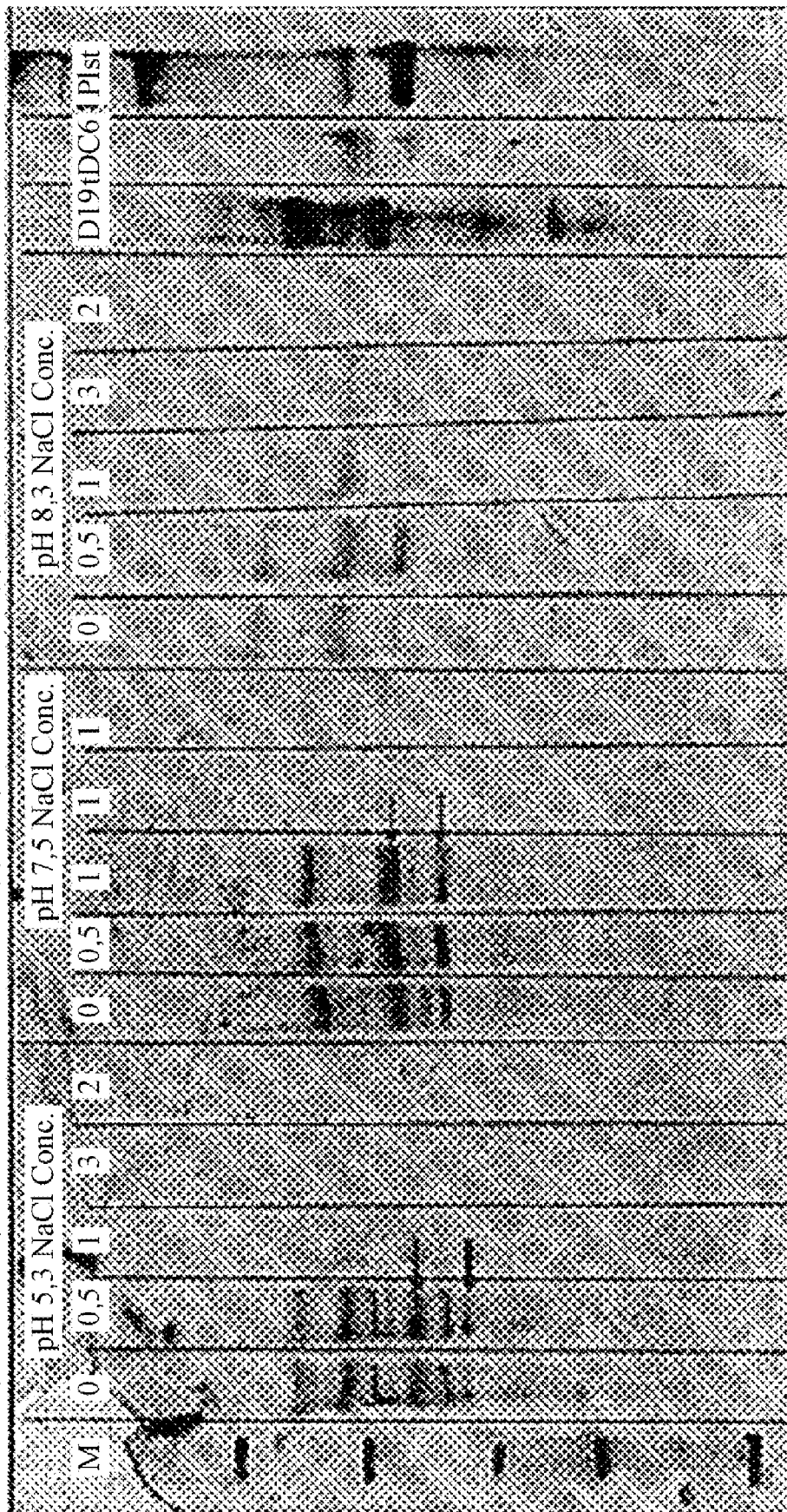


Fig. 24A

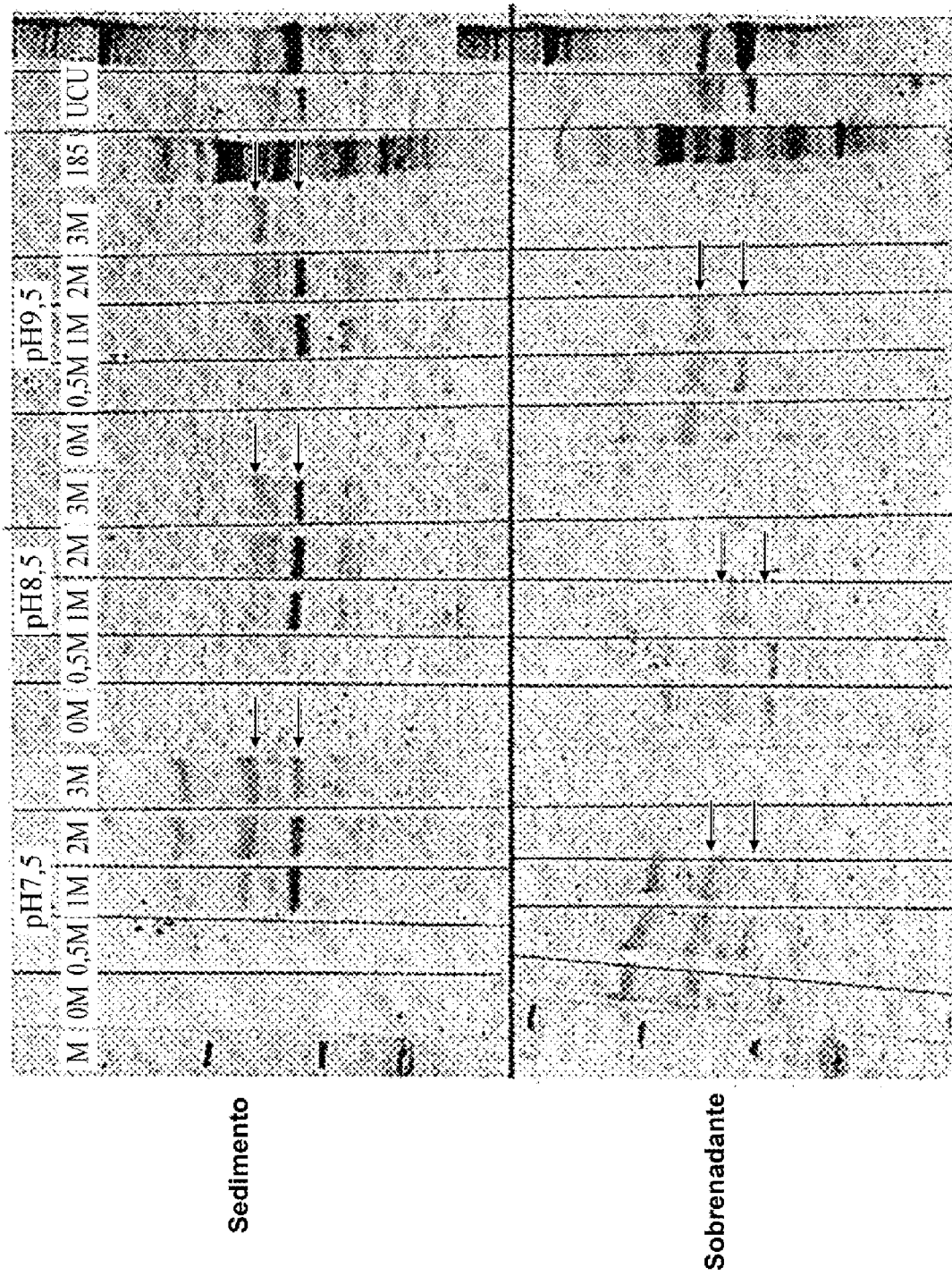


Fig. 24B

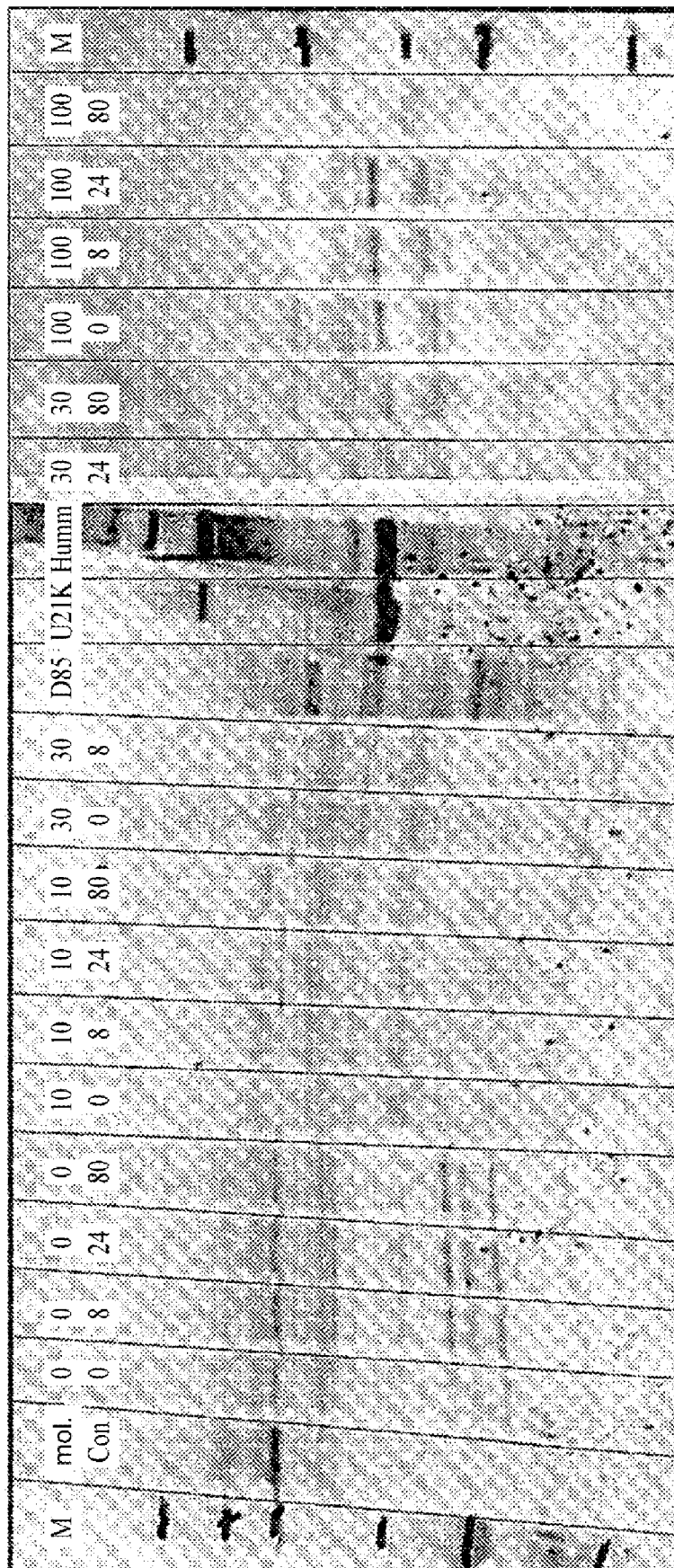


Fig. 25

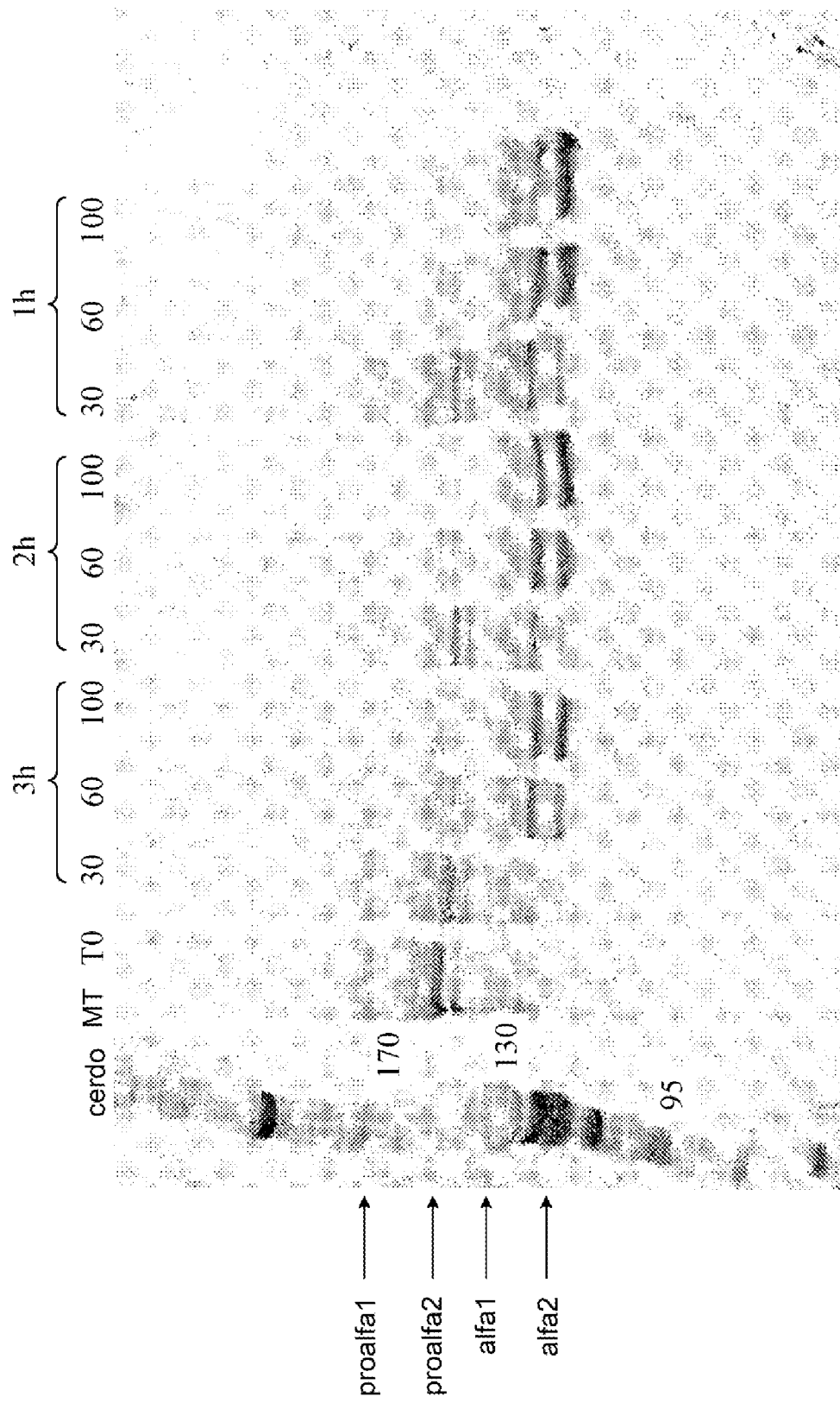


Fig. 26

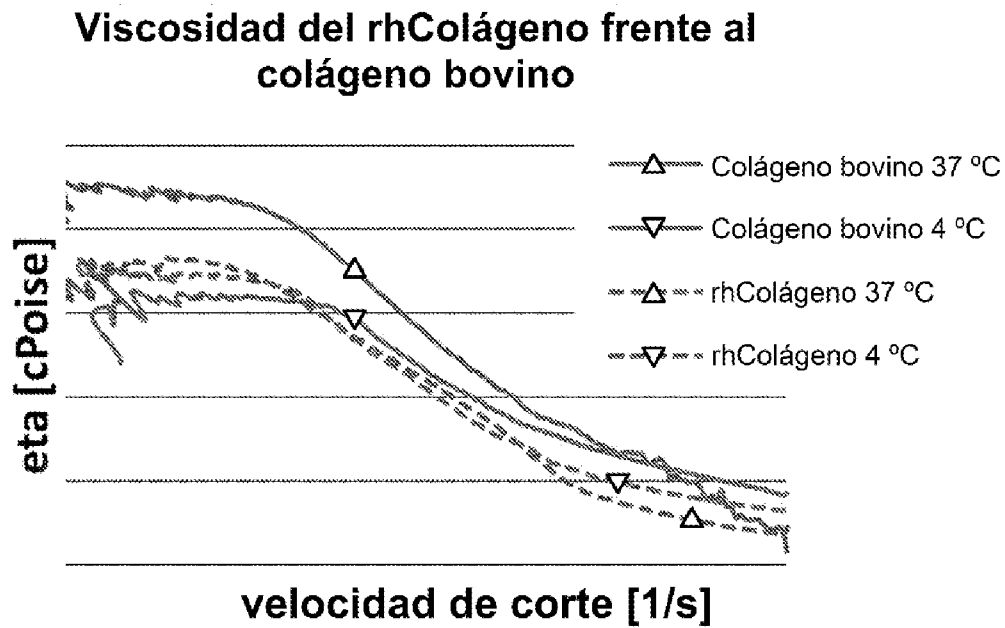


Fig. 27

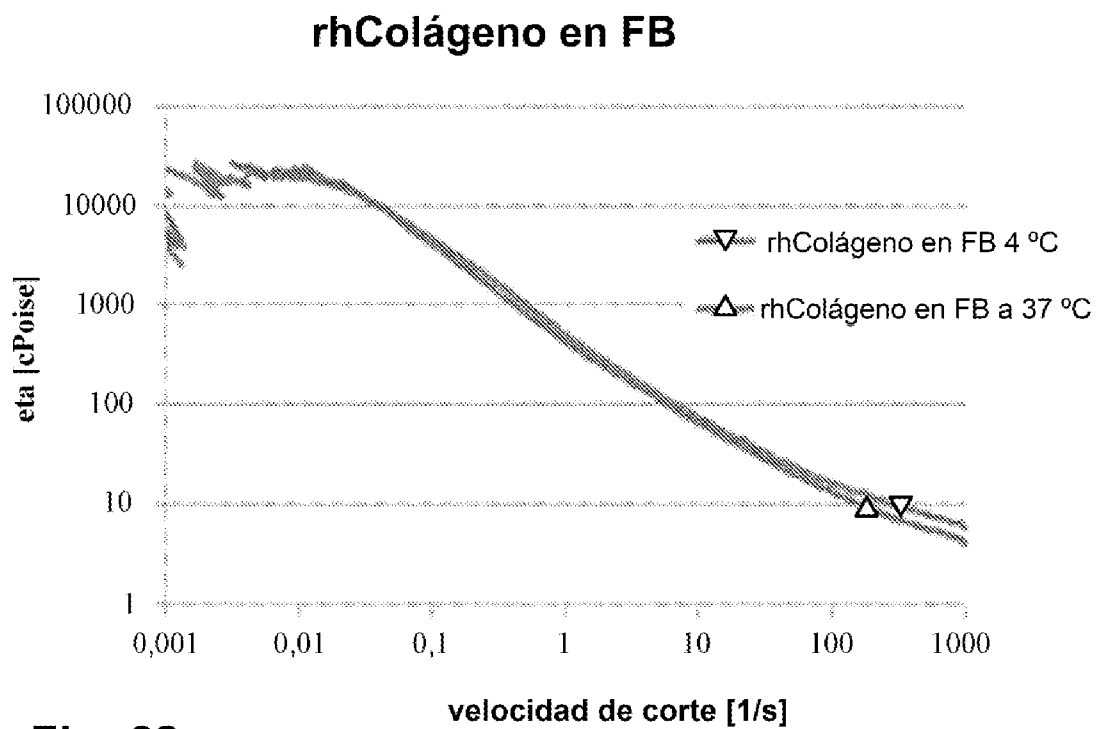


Fig. 28

Dependencia de rhColágeno-MA-T

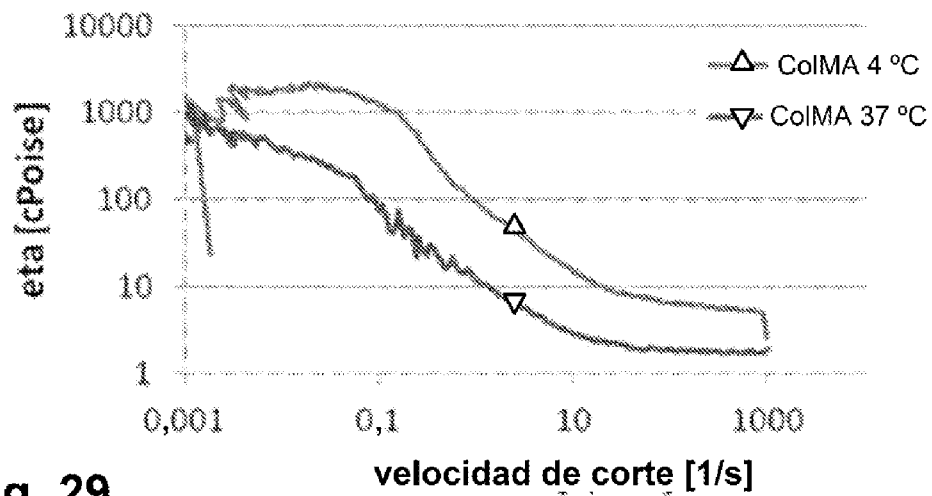


Fig. 29

Viscosidad del rhColágeno-MA

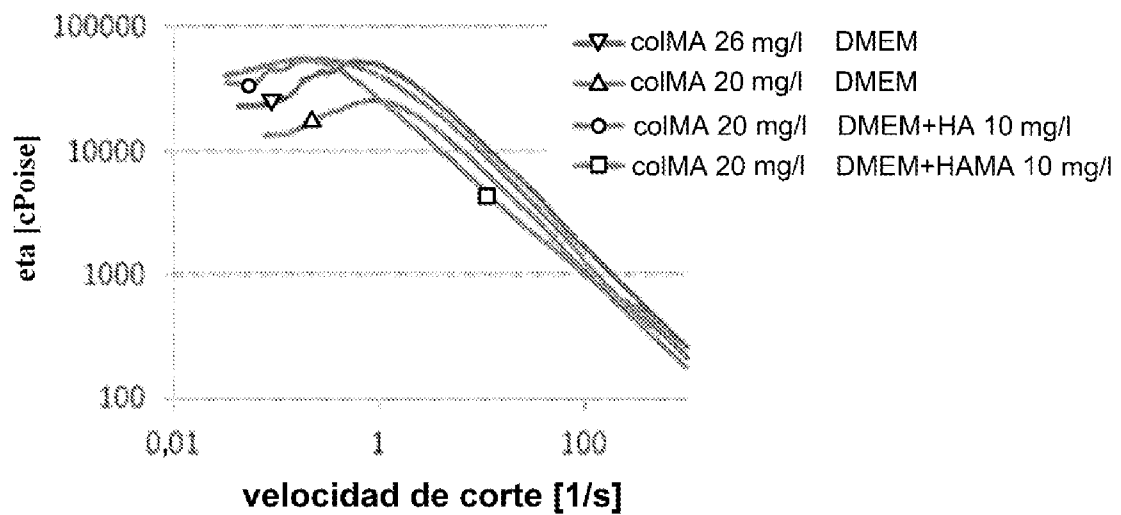


Fig. 30

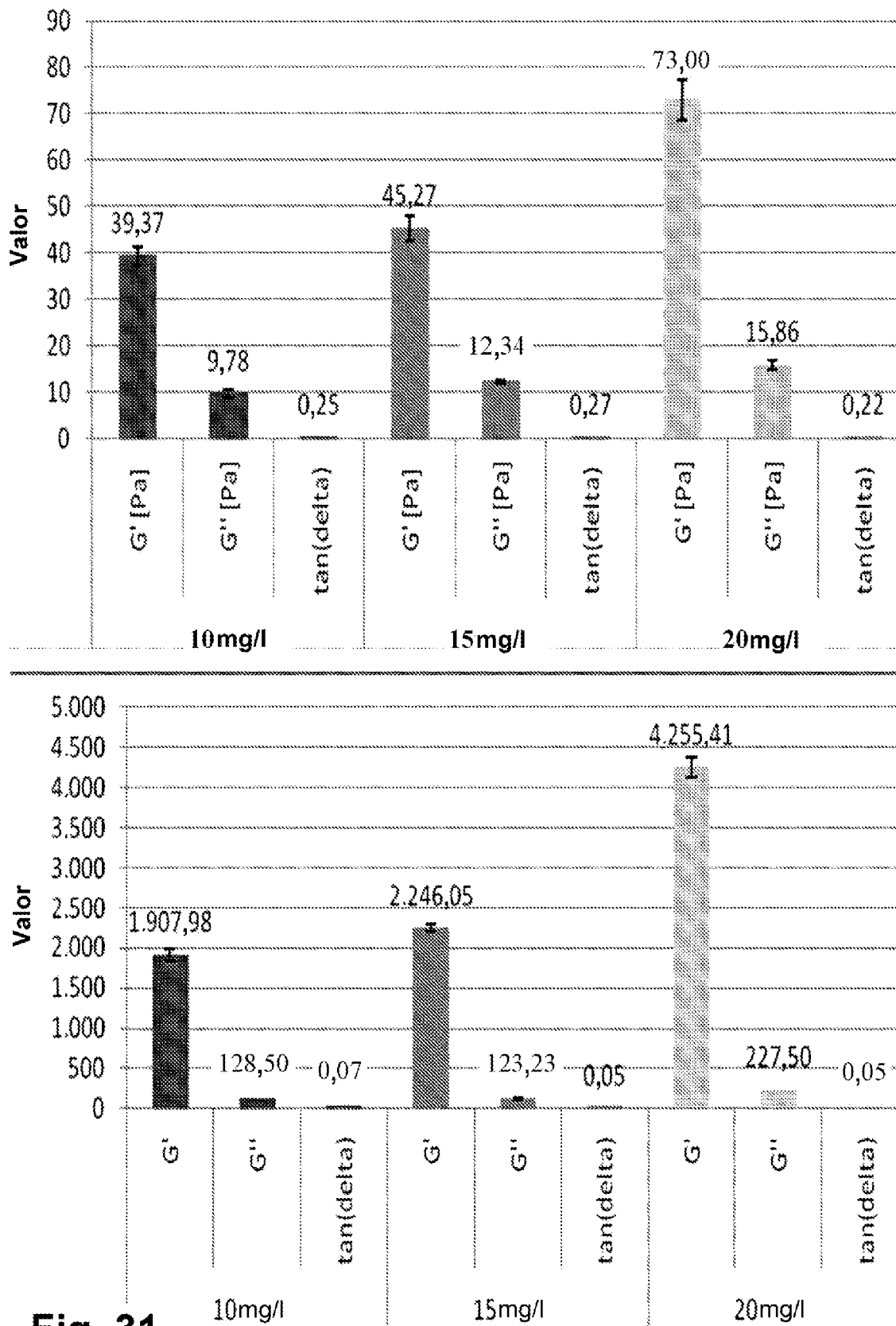


Fig. 31

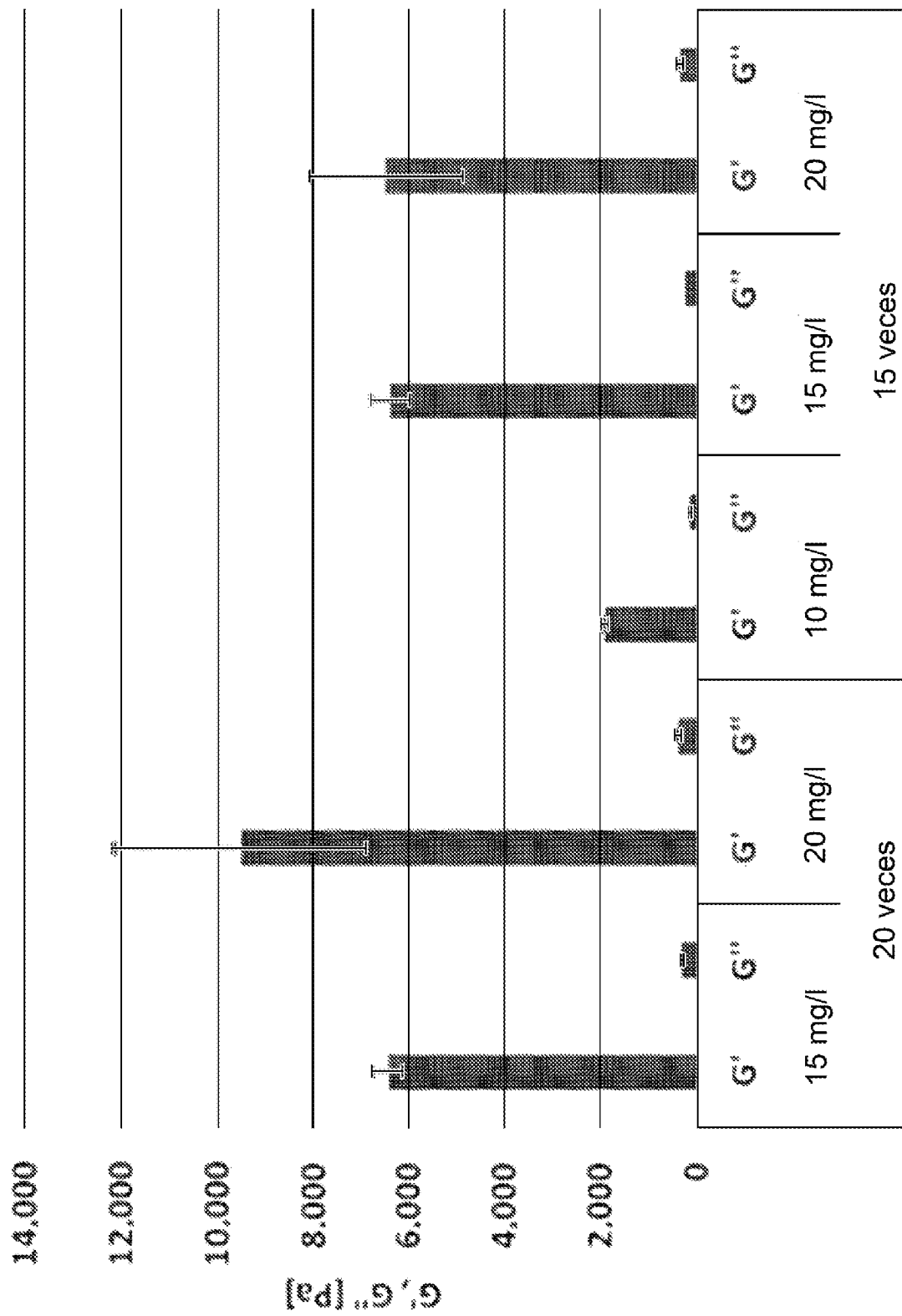


Fig. 32

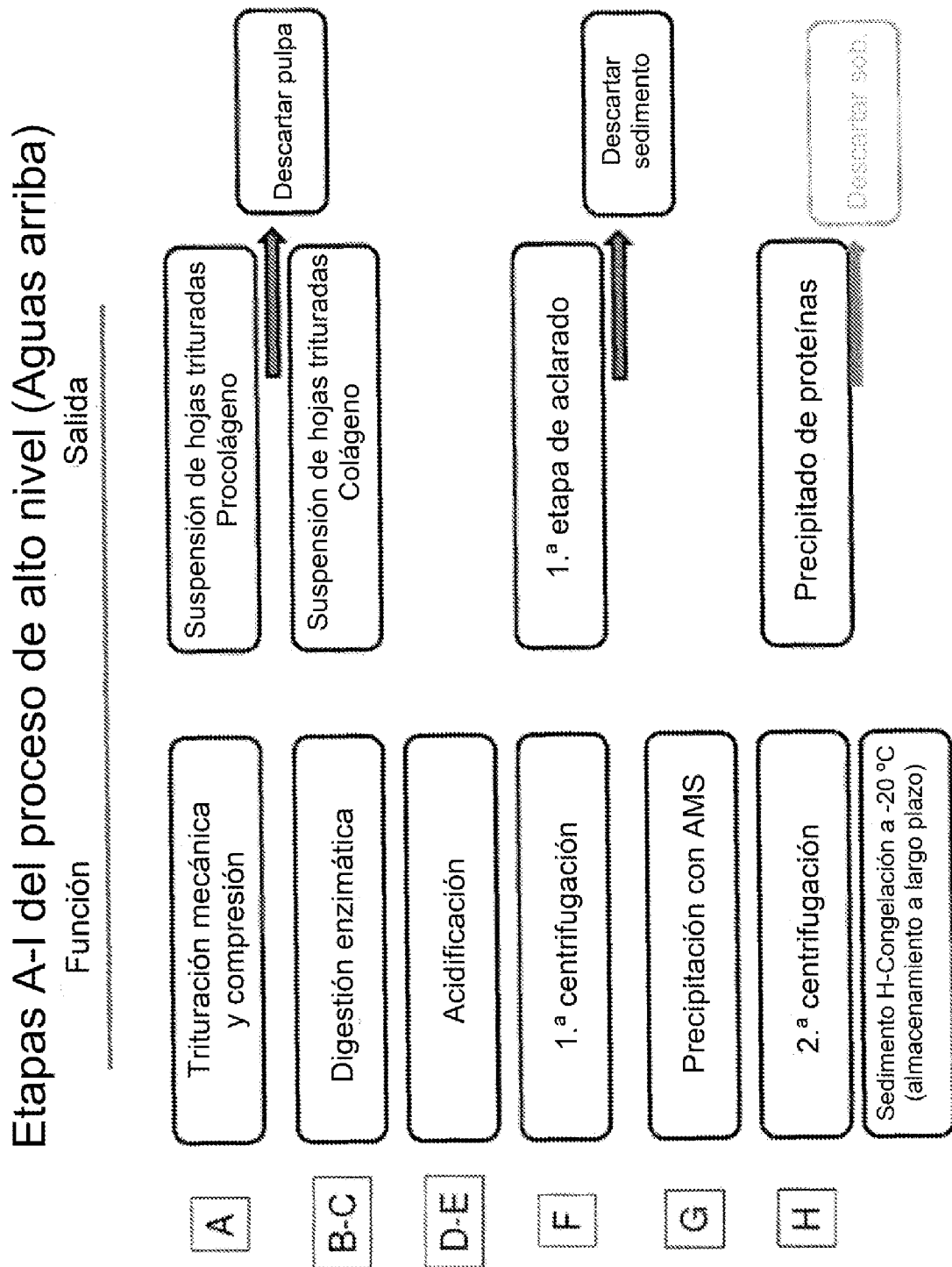


Fig. 33A

Etapas I-M del proceso de alto nivel (Aguas abajo I)

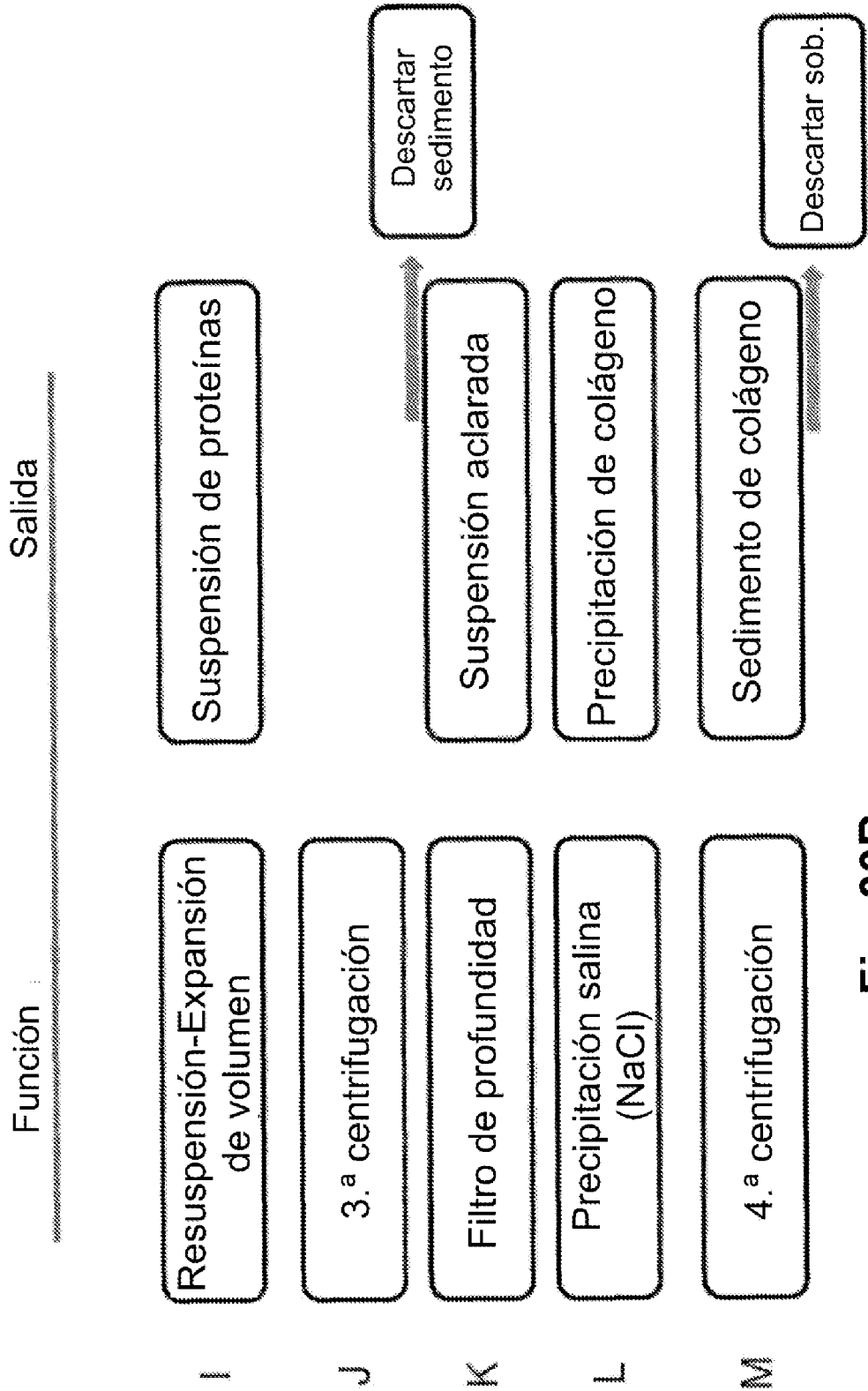


Fig. 33B

Etapas N-Z del proceso de alto nivel (Aguas abajo I)

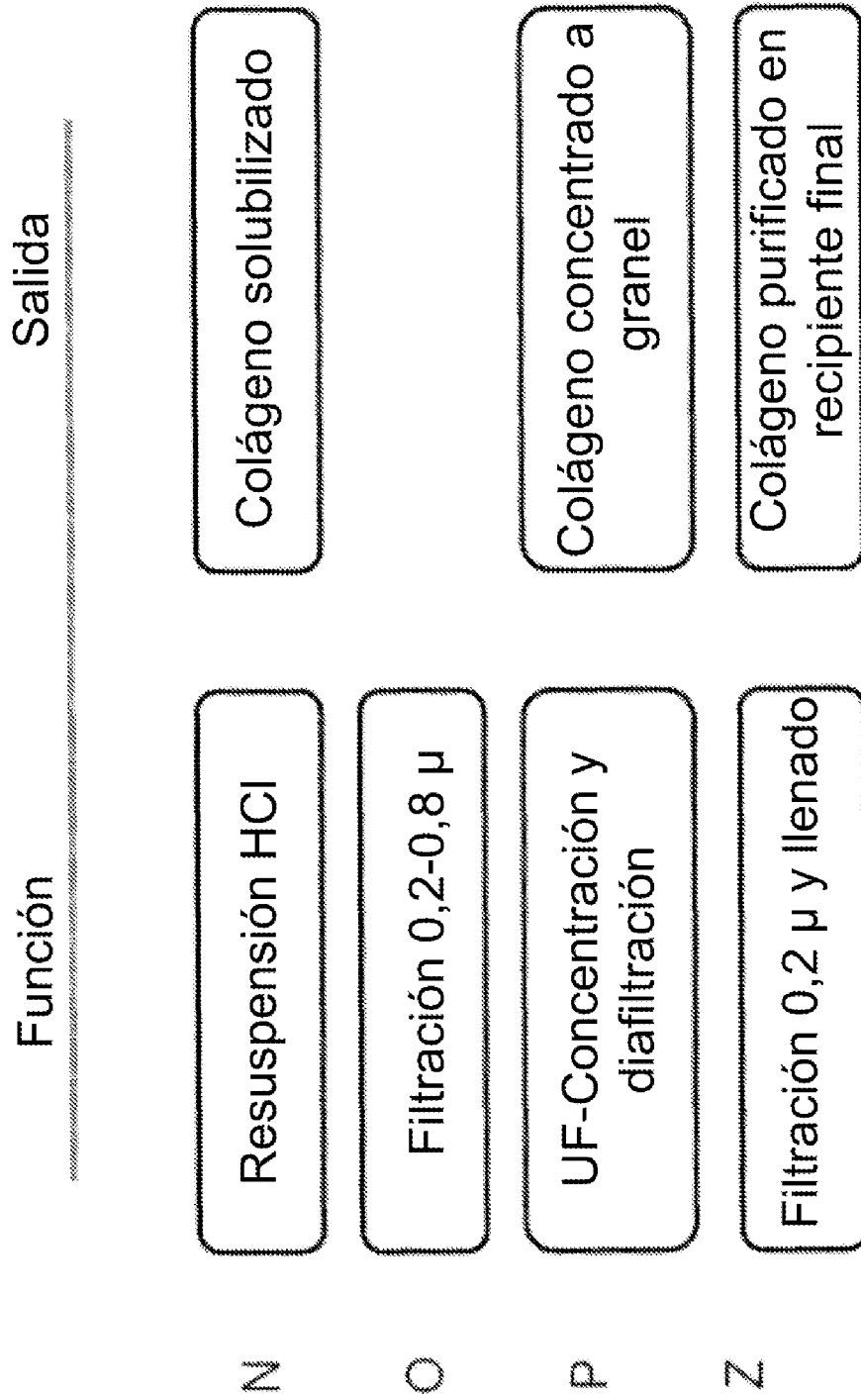


Fig. 33C

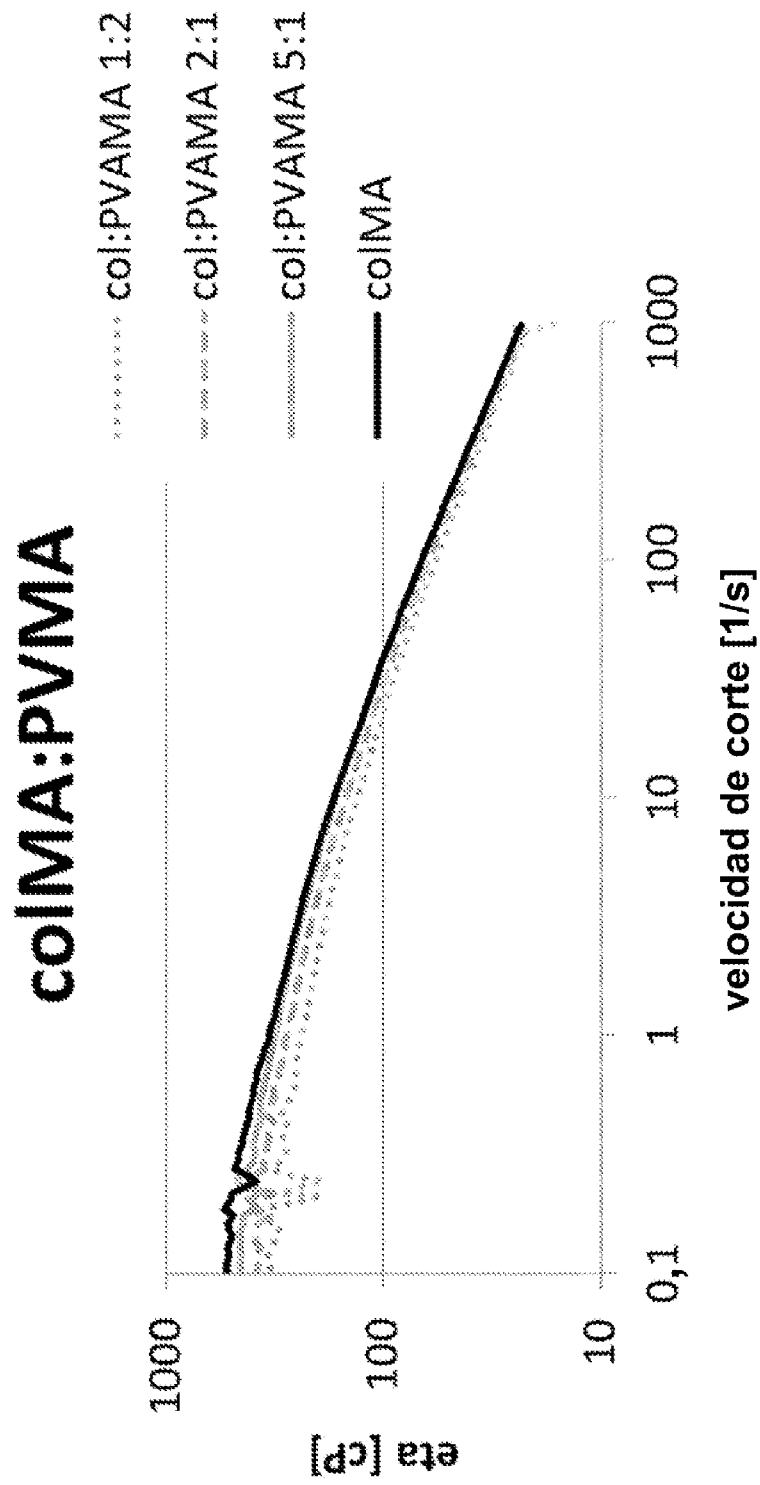


Fig. 34

Co|MA:HAMA

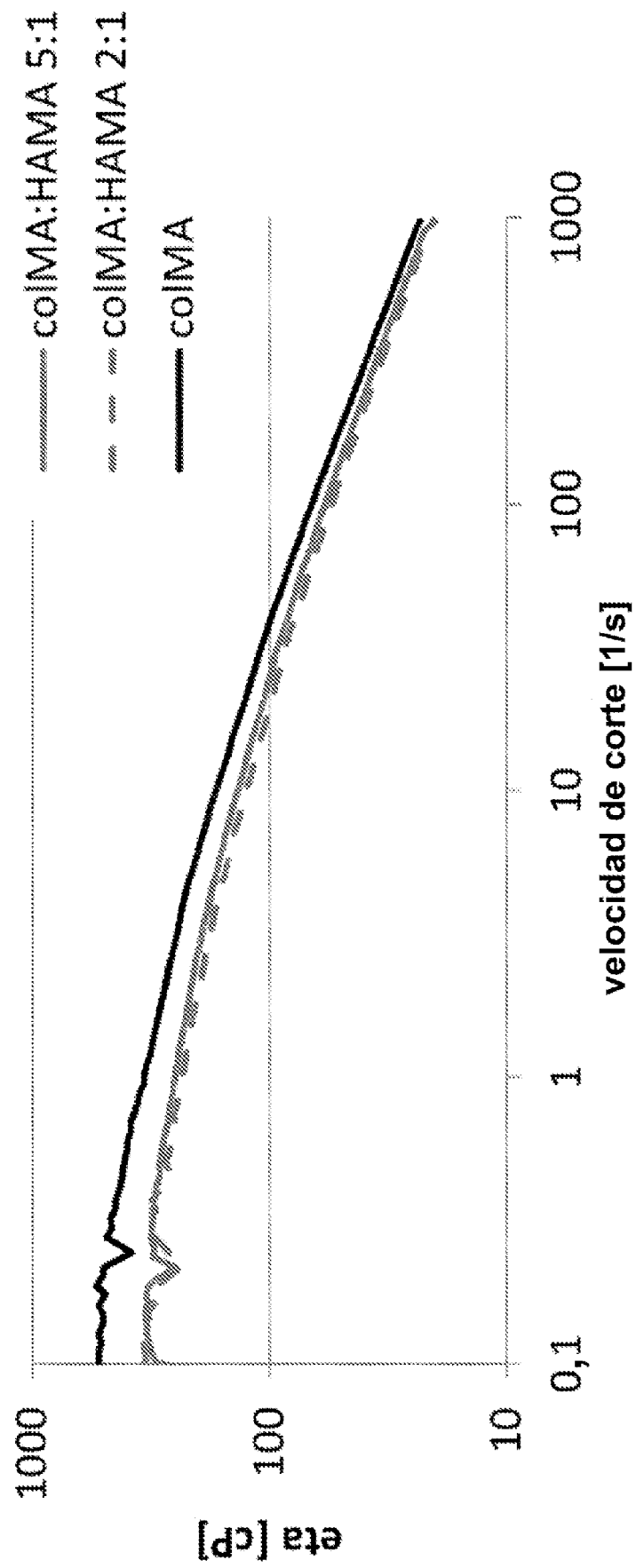


Fig. 35

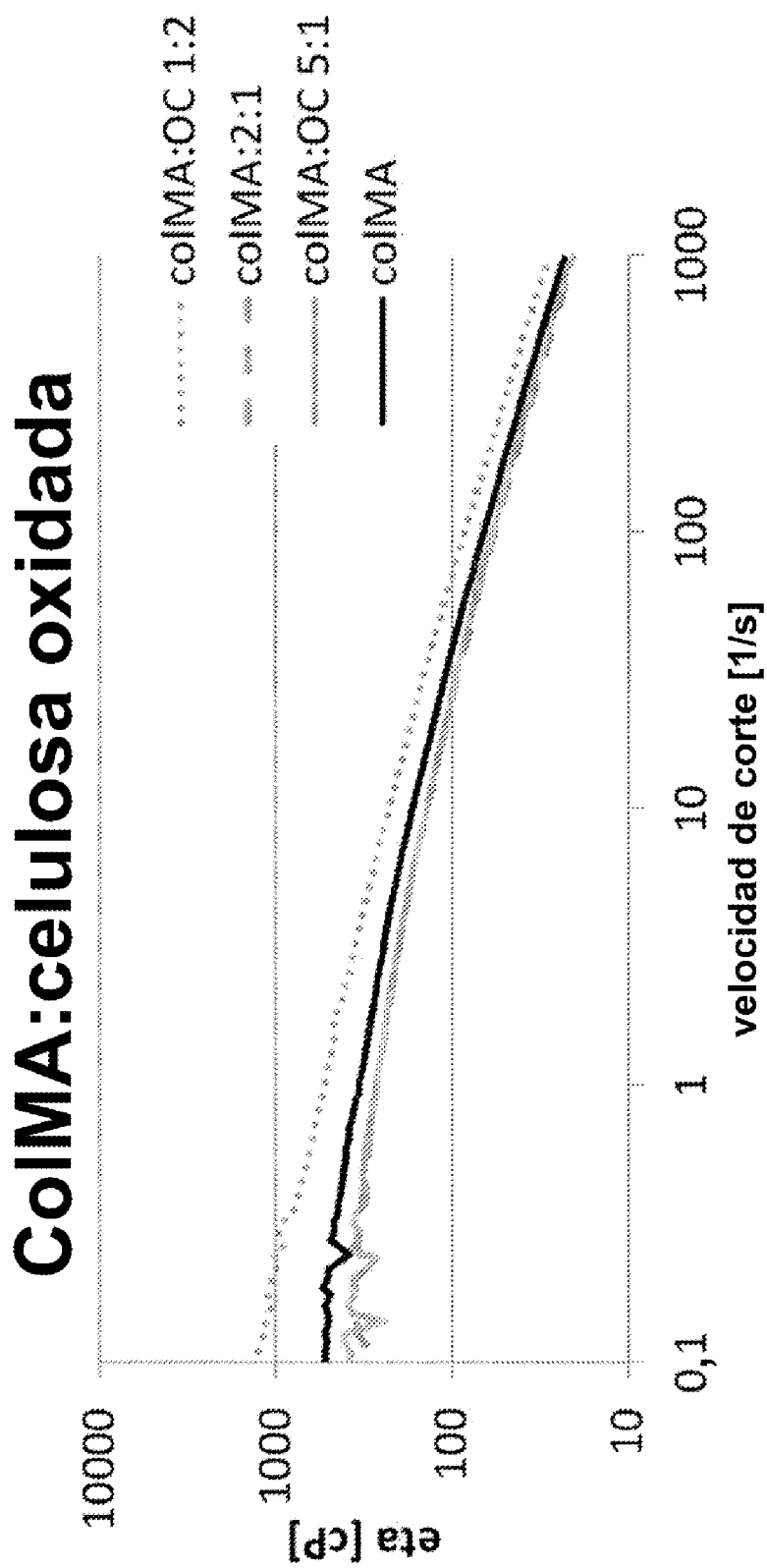


Fig. 36

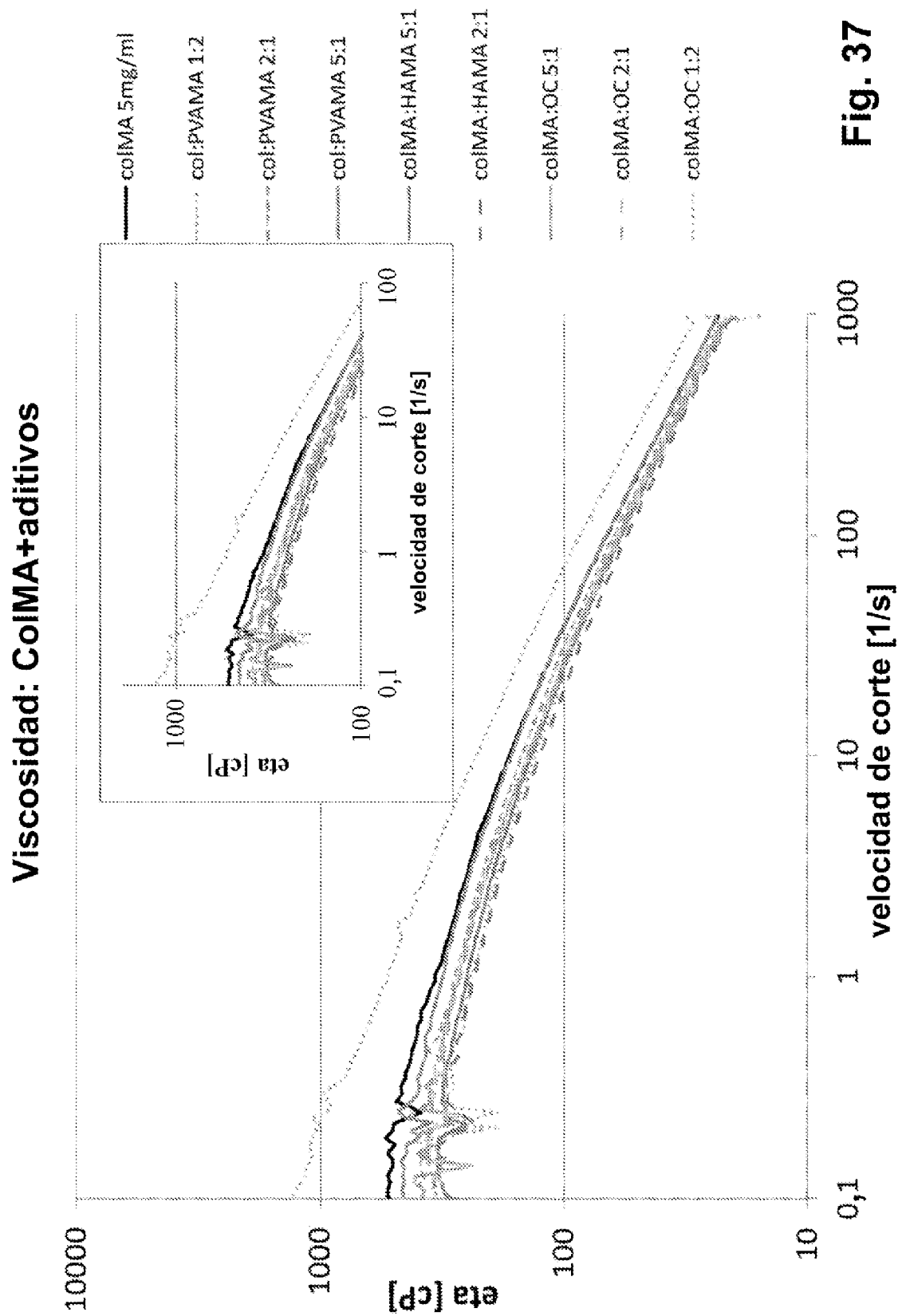


Fig. 37

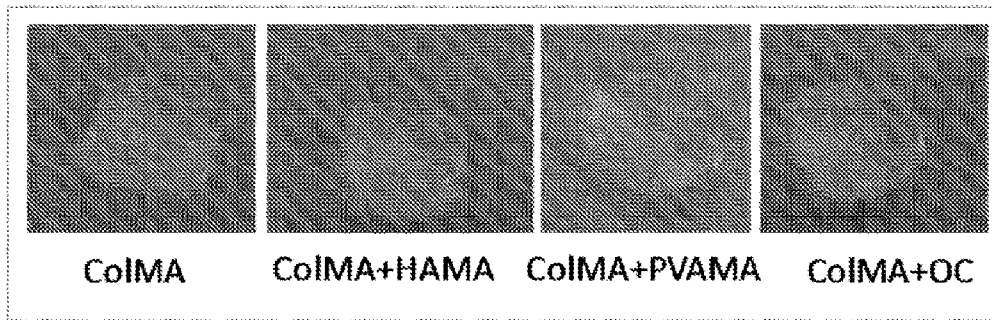


Fig. 38

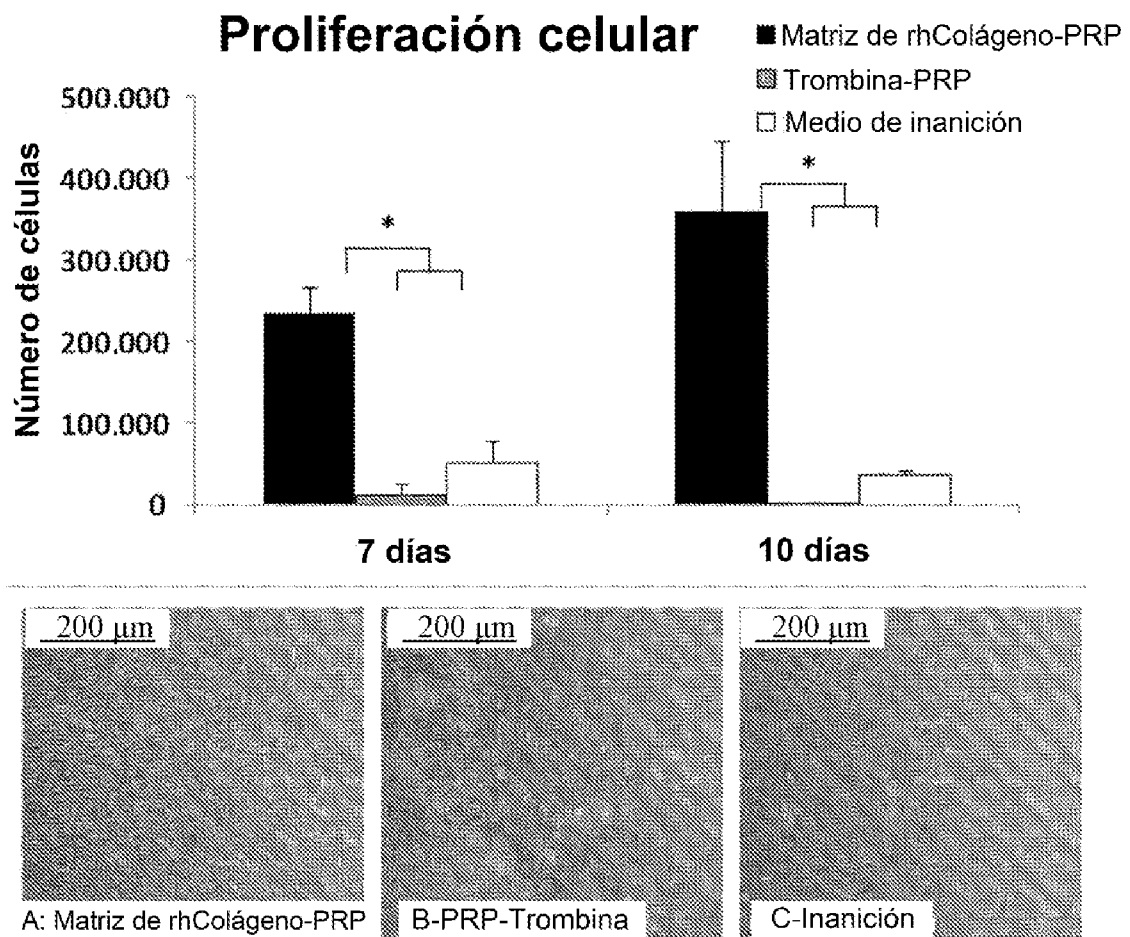


Fig. 39

Peso de la matriz/coágulo

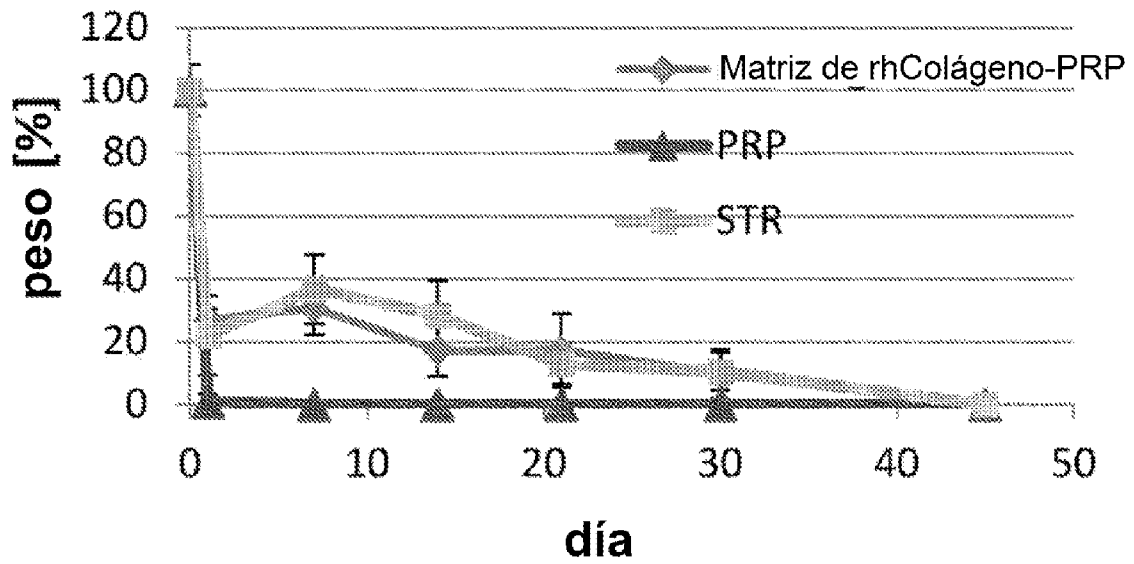
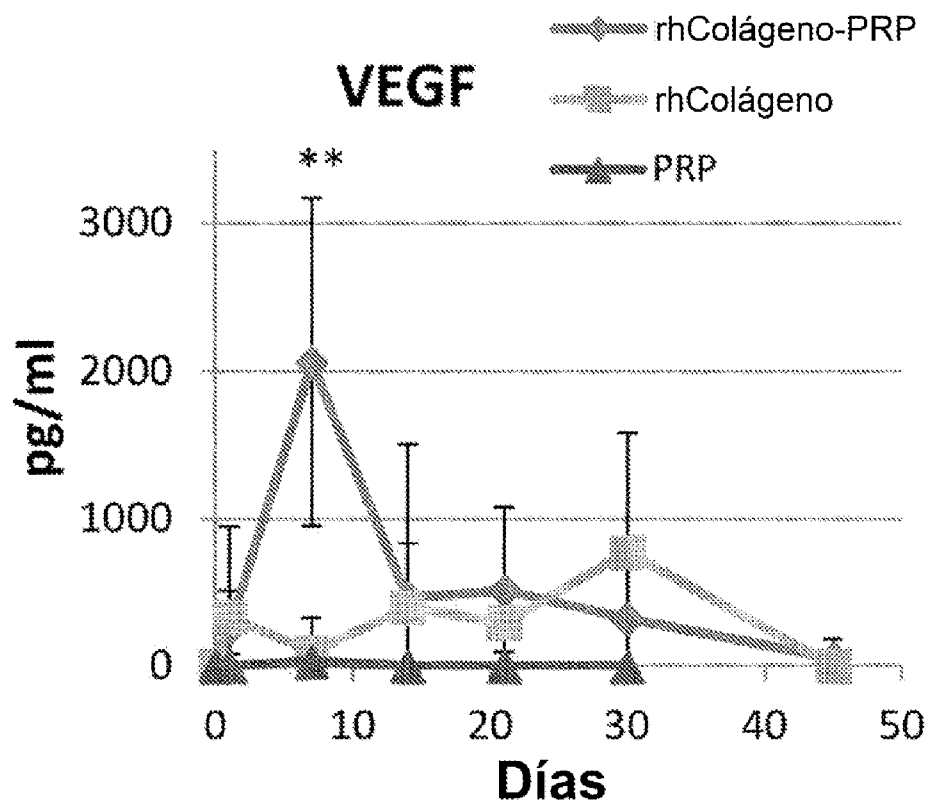
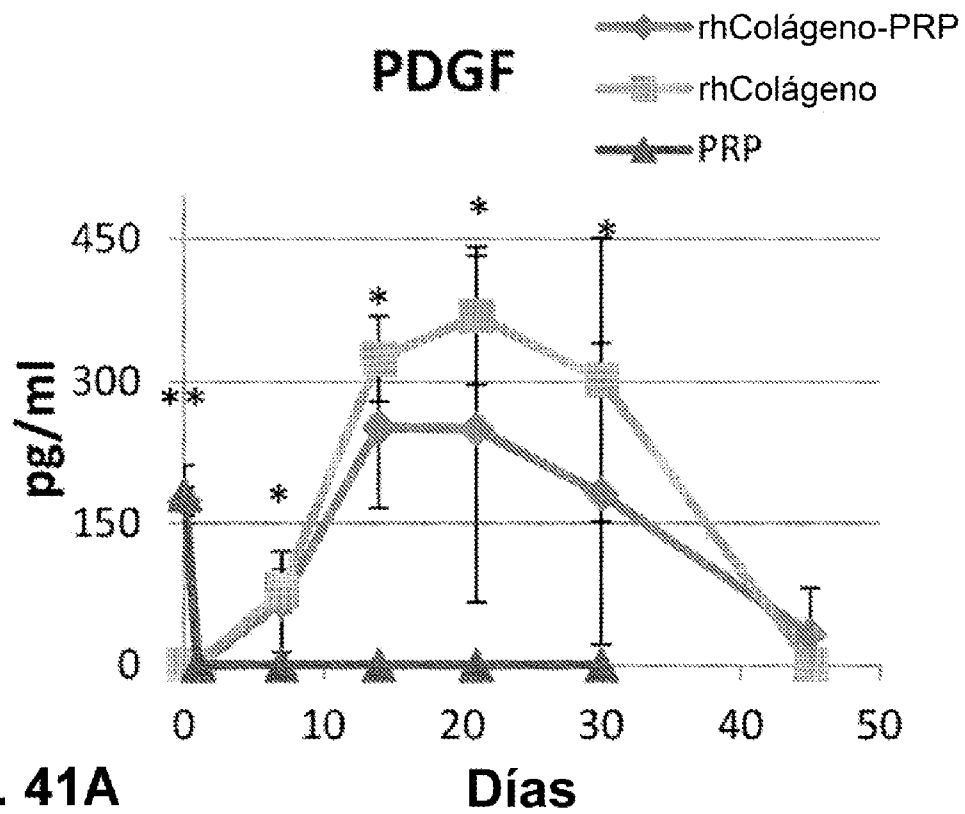


Fig. 40



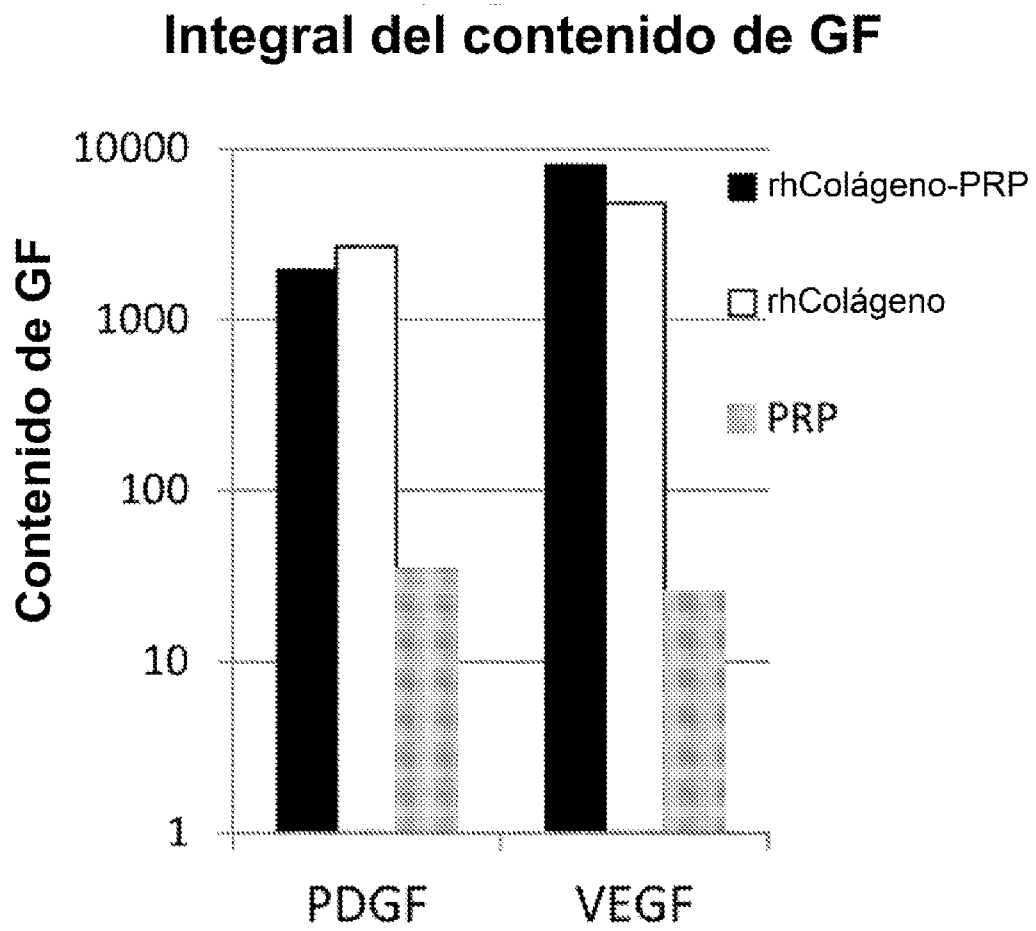


Fig. 42

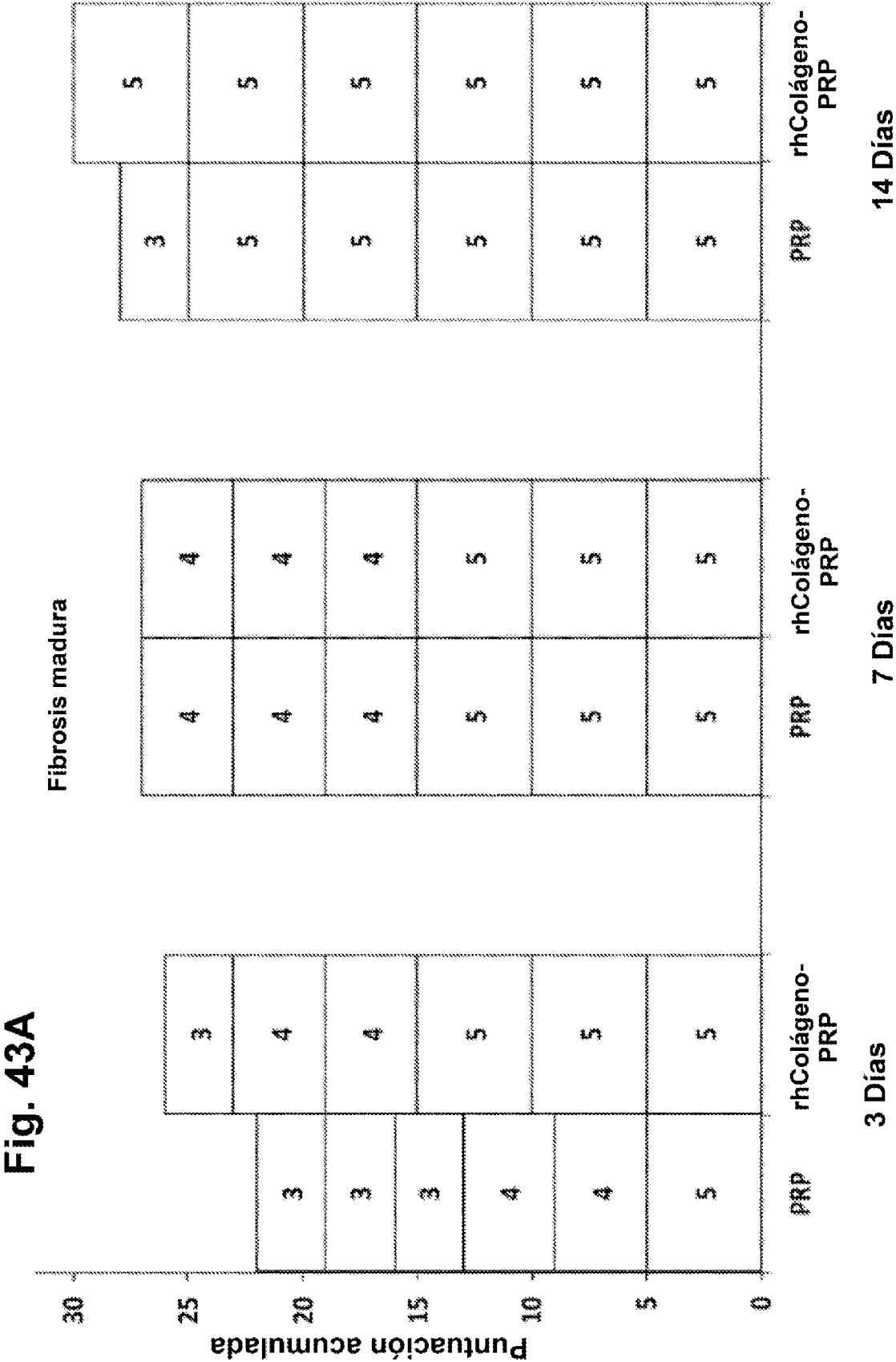


Fig. 43B

Presencia de células inflamatorias mononucleares

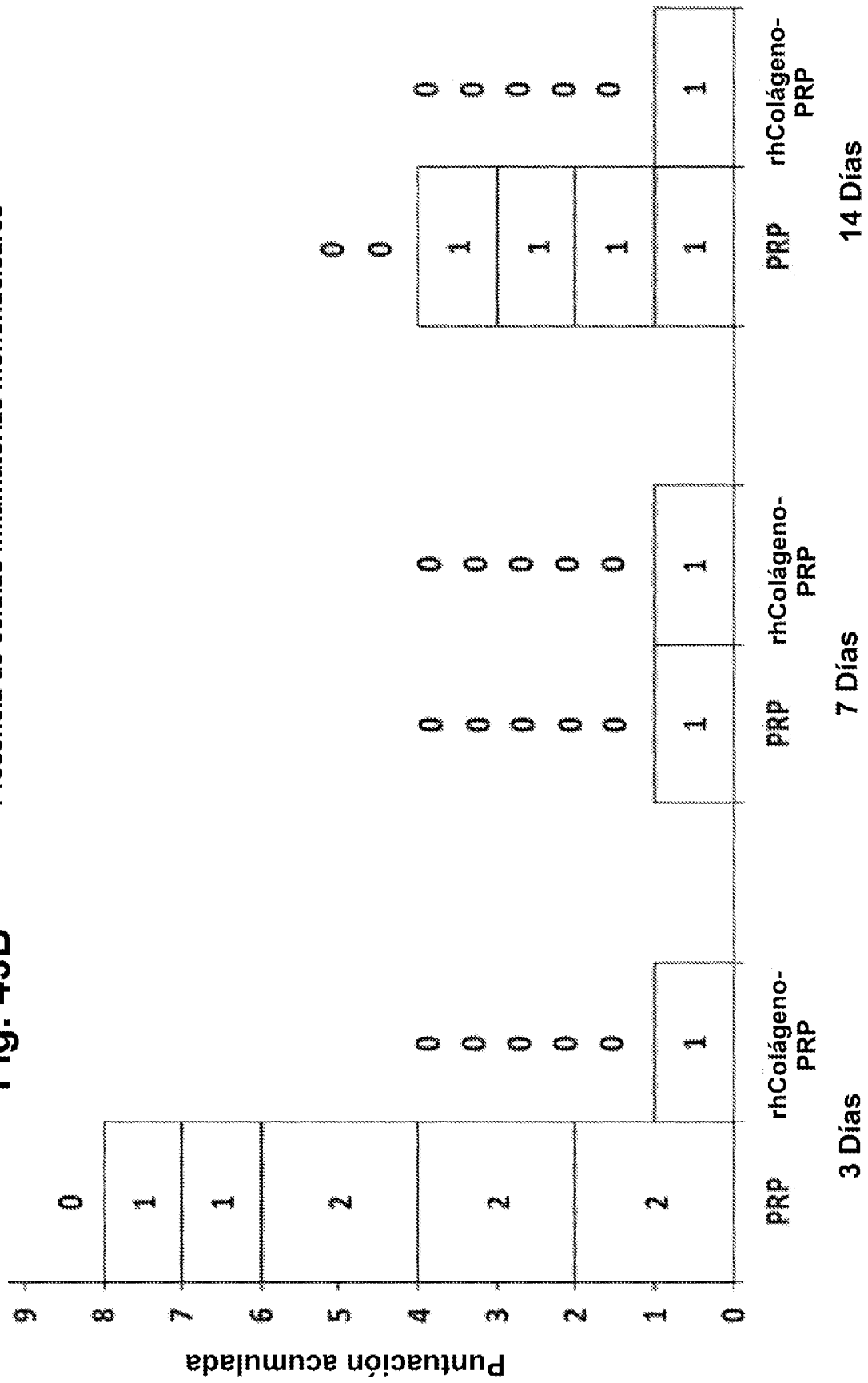
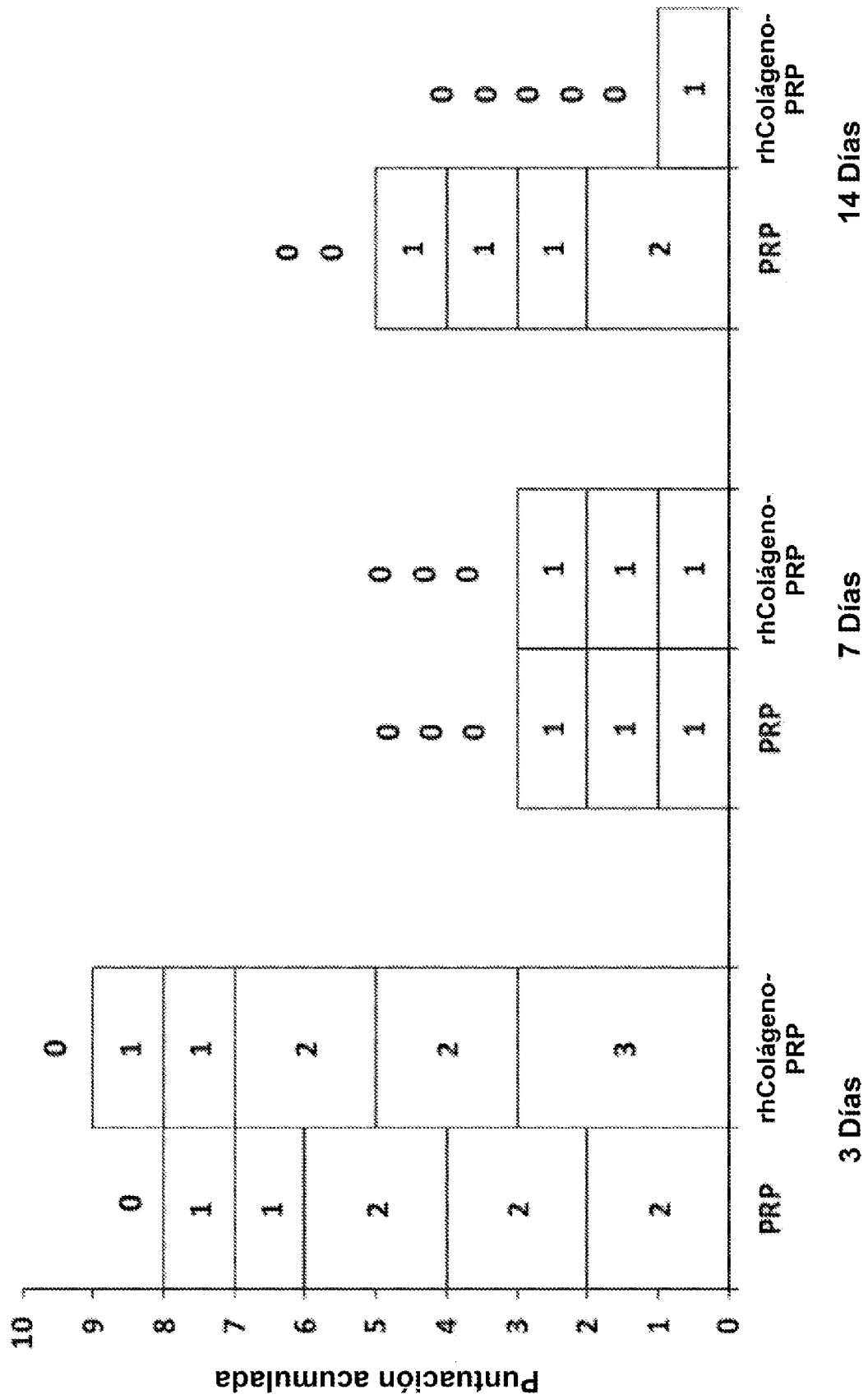


Fig. 43C

Granulación inmadura



HA reticulado + colágeno reticulado

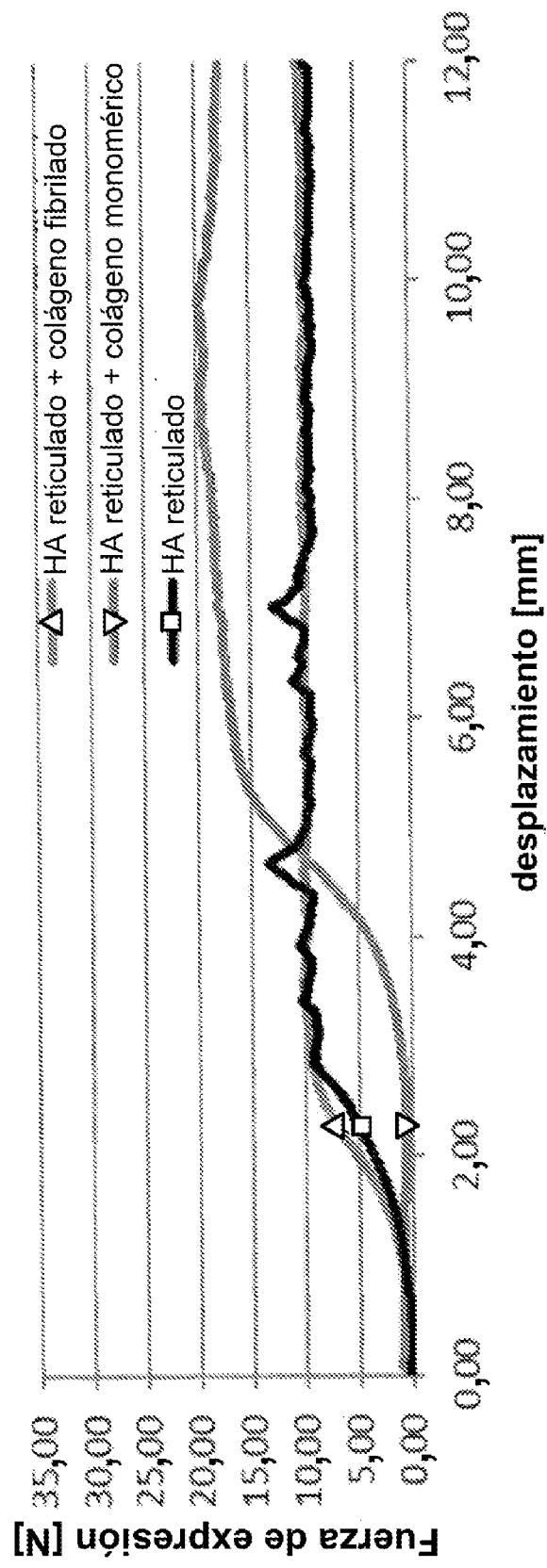


Fig. 44

Red doblemente reticulada frente a HA reticulado

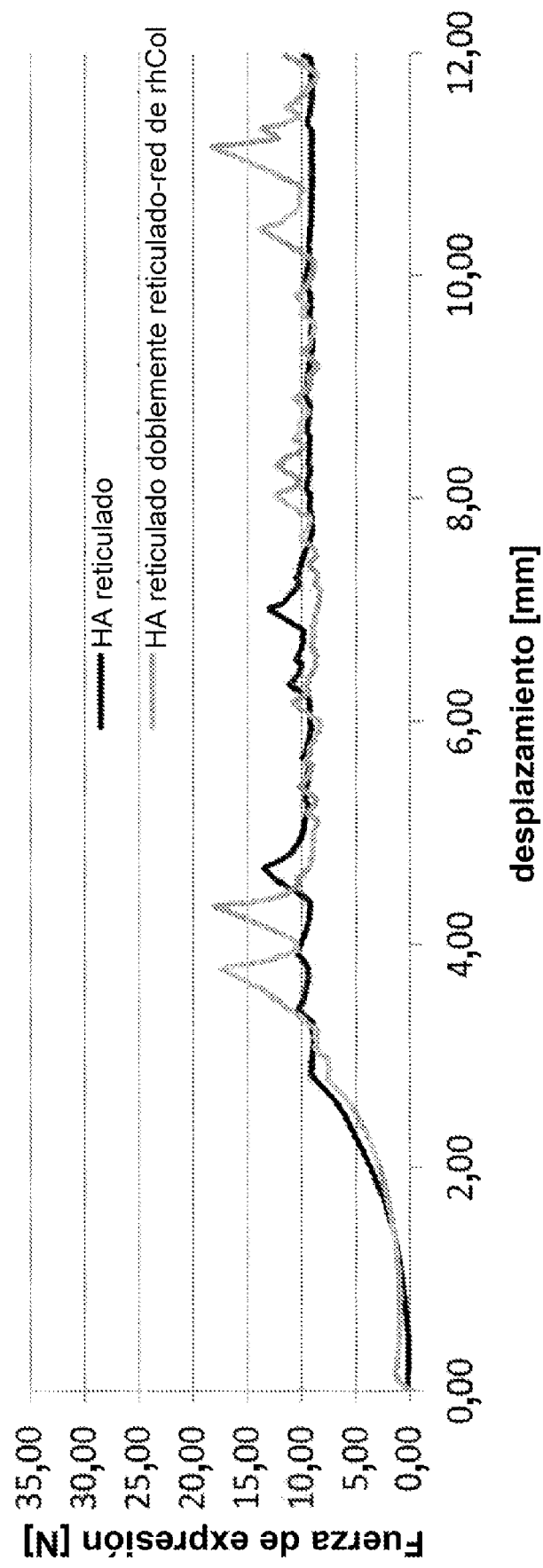


Fig. 45

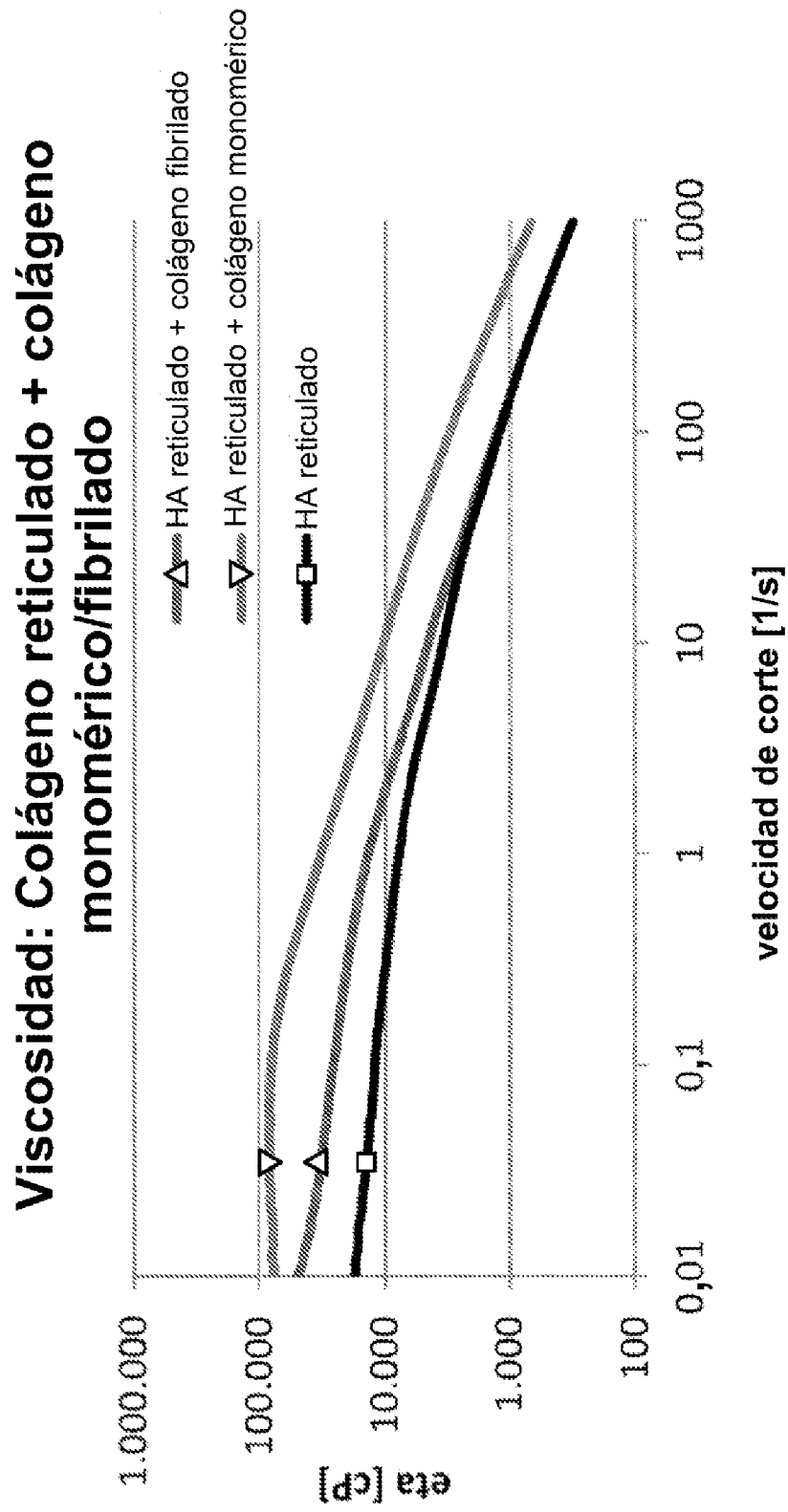


Fig. 46

Viscosidad: Red doblemente reticulada + HA reticulado

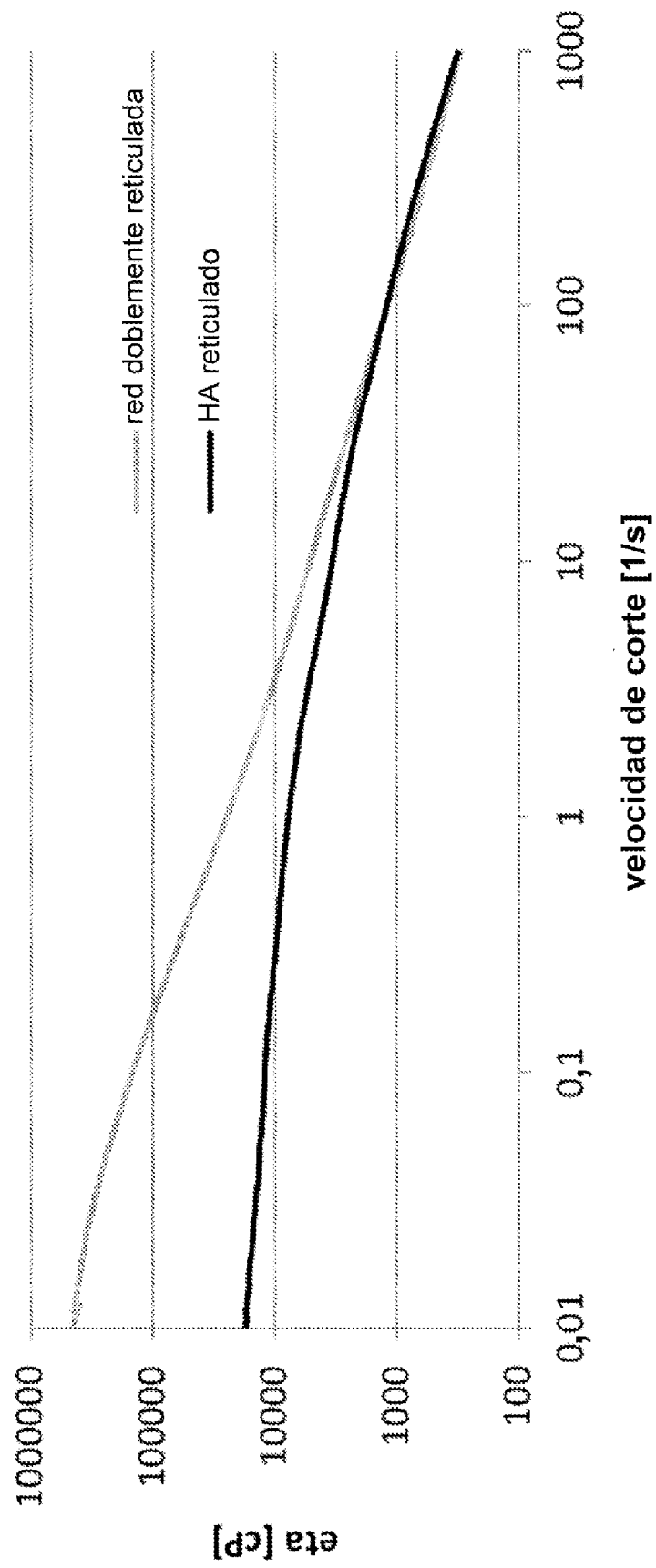


Fig. 47

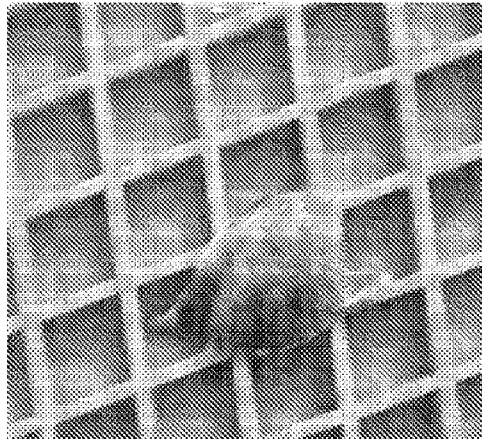


Fig. 48A



Fig. 48B

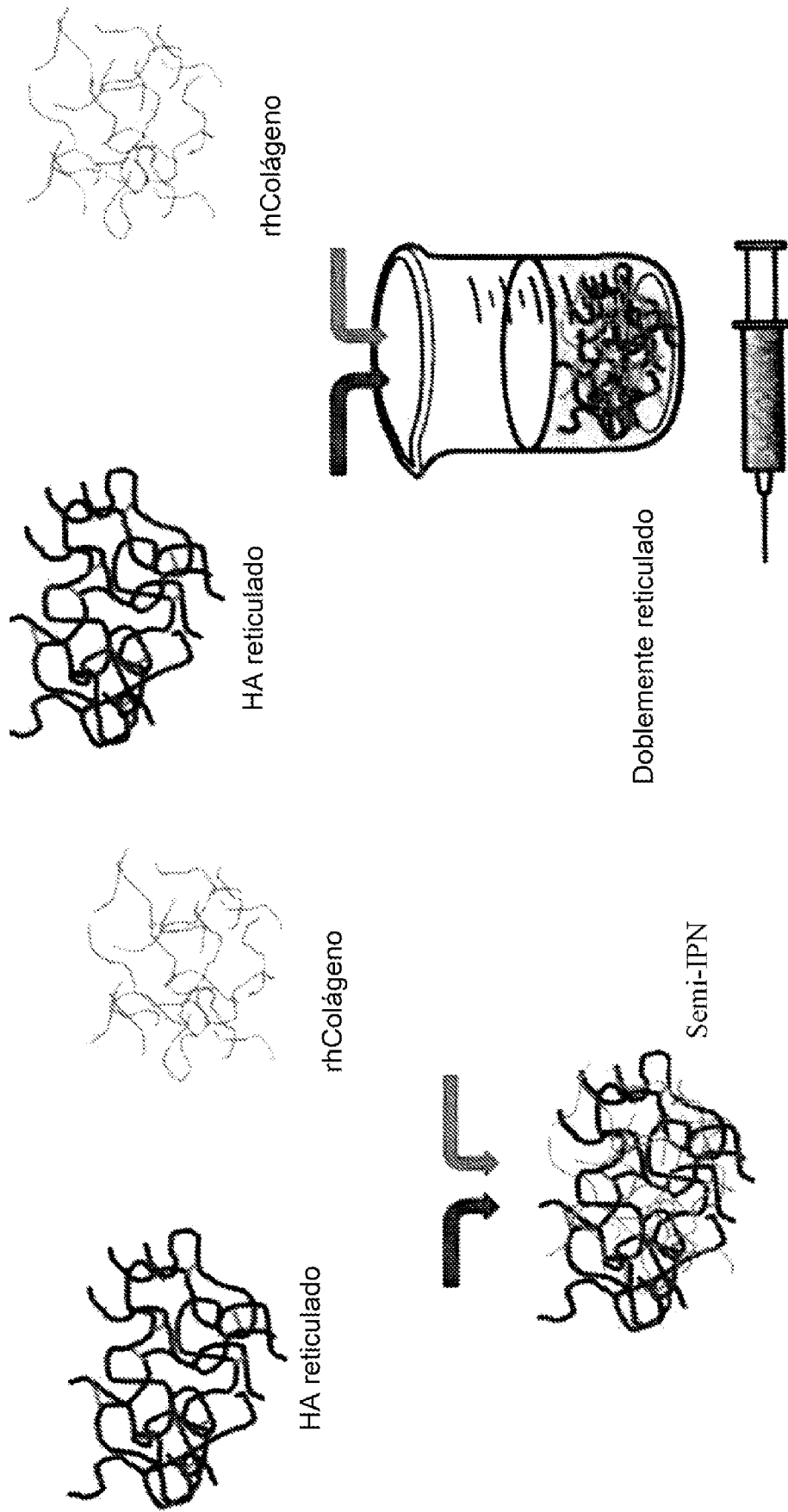


Fig. 49

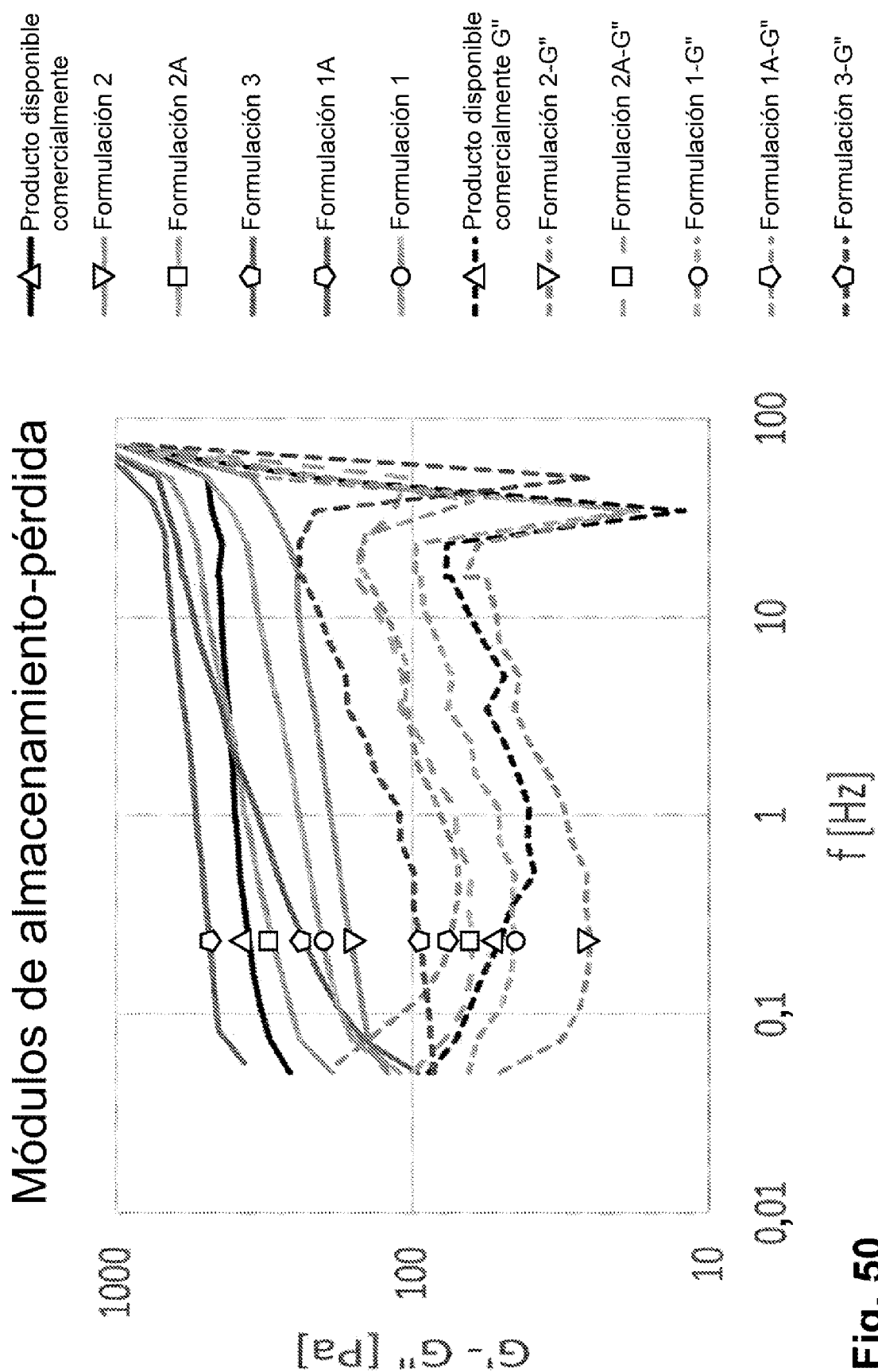


Fig. 50

Reología: G'-G''

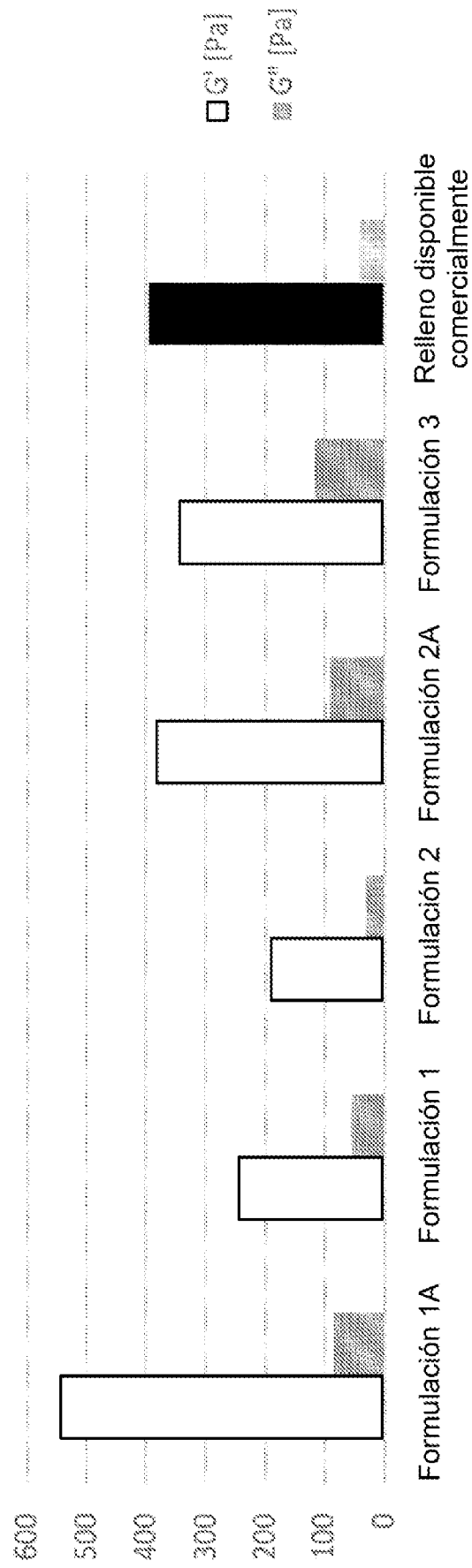


Fig. 51

Inyectabilidad 30G

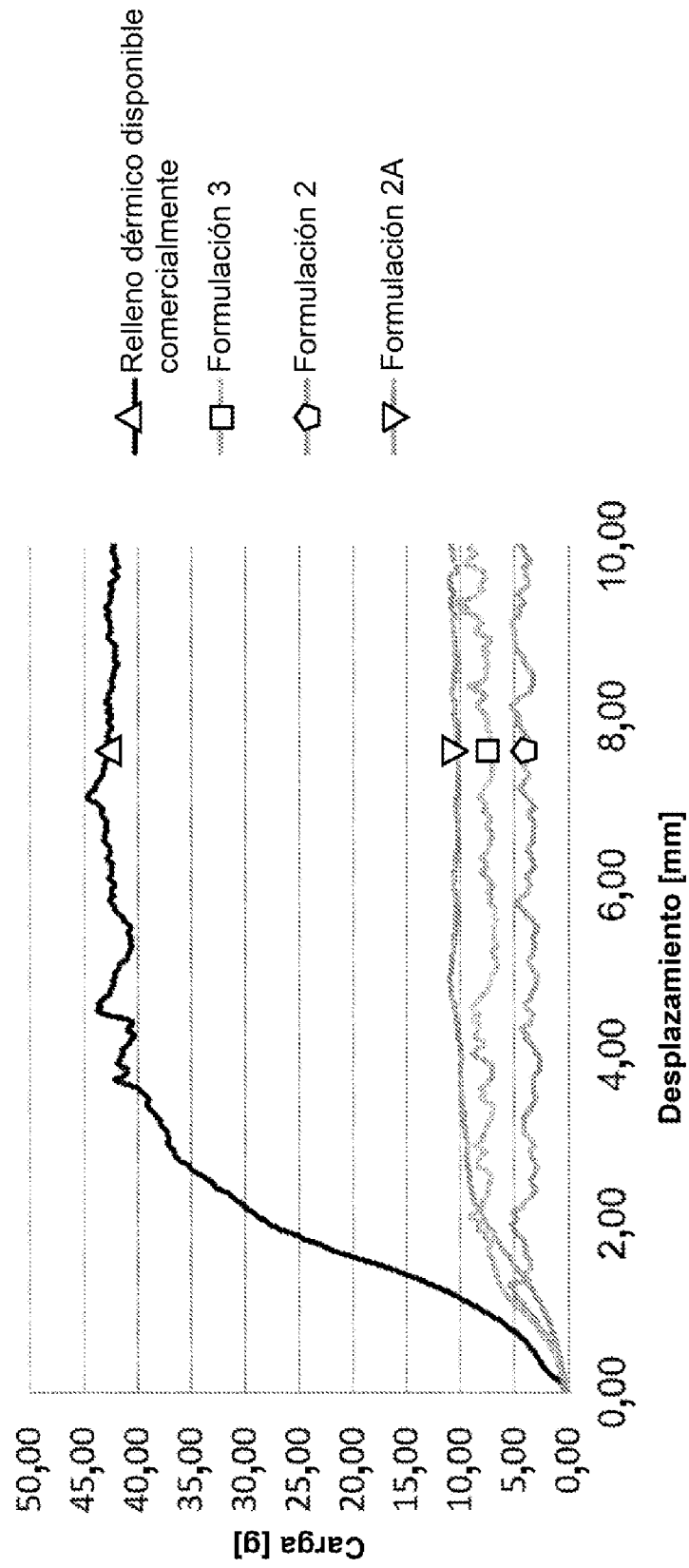


Fig. 52

G' - antes-después del curado de rhColMA

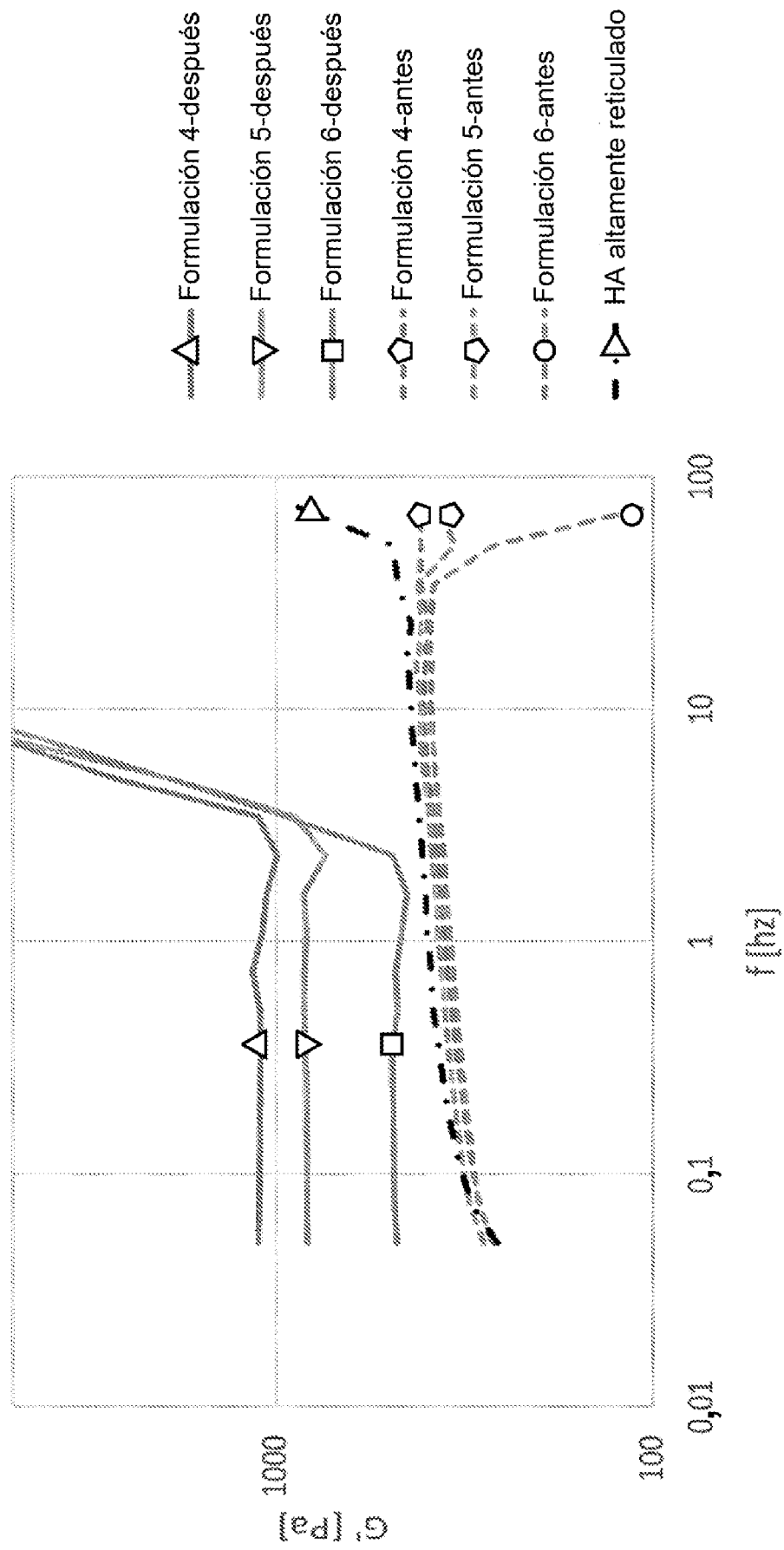


Fig. 53

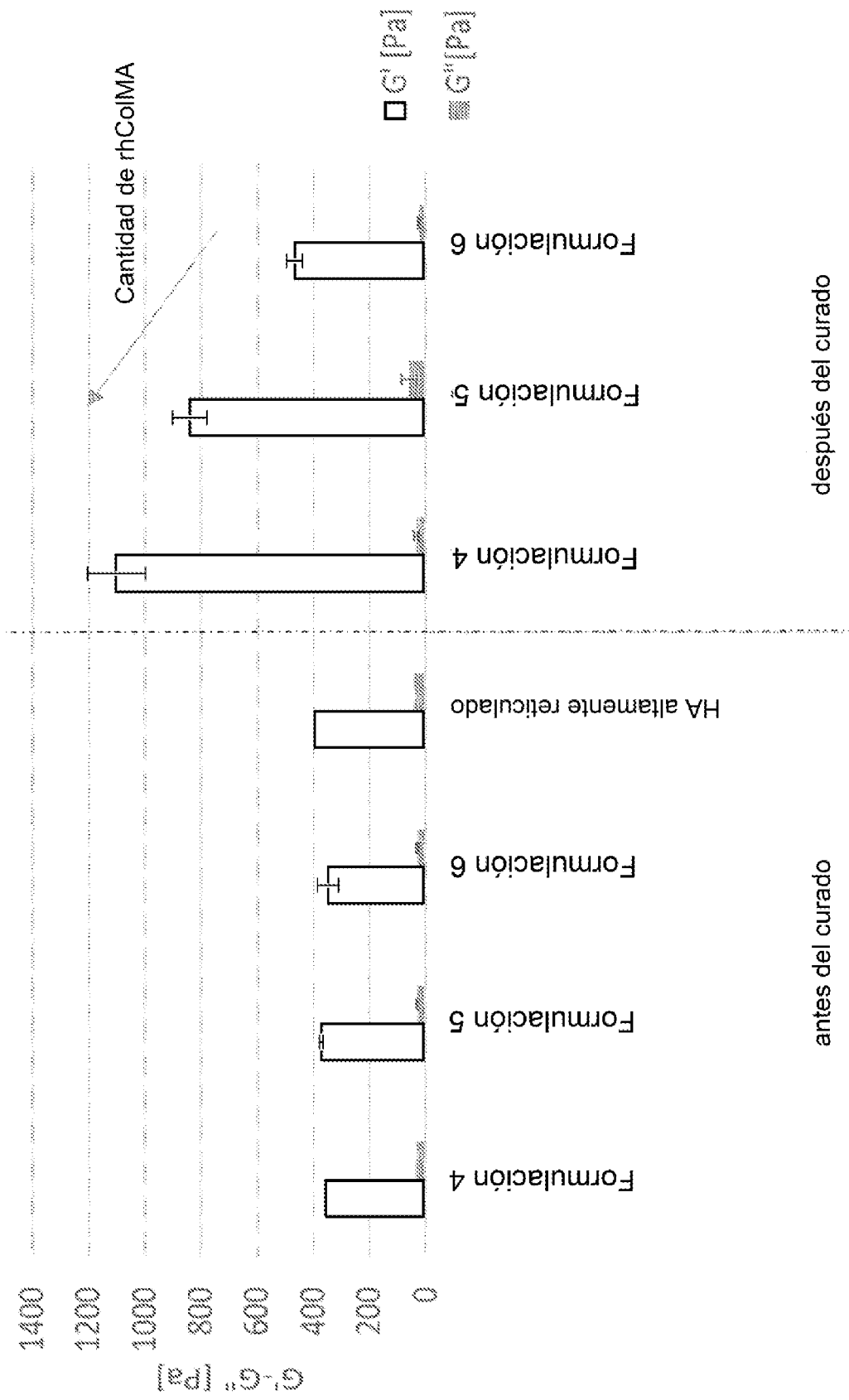


Fig. 54

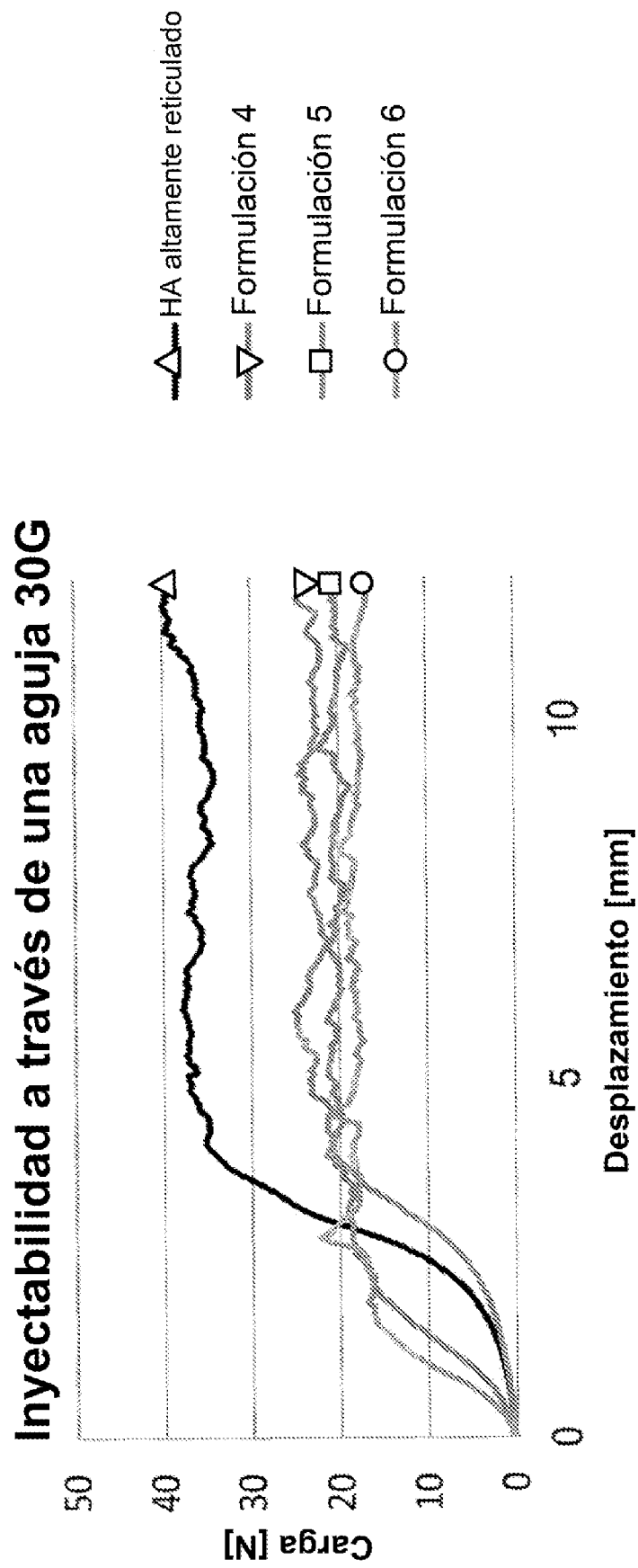


Fig. 55

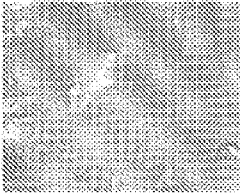
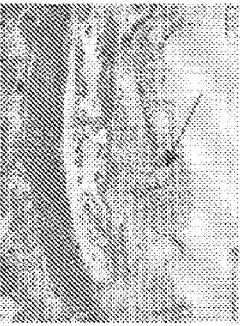
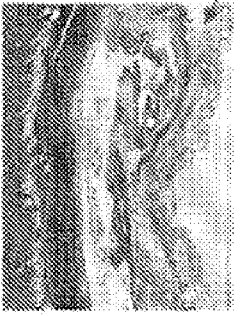
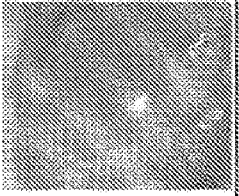
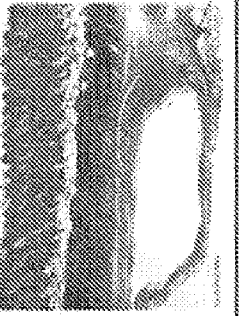
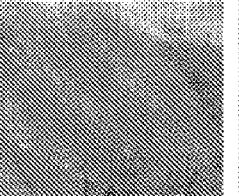
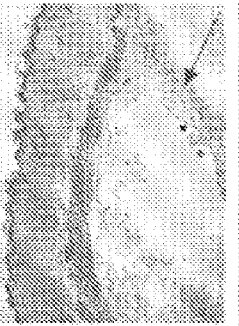
Día 7	ampolla	Histología-H&E	Histología-Tricrómico de Masson
Formulación 2			
Formulación 2A			
Control-disponible comercialmente			

Fig. 56

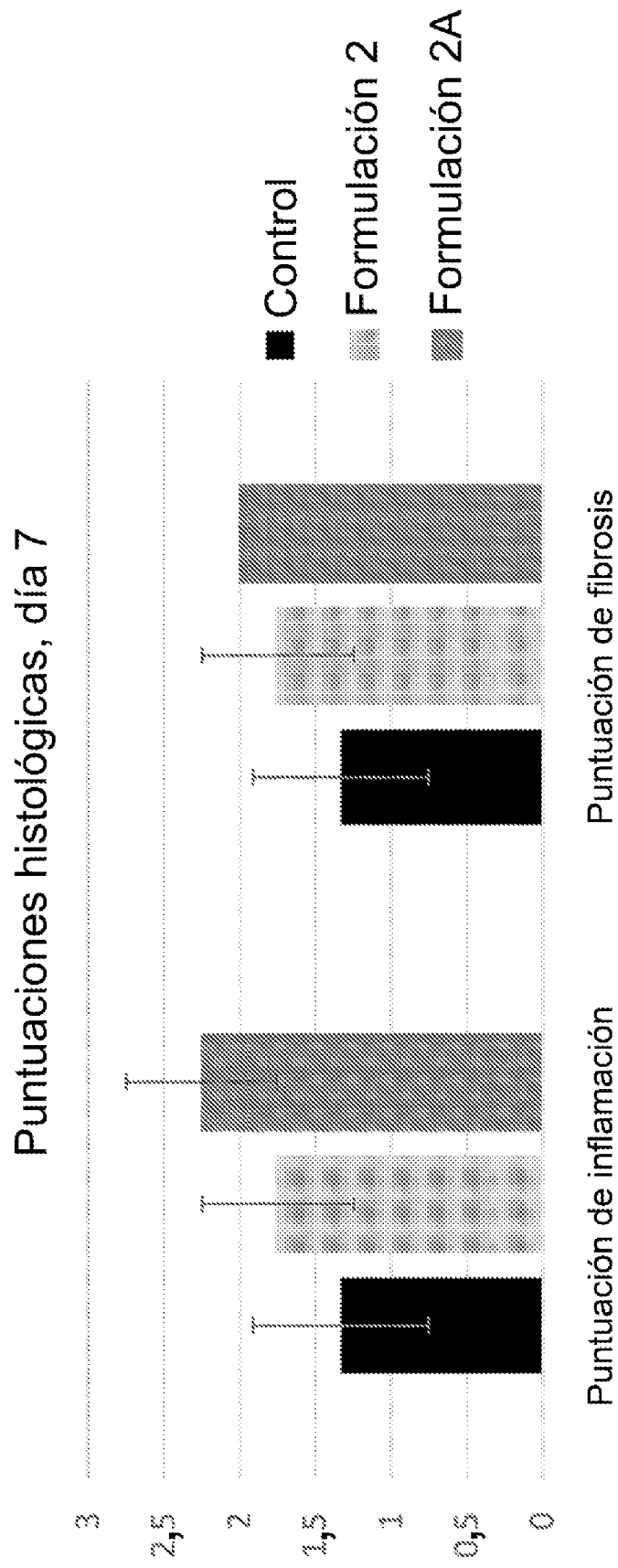
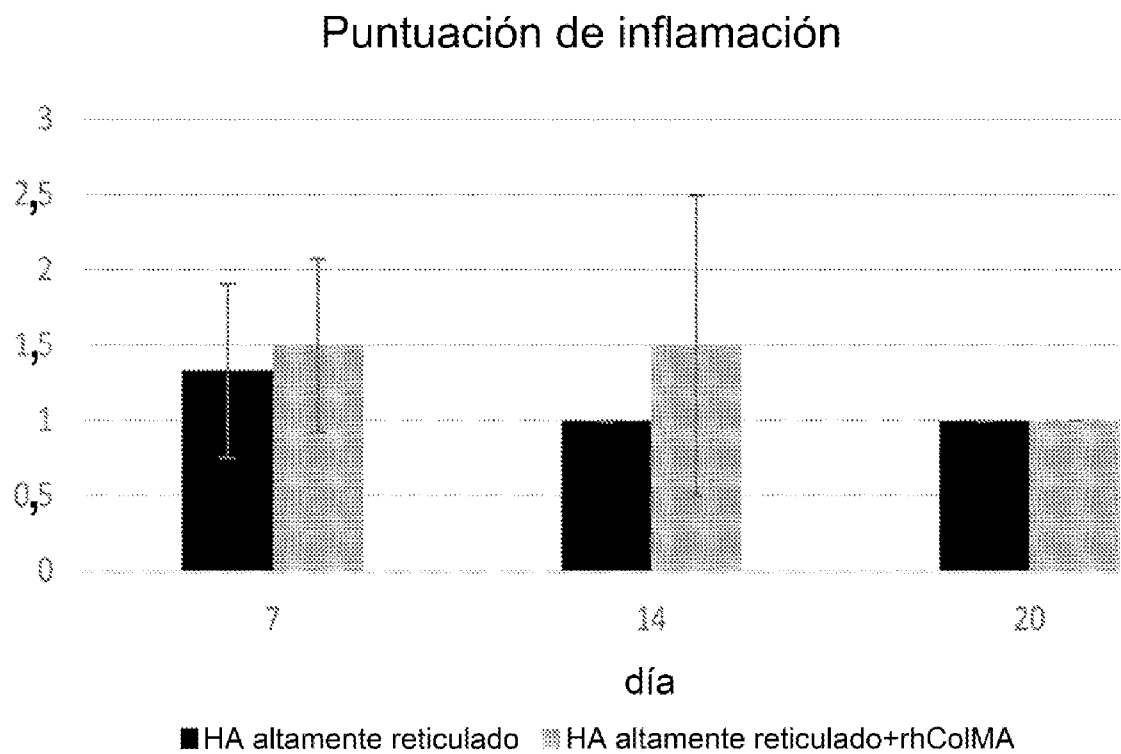
**Fig. 57**

Fig. 58**Fig. 59**