

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 010 268**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61L 27/20** (2006.01)

**A61K 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010** **E 21160140 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024** **EP 3881825**

54 Título: **Biomateriales inyectables**

30 Prioridad:

**10.03.2009 AU 2009901028**

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

**01.04.2025**

73 Titular/es:

**ALLERGAN PHARMACEUTICALS  
INTERNATIONAL LIMITED (100.00%)  
Clonshaugh Business & Technology Park  
Dublin 17, D17 E400, IE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 3 010 268 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

Biomateriales inyectables

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la tropoelastina y a la reparación y regeneración de tejidos utilizando biomateriales.

10 Antecedentes de la invención

La elastina es una proteína de la matriz extracelular que se encuentra principalmente en la piel, los vasos sanguíneos, los pulmones y otros tejidos y órganos que requieren un grado de elasticidad para funcionar. Se forma clásicamente cuando los residuos de lisina de las moléculas de tropoelastina se reticulan con los residuos de lisina de otras moléculas de tropoelastina para formar una masa que es más o menos insoluble en una solución acuosa.

Se espera que la elastina, la tropoelastina y las proteínas relacionadas sean útiles en aplicaciones médicas, incluida la reparación y regeneración de tejidos, y existe una necesidad particular de composiciones que tengan un alto contenido de sólidos de dichas proteínas que puedan administrarse al tejido mediante inyección. Si bien las micropartículas formadas a partir de biomateriales se mencionan en Osborne y col. 2007, WO99/11196 y WO2008/058323, no se conocen composiciones con una menor estructura en partículas que tengan un alto contenido de sólidos en dichas proteínas y propiedades de flujo suficientes para permitir la administración al tejido mediante inyección. Un problema ha sido que, con un alto contenido de sólidos, la tropoelastina forma una masa que no se puede administrar a través de agujas de diferentes calibres que se usan en aplicaciones clínicas y cosméticas.

25 Sigue existiendo la necesidad de composiciones que tengan un alto contenido de sólidos de tropoelastina u otro material elástico y propiedades de flujo que permitan que la composición se administre al tejido mediante inyección.

La referencia a cualquier técnica anterior en la memoria descriptiva no es, y no debe tomarse como una confirmación o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en Australia o en cualquier otra jurisdicción o que pueda esperarse razonablemente que un experto en la técnica pueda determinar, comprender y considerar pertinente en la técnica.

35 Resumen

La invención se define por las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, se proporciona un proceso para producir micropartículas formadas a partir de tropoelastina tal como se define en las reivindicaciones, incluida la etapa de coacervar o polimerizar la tropoelastina en una fase líquida que tiene un agente de control de la coalescencia disuelto en la misma.

40 Como se utiliza en la presente memoria, salvo que el contexto exija lo contrario, el término “comprender” y sus variaciones, tales como “que comprende”, “comprende” y “comprendido”, no pretenden excluir otros aditivos, componentes, enteros o etapas.

45 Breve descripción de los dibujos

Figura 1A: Imagen de SEM de micropartículas formadas a partir de tropoelastina con un diámetro estimado de 1  $\mu\text{m}$ , preparadas mediante el tratamiento de una solución de 2 mg/ml de tropoelastina con álcali [ejemplo 1], seguido de incubación a 37 °C durante 4 h.

50 Figura 1B: Una imagen de la masa de material elástico producida cuando una solución de 10 mg/ml de tropoelastina se trata con álcali, seguida de incubación a 37 °C en ausencia de un agente de control de la coalescencia como se describe en el Ejemplo 2. El material producido es una masa elástica densa que no es susceptible de inyección.

55 Figura 2: Imagen de SEM de glóbulos formados a partir de tropoelastina preparada mediante el tratamiento de una solución de 50 mg/ml de tropoelastina con glutaraldehído al 0,05 % (v/v) en presencia de CMC al 1 % (p/v), seguido de incubación a 37 °C durante 24 h.

60 Figura 3: Imagen de SEM de glóbulos coalescidos formados a partir de tropoelastina preparada mediante el tratamiento de una solución de 50 mg/ml de tropoelastina con glutaraldehído al 0,05 % (v/v) en presencia de HA de viscosidad media al 1 % (p/v), seguido de incubación a 37 °C durante 16 horas.

65 Figura 4A: Imagen de SEM de material fabricado a partir de glóbulos coalescidos formados a partir de tropoelastina con un intervalo de diámetros aparentes de aproximadamente 1 a 4  $\mu\text{m}$ , preparado mediante el tratamiento de una solución de tropoelastina de 10 mg/ml con base en presencia de HA al 1 % (p/v), seguido de incubación a 37 °C durante la noche.

Figura 4B: Imagen de SEM de material fabricado a partir de glóbulos coalescidos formados a partir de tropoelastina con un intervalo de diámetros aparentes de aproximadamente 1 a 4  $\mu\text{m}$ , preparado mediante el tratamiento de una solución de tropoelastina de 25 mg/ml con base en presencia de HA al 1 % (p/v), seguido de incubación a 37 °C durante la noche.

Figura 4C: Imagen de SEM de material fabricado a partir de glóbulos coalescidos formados a partir de tropoelastina con un intervalo de diámetros aparentes de aproximadamente 1-10  $\mu\text{m}$ , preparado mediante el tratamiento de una solución de tropoelastina de 50 mg/ml con base en presencia de HA al 1 % (p/v), seguido de incubación a 37 °C durante la noche.

Figura 4D: Imagen de SEM de material fabricado a partir de glóbulos coalescidos formados a partir de tropoelastina con un intervalo de diámetros aparentes de aproximadamente 0,5-20  $\mu\text{m}$ , preparado mediante el tratamiento de una solución de tropoelastina de 75 mg/ml con base en presencia de HA al 1 % (p/v), seguido de incubación a 37 °C durante la noche.

Figura 5: Distribución por tamaños de los glóbulos (diámetro del glóbulo ( $\mu\text{m}$ ) vs. porcentaje de glóbulos contados) preparados mediante el tratamiento de (o) 10 mg/ml de tropoelastina; (•) 25 mg/ml de tropoelastina; (□) 50 mg/ml de tropoelastina; y (▪) 75 mg/ml de tropoelastina con álcali en presencia de HA al 1 % (p/v), seguido de incubación a 37 °C durante la noche.

Los datos se obtienen de las imágenes de SEM de las Figuras 4A-4D.

Figuras 6A y 6B: Imagen de SEM de material fabricado de glóbulos coalescidos formados a partir de tropoelastina de diferentes tamaños preparado mediante el tratamiento de una solución de tropoelastina de 100 mg/ml con GA al 0,05 % (v/v) en presencia de CMC al 1 % (p/v), seguido de agitación a 37 °C durante 4 h.

Figuras 7A y 7B: Imágenes de SEM de material fabricado de glóbulos coalescidos formados a partir de tropoelastina preparadas mediante el tratamiento de una solución de 100 mg/ml de tropoelastina con álcali en presencia de CMC al 1 % (p/v), seguido de incubación con agitación a 37 °C durante 4 h.

Figuras 7C y 7D: Imágenes de SEM de material fabricado de glóbulos coalescidos formados a partir de tropoelastina preparadas mediante el tratamiento de una solución de 100 mg/ml de tropoelastina con álcali en presencia de CMC al 1 % (p/v), seguido de incubación con agitación a 37 °C durante 4 h, refrigeración a 4 °C durante 16 h y, después, neutralización de la solución con HCl 1 M.

Figura 8A y 8B: Imagen de SEM del material fabricado mediante el tratamiento de una solución de tropoelastina de 100 mg/ml con GA al 0,05 % (v/v) en presencia de goma xantana al 1,5 % (p/v), seguido de agitación a 37 °C durante 4 h.

Figura 9A y 9B: Fotografía e imagen de SEM de material fabricado mediante el tratamiento de una solución de tropoelastina de 100 mg/ml con GA al 0,05 % (v/v) en presencia de HPC al 2 % (p/v), seguido de agitación a 37 °C durante 4 h.

#### Descripción detallada de las realizaciones

Los inventores han descubierto que cuando la tropoelastina se coacerva y se reticula para formar elastina, y/o se somete a polimerización alcalina para formar un material elástico (como en la patente WO 2008/058323) con un alto contenido de sólidos de tropoelastina, se forma una masa que no puede pasar a través de una aguja quirúrgica. Los inventores han descubierto que la masa no inyectable se forma porque, con un alto contenido de sólidos, los monómeros de tropoelastina se agregan o coalescen en micropartículas o glóbulos que, además, se agregan o coalescen para formar una masa no inyectable. Los inventores han descubierto además que la formación de la masa no inyectable con un alto contenido de sólidos de tropoelastina puede reducirse, si no evitarse, coacervando o polimerizando la tropoelastina en presencia de un agente de control de la coalescencia, lo que resulta en la formación de una composición que tiene un alto contenido de sólidos y las propiedades de flujo requeridas en una composición inyectable. Además, se ha descubierto que, ajustando las cantidades relativas de tropoelastina y agente de control de la coalescencia, es posible controlar el grado de agregación de los glóbulos, produciendo así una sustancia que contiene tropoelastina en forma de glóbulos agregados de tamaño o estructura predeterminados con las propiedades de flujo deseadas para aplicaciones inyectables. También es posible producir una sustancia que contiene tropoelastina en forma de una masa que también es inyectable, pero que está sustancialmente desprovista de una estructura microparticular o globular. En este caso, el material inyectable puede describirse mejor como una masa deformable que como partículas o glóbulos discretos. Esto es notable porque normalmente las masas formadas a partir de tropoelastina reticulada o polimerizada con álcalis no son fácilmente inyectables. Estas realizaciones son particularmente ventajosas en circunstancias en las que una aplicación clínica o cosmética requiere un implante que pueda inyectarse en la zona de aplicación.

## I Definiciones

Se entenderá que “tropoelastina” se refiere a una proteína que contiene al menos parte de un dominio hidrófobo derivado de una molécula de proteína que puede estar reticulada, usualmente en los residuos de lisina, mediante la lisil oxidasa, para formar elastina. Se conocen cierto número de isoformas de tropoelastina (véase, por ejemplo, la patente WO 99/03886). La tropoelastina no se puede encontrar normalmente en una cantidad significativa en el tejido, ya que tiende a reticularse para formar elastina más o menos inmediatamente después de la síntesis. La tropoelastina puede tener una secuencia que es la misma que la entrada que se muestra en la entrada AAC98394 de GenBank. En la técnica se conocen otras secuencias de tropoelastina, que incluyen, aunque no de forma limitativa, CAA33627 (Homo sapiens), P15502 (Homo sapiens), AAA42271 (Rattus norvegicus), AAA42272 (Rattus norvegicus), AAA42268 (Rattus norvegicus), AAA42269 (Rattus norvegicus), AAA80155 (Mus musculus), AAA49082 (Gallus gallus), P04985 (Bos taurus), ABF82224 (Danio rerio), ABF82222 (Xenopus tropicalis), P11547 (Ovis aries). La tropoelastina también puede ser un fragmento de estas secuencias. Un ejemplo son los aminoácidos 27 a 724 del AAC98394. Otro ejemplo de tropoelastina se describe en la entrada P15502 de UniProtKB/Swiss Prot. El término tropoelastina también pretende referirse a un péptido similar a la elastina o “ELP”. La tropoelastina puede ser natural o recombinante. Por ejemplo, la tropoelastina se puede obtener a partir de un sistema de expresión recombinante, cuyos ejemplos se describen en las patentes WO 00/04043 y WO 94/14958, y WO 99/03886, o a partir de la síntesis de péptidos, tal como la síntesis de péptidos en fase sólida.

Un “homólogo de tropoelastina” se refiere a una proteína que tiene una secuencia que no es la misma que, pero que es afín a, una secuencia de referencia de tropoelastina. También tiene la misma función que la secuencia de referencia.

“Elastina” se refiere a una proteína de la matriz extracelular que normalmente se encuentra en la piel, los vasos sanguíneos, los pulmones y otros tejidos y órganos que requieren elasticidad para su formación. Se forma cuando los residuos de lisina de las moléculas de tropoelastina se reticulan covalentemente para formar una masa que es más o menos insoluble en una solución acuosa. La reticulación de las moléculas de tropoelastina in vivo se produce clásicamente a través de una o más lisil oxidasas. La reticulación de las moléculas de tropoelastina puede estar mediada in vitro por agentes reticulantes químicos tales como el glutaraldehído o el hexametildisocianato u otros agentes reticulantes capaces de reaccionar con proteínas. Los ejemplos de reticulantes reactivos con aminas incluyen disuccinimidilo glutarato (DSG), bis(sulfosuccinimidil)suberato (BS3), diglicidil éter de etilenglicol (EGDE) en condiciones neutras (pH 7), aminotriacetato de tris-succinimidilo (TSAT), disuccinimidilo suberato (DSS) y ácido  $\alpha$ -[tris(hidroxiometil)fosfina]propiónico (THPP). Los ejemplos de reticulantes reactivos al carboxilo incluyen clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y el diglicidil éter de etilenglicol (EGDE) en condiciones ácidas (pH<4). Como la tropoelastina se puede proporcionar en una variedad de formas, la elastina en sí misma puede estar compuesta de una variedad de estructuras, lo que influye en las propiedades elásticas de la elastina. No es necesario que el grado de reticulación sea completo, ya que todos los sitios reactivos potenciales en las moléculas de tropoelastina están reticulados. En cambio, la tropoelastina puede estar solo parcialmente reticulada.

“Coacervación” y “coacervar” se refieren a un proceso mediante el cual la tropoelastina, que generalmente es soluble en solución acuosa a bajas temperaturas, tiende a agregarse para formar una fase viscoelástica densa a medida que la temperatura se eleva hasta un intervalo fisiológico. El proceso se debe principalmente a las interacciones entre los dominios hidrófobos de la tropoelastina. Generalmente, se entiende que la coacervación es un precursor esencial de la reticulación covalente en la formación de elastina a partir de la tropoelastina.

Un “material elástico” se refiere a un material formado a partir de tropoelastina mediante un proceso de polimerización alcalina que implica los dominios hidrófilos de la tropoelastina, tal como se describe en la patente WO 2008/058323, un proceso irreversible que forma un sólido que tiene propiedades elásticas al ser estirable, resistente a la tracción, resiliente y capaz de retroceso. El material elástico puede estar solo parcialmente polimerizado; en ciertas realizaciones, la reacción de polimerización no está completa. El material elástico posee propiedades elásticas, ya esté reticulado o no; por lo tanto, el proceso de polimerización alcalina para formar material elástico también puede incluir opcionalmente una etapa de reticulación química.

“Glóbulos formados a partir de tropoelastina” o “micropartículas formadas a partir de tropoelastina” se refieren a partículas que contienen o consisten en uno o ambos de “elastina” y “material elástico”. Estas partículas tienden a coalescer o agregarse aún más en una masa no inyectable en ausencia de un agente de control de la coalescencia.

Una “composición inyectable sustancialmente desprovista de estructura en partículas” es una composición formada a partir de tropoelastina, en la que los glóbulos formados a partir de tropoelastina se han coalescido o agregado hasta el punto de que la estructura globular o en partículas de la composición ya no es evidente. A pesar de esto, la composición sigue siendo inyectable.

El término “agente de control de la coalescencia” se refiere a un compuesto o extracto que reduce, inhibe o controla de cualquier otra manera la agregación, la aglutinación o la coalescencia de partículas o glóbulos formados a partir de la tropoelastina, para permitir que la composición producida mediante un proceso de la invención tal como se define en las reivindicaciones se transmita, generalmente mediante presión positiva a través de una aguja o cánula que tiene un orificio o calibre que se usa generalmente en aplicaciones clínicas o cosméticas. El agente de control de la

coalescencia generalmente aumenta la viscosidad de la fase líquida en la que se produce la coacervación o polimerización de la tropoelastina para formar elastina o un material elástico. En ciertas realizaciones, el agente de control de la coalescencia impide que los glóbulos formados a partir de la tropoelastina experimenten una coalescencia aún mayor entre sí. En ciertas realizaciones, el agente de control de la coalescencia evita o inhibe que un material que contiene tropoelastina que está sustancialmente desprovisto de estructura en partículas forme un sólido no inyectable.

La expresión “una cantidad eficaz para reducir la coalescencia” se refiere a una cantidad de agente de control de la coalescencia que es suficiente para inhibir, ralentizar, retrasar o prevenir sustancialmente la coalescencia de los glóbulos formados a partir de la tropoelastina. No es necesario impedir que todos los glóbulos se agreguen o experimenten coalescencia con otros glóbulos. En ciertas realizaciones, es preferible que se produzca una mayor coalescencia de los glóbulos, siempre que esto no impida sustancialmente la inyección de la composición. En particular, en ciertas realizaciones, la cantidad eficaz para prevenir la coalescencia proporciona una composición inyectable sustancialmente desprovista de estructura en forma de partículas o globular.

Una “composición inyectable” se refiere a una composición que tiene propiedades que le permiten fluir a través de una aguja o cánula. Típicamente, la aguja o cánula tendrá un orificio o calibre usado generalmente en aplicaciones clínicas o cosméticas. En ciertas realizaciones, la composición pasará sin obstáculos significativos a través de una aguja o cánula con un diámetro interno de aproximadamente 1,194 mm, correspondiente a una aguja de calibre 16 (G). Más preferiblemente, la composición pasará fácilmente a través de una aguja de 21G. Aún más preferiblemente, la composición pasará fácilmente a través de una aguja 27G.

El término “defecto tisular” se refiere a una anomalía, malformación o imperfección que culmina en una estructura y/o función tisular anormal. Un defecto tisular puede provenir de, o estar generalmente asociado con, una afección congénita, un procedimiento quirúrgico, un traumatismo, una enfermedad u otra lesión. Alternativamente, un defecto tisular puede estar asociado con el envejecimiento. Los ejemplos incluyen pérdida de elasticidad del tejido, pérdida del volumen del tejido, arrugas y flacidez del tejido. El “defecto tisular” también puede referirse al tejido que se encuentra dentro del intervalo anatómico y fisiológicamente normal de estructura y función que un paciente considera inadecuado y desea realzar.

“Corregir un defecto tisular” se refiere a restaurar y/o realzar, al menos parcialmente, la estructura y/o función del tejido, lo que incluye sostener, mejorar, realzar el volumen o la elasticidad del tejido o facilitar el crecimiento del tejido dentro de un defecto tisular.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de composición inyectable requerida para alterar o corregir el defecto tisular. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de la capacidad del paciente para absorber o descomponer los componentes de la composición inyectable, la naturaleza de la afección que se está tratando, la zona del tratamiento, la composición de la composición inyectable, la concentración y las propiedades de los glóbulos formados a partir de tropoelastina o, alternativamente, la cantidad y la naturaleza de la masa que contiene tropoelastina que carece sustancialmente de estructura en partículas.

## II) Composiciones y formulaciones

Se proporciona un proceso para producir una composición de tropoelastina tal como se define en las reivindicaciones. La composición de tropoelastina producida puede ser una composición inyectable para corregir un defecto tisular, lo que incluye la composición una fase líquida que contiene una pluralidad de partículas o glóbulos formados a partir de tropoelastina, teniendo la fase líquida un agente de control de la coalescencia disuelto en la misma en una cantidad eficaz para reducir la coalescencia de los glóbulos.

Típicamente, el tamaño promedio de los glóbulos formados a partir de tropoelastina estará en el intervalo de 0,1 micrómetros a 100 micrómetros. Los glóbulos pueden proporcionarse en forma de esfera o microesfera. El intervalo de diámetros preferido de las microesferas es generalmente de aproximadamente 0,05  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 0,1  $\mu\text{m}$  a 25  $\mu\text{m}$ . En ciertas realizaciones, los glóbulos están sustancialmente coalescidos, lo que proporciona a la composición una apariencia no particulada.

La tropoelastina se incluye en la composición en una cantidad de aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml. Preferiblemente, la tropoelastina se incluye en una cantidad de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml. Más preferiblemente, la tropoelastina se incluye en una cantidad de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.

Como se describe en la presente memoria, cada glóbulo está formado por tropoelastina, lo que significa que el propio glóbulo puede incluir elastina, un material elástico o ambos. En consecuencia, los glóbulos pueden estar formados por tropoelastina covalentemente reticulada o no reticulada o por ambas.

La composición inyectable producida tendrá típicamente una apariencia más particulada, donde la composición posea glóbulos discretos o, de forma más típica, parcialmente agregados o coalescidos cuando la concentración de tropoelastina es de aproximadamente 50 mg/ml o inferior. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la

aparición en partículas resulta de un nivel reducido de coalescencia o agregación de glóbulos a concentraciones más bajas de tropoelastina.

5 En otras realizaciones, se proporciona un proceso para producir una composición de tropoelastina tal como se define en las reivindicaciones. La composición de tropoelastina producida puede ser una composición inyectable para corregir un defecto tisular, lo que incluye la composición glóbulos agregados formados a partir de tropoelastina y un agente de control de la coalescencia en una cantidad eficaz para reducir la coalescencia de los glóbulos.

10 La composición inyectable producida tendrá típicamente una apariencia menos particulada cuando la concentración de tropoelastina sea de aproximadamente 50 mg/ml o más. De nuevo, sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el aumento de la concentración de tropoelastina resulta en un aumento de la coalescencia o agregación de los glóbulos, lo que resulta en una composición inyectable con una estructura reducida globular o en forma de partículas.

15 La composición producida según el proceso de la invención incluye un agente de control de la coalescencia, especialmente un agente para proporcionar propiedades de flujo a la sustancia que contiene tropoelastina.

20 Los agentes de control de la coalescencia son generalmente biocompatibles, por ejemplo, pueden mostrar baja toxicidad y ser no inmunogénicos. Los agentes de control de la coalescencia pueden ser moléculas sintéticas, semisintéticas o naturales.

En una realización, el agente de control de la coalescencia posee una carga negativa neta cuando se disuelve en la fase líquida. En otra realización, el agente de control de la coalescencia incluye grupos funcionales que poseen una carga negativa neta cuando se disuelven en la fase líquida.

25 En una realización, el agente de control de la coalescencia incluye grupos funcionales fuertemente ácidos, por ejemplo, carboxilatos, sulfatos, fosfatos, etc. En otra realización, el agente de control de la coalescencia incluye grupos funcionales hidroxilo. El agente de control de la coalescencia puede ser un poliol que posea múltiples grupos funcionales hidroxilo.

30 En ciertas realizaciones, el agente de control de la coalescencia es un polisacárido. Los polisacáridos son estructuras de carbohidratos poliméricos, formadas por unidades repetitivas (típicamente monosacáridos o disacáridos) unidas entre sí por enlaces glucosídicos. Estas estructuras son frecuentemente lineales, pero pueden contener diversos grados de ramificación. Los polisacáridos son frecuentemente bastante heterogéneos y contienen leves modificaciones de la unidad repetitiva. Dependiendo de la estructura, estas macromoléculas pueden tener propiedades distintas a las de sus componentes básicos de oligosacáridos.

35 Preferiblemente, el polisacárido contiene grupos funcionales cargados negativamente. En otra realización preferida, el agente de control de la coalescencia es un polisacárido que contiene residuos de ácido idurónico, ácido glucurónico o N-acetilglucosamina. Los polisacáridos adecuados incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ácido hialurónico, goma xantana, goma guar,  $\beta$ -glucano, alginatos, carboximetildextrano y sus sales farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, el polisacárido puede ser una pectina o un derivado de la misma, incluidos los polisacáridos lineales y ramificados.

40 En otra realización, el agente de control de la coalescencia es un mono u oligosacárido, por ejemplo 3'-N-acetilneuraminil-N-acetilglucosamina, 3'-sialil-N-acetilglucosamina, 3"-N-acetilneuraminil-3-fucosil-lactosa, 6'-sialil-N-acetilglucosamina, N-acetilglucosamina, glucosa, lactosa, maltotritol, sacarosa, LS-tetrasacárido b y sus sales farmacéuticamente aceptables. Otros agentes de control de la coalescencia incluyen dextrinas, tales como succinil- $\beta$ -ciclodextrina, carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina y sus sales farmacéuticamente aceptables.

45 Un derivado de polisacárido puede incluir, aunque no de forma limitativa, un polisacárido reticulado o no reticulado que tiene típicamente una cadena lateral de sustitución o adicional que comprende uno o más grupos que consisten en hidrógeno; alquilo; arilo; alquilarilo; arilalquilo; alquilarilo sustituido que contiene un átomo o átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo; arilalquilo sustituido que contiene un átomo o átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, halógeno o ion de metal; heterociclo sustituido que contiene un átomo o átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, halógeno o ion de metal; y, cuando dichos grupos sustituidos pueden estar unidos directamente entre sí o separados por un miembro seleccionado del grupo que consiste en éter, cetona, amino, oxicarbonilo, sulfato, sulfóxido, carboxamida, alquino y alqueno; incluido donde dichas sustituciones o cadenas laterales adicionales terminan con grupos que incluyen, aunque no de forma limitativa, hidrógeno, péptido, aldehído, amina, arilazida, hidrazida, maleimida, sulfhidrido, éster activo, éster, carboxilato, imidoéster, halógeno o hidroxilo. En ciertas realizaciones, un derivado de polisacárido incluye un polisacárido que se ha reticulado usando un reticulante químico que incluye, aunque no de forma limitativa, divinilsulfona (DVS), diglicidil éter de 1,4-butanodiol (BDDE), 1,2,7,8-diepoxioctano (DEO) u otros reticulantes generalmente conocidos por los expertos en la técnica.

50 El agente de control de la coalescencia puede ser una glicoproteína, tal como mucina.

65

En otra realización, el agente de control de la coalescencia es un aminoácido. Preferiblemente, el aminoácido presenta una cadena lateral ácida. Los aminoácidos adecuados incluyen ácido aspártico, ácido glutámico y sus sales farmacéuticamente aceptables.

5 En otra realización, el agente de control de la coalescencia es un lípido o éster de ácido graso. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen, por ejemplo, fosfolípidos, dipalmitoilfosfatidilcolina y monooleato de glicerilo. Los ésteres de ácidos grasos se pueden usar junto con otros agentes. Por ejemplo, se pueden usar conjuntamente entre sí propilenglicol y fosfolípidos.

10 En otra realización, el agente de control de la coalescencia es un polímero sintético. Dichos polímeros incluyen, por ejemplo, polimetacrilatos, polietilenglicoles y copolímeros (de bloque) con subunidades de polietilenglicol. Por ejemplo, los copolímeros poloxámero 188 y poloxámero 407 pueden ser adecuados para usar como agentes de control de la coalescencia.

15 En otra realización, el agente de control de la coalescencia es un surfactante. Los ejemplos de surfactantes adecuados incluyen laurilsulfato de sodio y polisorbatos.

Los agentes de control de la coalescencia preferidos incluyen pantotenol, polietilenglicoles, goma xantana, goma guar, polisorbato 80, N-acetilglucosamina y sus sales farmacéuticamente aceptables. Los agentes de control de la coalescencia especialmente preferidos son carboximetilcelulosa, ácido hialurónico, goma xantana, hidroxipropilmetilcelulosa y hidroxipropilcelulosa y sus sales farmacéuticamente aceptables. Típicamente, cuando el agente de control de la coalescencia es un polisacárido, el agente se proporciona en la composición en una cantidad de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10 por ciento (p/v). Preferiblemente, cuando el agente de control de la coalescencia es un polisacárido, el agente se proporciona en una cantidad de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 3,5 por ciento (p/v).

20 Cuando el agente de control de la coalescencia es carboximetilcelulosa o goma xantana, el agente se puede proporcionar en una cantidad de aproximadamente el 0,01 al 10 por ciento (p/v). En una realización preferida, cuando el agente de control de la coalescencia es carboximetilcelulosa o goma xantana, el agente se proporciona en una cantidad del 0,5 al 3,5 por ciento (p/v).

30 Cuando el agente de control de la coalescencia es ácido hialurónico, el agente se puede proporcionar en una cantidad de aproximadamente el 0,01 al 10 por ciento (p/v). En una realización preferida, cuando el agente de control de la coalescencia es ácido hialurónico, el agente se proporciona en una cantidad del 0,5 al 3,5 por ciento (p/v).

35 Cuando el agente de control de la coalescencia es un PEG, el agente se puede proporcionar en una cantidad de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 90 por ciento (p/v).

40 Se entenderá que la cantidad eficaz de agente de control de la coalescencia proporcionada depende de cierto número de factores, por ejemplo, las propiedades del agente de control de la coalescencia, la naturaleza de los otros componentes de la composición y el método usado para formar la composición. En particular, la cantidad eficaz de agente de control de la coalescencia dependerá de la concentración de tropoelastina en la composición. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la cantidad de agente de control de la coalescencia requerida para prevenir la coalescencia aumenta a medida que también aumenta la concentración de tropoelastina en la composición. Además, la naturaleza del agente de control de la coalescencia afectará a su capacidad para controlar la coalescencia.

45 En consecuencia, la invención proporciona un proceso para producir una composición que incluye tropoelastina y un agente de control de la coalescencia de polisacáridos tal como se define en las reivindicaciones, en donde la relación de masa de tropoelastina a polisacárido es de aproximadamente 0,05:1 a 3000:1. Preferiblemente, la relación de tropoelastina a polisacárido es de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 500:1. Más preferiblemente, la relación de tropoelastina a polisacárido es de aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 100:1.

50 En las realizaciones, la invención proporciona un proceso para producir una composición que incluye tropoelastina y carboximetilcelulosa, en donde la relación en masa de tropoelastina a carboximetilcelulosa es de 0,1:1 a aproximadamente 500:1. En ciertas realizaciones, la relación en masa de tropoelastina a carboximetilcelulosa es de aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 100:1.

55 En realizaciones adicionales, la invención proporciona un proceso para producir una composición que incluye tropoelastina y goma xantana, en donde la relación de masa de tropoelastina a goma xantana es de 0,1:1 a aproximadamente 500:1. En ciertas realizaciones, la relación en masa de tropoelastina a goma xantana es de aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 100:1. En realizaciones adicionales, la invención proporciona un proceso para producir una composición que incluye tropoelastina y ácido hialurónico, en donde la relación de masa de tropoelastina a ácido hialurónico es de 0,1:1 a aproximadamente 500:1. En ciertas realizaciones, la relación de masa de tropoelastina a ácido hialurónico es de aproximadamente 0,2:1 a aproximadamente 100:1.

En una realización, el agente para proporcionar propiedades de flujo a una sustancia que contiene tropoelastina excluye, o no es, PEG o DMSO.

En otras realizaciones, la composición producida según un proceso de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, también puede incluir una fase líquida. Se entenderá que “fase líquida” se refiere generalmente a un vehículo líquido biológicamente aceptable que es adecuado para la inyección. Típicamente, el disolvente de la fase líquida será agua. Las fases líquidas preferidas incluyen soluciones acuosas tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS). La fase líquida puede incluir tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos. En otra realización, la fase líquida incluye al menos un agente previsto para alterar la fuerza iónica de la fase líquida.

La composición producida según un proceso de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede incluir uno o más agentes, principios activos o ingredientes adicionales. Los agentes adicionales pueden proporcionar un efecto terapéutico, tal como la estimulación de la reparación tisular. Alternativamente, los agentes adicionales pueden prevenir o limitar una respuesta tisular desfavorable. Además, los agentes adicionales pueden ayudar a la estabilidad o viabilidad de la composición inyectable. En ciertas realizaciones, se proporcionan otros compuestos como diluyentes, portadores, excipientes o compuestos similares.

Los agentes adicionales pueden estar presentes (disueltos o suspendidos) en la fase líquida de la composición. Alternativamente, los agentes adicionales pueden estar presentes en los glóbulos de la composición.

En una realización, pueden incluirse en la composición agentes farmacéuticos, incluidos antibióticos, promotores del crecimiento, antiinfecciosos, antisépticos, compuestos angiogénicos, agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, inhibidores de proteasas y similares.

En otra realización, pueden incluirse en la composición factores biológicos tales como factores tisulares, citocinas, factores de crecimiento y similares. Son especialmente preferidos los factores implicados en la cicatrización de heridas, la fibrosis y la granulación.

En otra realización, pueden incluirse células en la composición, en particular, células que participan en la cicatrización de heridas. Los ejemplos incluyen células epiteliales, fibrocitos, fibroblastos, precursores de queratinocitos, queratinocitos, miofibroblastos, fagocitos y similares.

La composición se puede envasar de diversas maneras, incluido un contenedor en el que se haya depositado la composición en una forma apropiada. Los contenedores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como frascos (plástico y vidrio), jeringas, bolsitas, ampollas, bolsas de plástico, cilindros metálicos y similares. El contenedor también puede incluir un conjunto a prueba de manipulaciones para evitar el acceso indebido al contenido del envase. Además, el contenedor puede tener depositada sobre el mismo una etiqueta que describe el contenido del contenedor. La etiqueta también puede incluir las advertencias apropiadas.

### III Métodos de fabricación

La invención proporciona un proceso para producir una composición formada a partir de tropoelastina que incluye la etapa de coacervar o polimerizar la tropoelastina en una fase líquida que tiene un agente de control de la coalescencia disuelto en la misma.

Una ventaja importante del proceso es que la composición producida por el mismo puede inyectarse sin etapas adicionales de manipulación o procesamiento. Este es un aspecto distintivo de la invención, ya que muchas de las composiciones de biomateriales inyectables conocidas actualmente en la técnica requieren etapas de procesamiento adicionales (por ejemplo, lavado para eliminar los agentes de reticulación) antes de poder inyectarlas.

Otra ventaja importante del proceso es que la composición producida a partir del proceso contiene un alto contenido de sólidos de tropoelastina al tiempo que mantiene la propiedad inyectable de la composición. Este es también un aspecto distintivo de la invención en comparación con otras composiciones que contienen biomateriales conocidas en la técnica.

Generalmente, una solución de tropoelastina que tenga una concentración superior a aproximadamente 1,5 mg/ml es capaz de formar una composición inyectable de integridad deseable, aunque también son útiles concentraciones menores. En la mayoría de las aplicaciones, la concentración de la solución es inferior a aproximadamente 400 mg/ml. Por lo tanto, es preferible una solución de tropoelastina que tenga una concentración de aproximadamente 1,5 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml. Más preferiblemente, se usa una solución de tropoelastina que tiene una concentración de entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml. Lo más preferiblemente, se usa una solución de tropoelastina que tiene una concentración de entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml.

La concentración de sales de la fase líquida se puede controlar añadiendo sales, lo que incluye cualquier compuesto iónico, o especies de bajo peso molecular capaces de afectar a la osmolalidad de la solución. Por ejemplo, se pueden usar NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o glucosa. Una sal preferida es NaCl.

5 Donde la intención sea formar una composición formada a partir de tropoelastina que consiste en elastina (o tropoelastina reticulada), la temperatura de la solución puede elevarse a intervalos fisiológicos de aproximadamente 37 °C, de modo que se forme una fase viscoelástica. Se puede añadir un agente de reticulación tal como el glutaraldehído antes de esta etapa de coacervación o se puede añadir después.

10 Donde la intención sea formar una composición formada a partir de tropoelastina que incluya material elástico, un pH de aproximadamente 7,5 o más es suficiente para provocar la formación de un material elástico a partir de la tropoelastina en la solución. Generalmente, se evita que el pH supere aproximadamente un pH de 13, ya que por encima de este, el material elástico está menos formado. Más preferiblemente, es deseable un pH de entre aproximadamente un pH de 9 y un pH de 13. Sin embargo, lo más preferiblemente se usa un pH de entre  
15 aproximadamente un pH de 10 y un pH de 11. Otras medidas de pH que podrían usarse incluyen 8,0, 8,5, 9,5, 10, 10,5 y 11,5. Se puede añadir un agente de reticulación, tal como glutaraldehído, antes del cambio de pH, o se puede añadir después.

20 La alcalinidad se puede ajustar mediante cierto número de planteamientos que incluyen 1) añadir directamente una sustancia que aumenta el pH a una solución de tropoelastina, 2) mezclar una solución que contenga cantidades suficientes de una sustancia que aumenta el pH para que sea alcalina con una solución de tropoelastina. La sustancia que aumenta el pH podría ser una base, un tampón o un material adsorbente de protones. Se ha descubierto que los ejemplos que incluyen la base Tris, NH<sub>4</sub>OH y NaOH son útiles como sustancias que aumentan o controlan el pH.

25 Donde el pH sea alcalino y sea inferior a aproximadamente 9,5, pueden requerirse sales para formar el material elástico. Donde se usen sales, la concentración es generalmente superior a 25 mM y puede ser de hasta 200 mM. Preferiblemente, la concentración de sales está entre aproximadamente 100 mM y 150 mM. Más preferiblemente, la concentración de sales es de aproximadamente 150 mM. A medida que el pH disminuye (aunque permaneciendo alcalino) por debajo de un pH de 10, se requieren sales para provocar la formación del material elástico y la cantidad  
30 de sales requerida aumenta a medida que disminuye el pH. Así, por ejemplo, a un pH de aproximadamente 9 a 10, se requieren sales; por ejemplo, se debe proporcionar a la solución una concentración de sal equivalente a aproximadamente 60 mM. En algunas realizaciones, la solución debe tener una osmolaridad equivalente a la de la solución salina isotónica de mamíferos (150 mM) o menos. En otras realizaciones, la solución es tener una osmolaridad superior a 150 mM. La concentración de sales también puede ser de 0 mM.

35 La concentración de sales de la solución se puede controlar añadiendo sales, lo que incluye cualquier compuesto iónico, iones monovalentes o divalentes, o especies de bajo peso molecular capaces de afectar a la osmolalidad de la solución. Por ejemplo, se pueden usar NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> o glucosa. Una sal preferida es NaCl.

40 Opcionalmente, la fase líquida se puede agitar durante la coacervación. La fase líquida se puede agitar por medios mecánicos, por ejemplo, mediante el uso de un aparato agitador magnético, mezcla manual o colocación en un agitador orbital.

45 El proceso según la presente invención puede llevarse a cabo en condiciones estériles para garantizar que las composiciones producidas por el proceso sean adecuadas para usar in vivo.

En otra realización, el pH de la composición puede ajustarse a un valor que esté dentro de un intervalo fisiológicamente aceptable. En otra realización, la fuerza iónica de la composición se ajusta dentro de un intervalo fisiológicamente aceptable.

#### 50 Dispositivos y kits IV

En ciertas realizaciones, la composición de tropoelastina producida mediante un proceso de la invención tal como se define en las reivindicaciones puede proporcionarse en forma de un dispositivo, desechable o reutilizable, que incluye  
55 un receptáculo para contener la composición. En una realización, el dispositivo es una jeringa. El dispositivo puede contener de 0,1 a 10 ml de la composición. Más preferiblemente, el dispositivo puede contener de 0,5 a 5 ml de la composición. La composición se puede proporcionar en el dispositivo en un estado que esté listo para su uso, por ejemplo, en forma reticulada, o en un estado que requiera la mezcla o la adición de componentes adicionales, tales como un reticulante (si se requiere reticulación).

60 En otras realizaciones, se proporciona un kit para su uso en una de las realizaciones descritas anteriormente, incluyendo el kit:

— un contenedor que contiene una composición producida mediante un proceso según la invención tal como se define en las reivindicaciones;

- una etiqueta o prospecto con instrucciones de uso.

En ciertas realizaciones, el kit puede contener uno o más principios activos o ingredientes, además de los glóbulos. Estos ingredientes activos se han descrito anteriormente.

El kit puede comprender un contenedor y una etiqueta o prospecto en el contenedor o asociado con él. Los contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, blíster, etc. Los contenedores pueden estar formados por una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El contenedor contiene la composición o formulación de la misma y puede tener una abertura de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o el prospecto indican que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como el aumento del volumen del tejido. En una realización, la etiqueta o el prospecto incluyen instrucciones de uso e indican que la composición se puede usar para tratar un trastorno o una complicación que surja de un defecto tisular.

El kit puede comprender (a) un primer contenedor con la composición producida mediante el proceso de la invención; y (b) un segundo contenedor con un principio o ingrediente activo contenido en el mismo. En esta realización, el kit puede también comprender un prospecto que indique que la composición y otro principio activo pueden usarse para tratar un trastorno. Alternativamente o de forma adicional, el kit puede también comprender un segundo (o tercer) contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyectables bacteriostática (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

#### V Métodos de tratamiento

En ciertas realizaciones, se proporciona el uso de la composición producida mediante un proceso según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, en la fabricación de una formulación o prótesis para corregir un defecto tisular, especialmente un defecto que requiere un realce dérmico o de tejidos blandos.

En otras realizaciones, se proporciona un método de realce dérmico de tejidos blandos, cuyo método incluye la administración de una cantidad eficaz de una composición producida mediante un proceso según la invención, tal como se define en las reivindicaciones, a un individuo que necesite dicho tratamiento.

Una persona adecuada para el tratamiento con este método puede presentar síntomas menores del proceso de envejecimiento, por ejemplo, pequeñas arrugas alrededor de los ojos y la boca, arrugas menores en los labios y una disminución leve del volumen de los labios. Alternativamente, los signos del envejecimiento pueden ser más pronunciados. Por ejemplo, una persona puede mostrar signos de envejecimiento más pronunciados, con arrugas profundas y una profundización del surco nasolabial. De forma adicional, puede haber atrofia o flacidez de las estructuras faciales, tales como las almohadillas de grasa malar. Aún más, un individuo puede desear realzar su apariencia en ausencia de cualquier signo de envejecimiento, por ejemplo, el individuo puede desear realzar el volumen de sus labios. En ciertas realizaciones, la composición puede inyectarse por vía intradérmica, intracutánea y/o subcutánea. La inyección de la composición proporciona un efecto de volumen o relleno, reduciendo la apariencia de arrugas o surcos o, alternativamente, proporcionando un efecto estéticamente agradable.

Otros defectos tisulares a los que se puede aplicar la composición producida mediante el proceso de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, incluyen las cicatrices dérmicas que surgen de, por ejemplo, enfermedades de la piel (tales como acné, paperas, varicela o sarampión), cicatrices causadas por traumatismos (lesiones o quemaduras) o por procedimientos quirúrgicos.

Otros defectos tisulares a los que se puede aplicar la composición incluyen la pérdida macroscópica de tejido o la atrofia, tal como la lipoatrofia en la región facial de los pacientes con VIH como efecto secundario de las terapias retrovirales.

En una realización, se proporciona el uso de la composición producida según un proceso de la invención tal como se define en las reivindicaciones para el tratamiento de una afección asociada con un esfínter incompetente. Un individuo adecuado para este tratamiento puede padecer una afección o una enfermedad tal como, por ejemplo, deficiencia intrínseca de esfínteres, incontinencia urinaria, enfermedad por reflujo gastrointestinal o reflujo vesicoureteral. Además, una persona adecuada para esta forma de tratamiento puede sufrir incontinencia fecal.

Típicamente, la composición se administra en la zona del defecto tisular mediante inyección, aunque pueden ser apropiadas otras vías de administración dependiendo de la naturaleza del defecto tisular. Cuando la composición se va a administrar por inyección, se puede usar un intervalo de calibres de aguja. El calibre usado depende, entre otras cosas, de la naturaleza del material que contiene tropoelastina (por ejemplo, su viscosidad) y de la naturaleza del defecto (por ejemplo, la profundidad de la zona de la inyección). Por ejemplo, cuando la composición está prevista para el uso en el realce de tejidos, el calibre de la aguja generalmente estará en el intervalo de entre aproximadamente 16G y 31G. Típicamente, para los rellenos dérmicos, el calibre de la aguja estará en el intervalo de entre

aproximadamente 25G y 31G. Las inyecciones dérmicas superficiales para arrugas finas pueden usar, por ejemplo, agujas con un calibre en el intervalo de 27-31G, mientras que puede ser necesaria una aguja de mayor calibre, tal como una aguja de 25G o 27G, para inyecciones profundas por debajo de la dermis. Para aplicaciones de incontinencia, el calibre de la aguja estará generalmente de entre aproximadamente 16G y aproximadamente 21G.

La composición se puede administrar durante cierto número de tratamientos para corregir el defecto tisular y/o para alcanzar o mantener el resultado deseado.

## Ejemplos

Los ejemplos que siguen pretenden ilustrar, pero no limitan en modo alguno, la presente invención. La invención se define por las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Producción de glóbulos formados a partir de tropoelastina a bajas concentraciones de tropoelastina mediante un proceso de polimerización alcalina.

### Materiales y métodos

Se disolvieron 20 mg de tropoelastina en 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4 °C durante la noche (16 horas estimadas) para proporcionar una concentración final de tropoelastina de 2 mg/ml. Manteniendo la solución en hielo durante todo el proceso, se midió el pH inicial de la solución (pH 7,2) y se añadieron 39 µl de NaOH 1 M para llevar el pH de la solución a un valor de 10,7. La solución resultante se incubó después a 37 °C durante 4 h en un tubo de 15 ml antes de retirarla de la incubadora y colocarla a temperatura ambiente.

### Resultados

Las micropartículas producidas tienden a recubrir la pared del tubo. Una imagen de SEM de una muestra de la solución (Figura 1A) muestra la presencia de micropartículas con un diámetro estimado de 1 µm. Las esferas tienden a agregarse entre sí debido a la naturaleza "pegajosa" del material de elastina.

Ejemplo 2: Polimerización alcalina de la tropoelastina en ausencia de un agente de control de la coalescencia a una concentración de 10 mg/ml.

### Materiales y métodos

Se disolvieron 50 mg de tropoelastina en 4,9 ml de PBS a 4 °C durante la noche (16 horas estimadas). Manteniendo la solución en hielo durante todo el proceso, se midió el pH inicial de la solución (pH 7,22) y se añadieron 47 µl de NaOH 1 M para llevar el pH de la solución a un valor de 10,7. Se añadieron 53 µl adicionales de PBS para preparar una solución de tropoelastina con una concentración final de 10 mg/ml. La solución se incubó después a 37 °C durante la noche (16 h) en un tubo de fondo plano de 5 ml antes de sacarla de la incubadora y colocarla a temperatura ambiente.

### Resultados

Como puede verse en la Figura 1B, el material producido era un material elástico sólido que conservaba la forma del tubo en el que se preparó. Se separaron más de 4,5 ml de fluido del sólido resultante, lo que sugiere que la mayor parte de los 50 mg de tropoelastina (>40 mg) estaban presentes en aproximadamente 0,5 ml de líquido en la construcción producida. En otras palabras, la tropoelastina está significativamente más concentrada en el sólido en comparación con el material de partida (10 mg/ml) debido a la densa agregación de tropoelastina a esta concentración en ausencia de un agente de control de la coalescencia.

Ejemplo 3: Producción de glóbulos en presencia de CMC como agente de control de la coalescencia mediante reticulación química.

### Materiales y métodos

Se produjo una solución madre de 200 mg/ml de tropoelastina disolviendo 300 mg de tropoelastina en 1,5 ml de PBS durante la noche a 4 °C. Se produjo una solución madre de carboximetilcelulosa de alta viscosidad al 2 % (p/v) (CMC; n.º de catálogo Sigma C5013) disolviendo 2 g de CMC en 100 ml de PBS con agitación durante la noche a temperatura ambiente. Manteniendo las soluciones en hielo durante todo el proceso, se mezclaron 250 µl de la solución madre de tropoelastina con 200 µl de PBS y 500 µl de CMC al 2 % (p/v). Se abrió un vial nuevo de solución de glutaraldehído (GA) al 25 % (v/v) sobre hielo y se mezclaron 2 µl de GA al 25 % (v/v) con 48 µl de PBS antes de añadirlos inmediatamente a la solución de tropoelastina. La mezcla resultante de 50 mg/ml de tropoelastina, CMC al 1 % (p/v) y GA al 0,05 % (v/v) se agitó usando una punta de pipeta enfriada (las puntas de pipeta se enfriaron previamente colocándolas a -20 °C durante la noche) antes de incubarse a 37 °C durante 24 horas en un tubo de fondo plano de 5 ml.

## Resultados

El material producido apareció rosado y viscoso después de 3 horas de incubación y se mantuvo igual después del resto del período de incubación de 24 horas. El material era capaz de pasar a través de una aguja de 29G y luego de una aguja de 31G y parecía volverse menos viscoso después del paso por la aguja. Una imagen de SEM de una muestra del material muestra una mezcla homogénea de glóbulos con un intervalo de diámetros de aproximadamente 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  (Figura 2). En esta formulación, es evidente un bajo nivel de coalescencia entre los glóbulos.

Ejemplo 4: Producción de glóbulos en presencia de HA como agente de control de la coalescencia mediante reticulación química.

## Materiales y métodos

### Solución madre de tropoelastina

Se añadieron  $\text{H}_2\text{O}$  (1 ml) + PBS (0,5 ml) a 200 mg de tropoelastina liofilizada y se mantuvo a 2-8 °C para que se disolviera; la concentración resultante, determinada midiendo la absorbancia UV a 280 nm de una dilución al 1/250 en  $\text{H}_2\text{O}$ , fue de 150 mg/ml. La concentración se determinó usando un coeficiente de extinción de 0,3125 ml/mg.cm.

### Solución madre de ácido hialurónico (HA)

Se preparó una solución al 2 % de HA en PBS añadiendo PBS esterilizado en autoclave a 1 g de HA (volumen final de 50 ml) y agitando con un agitador magnético. La muestra se almacenó a 2 - 8 °C.

### Solución madre de glutaraldehído

Se preparó una solución al 1 % de glutaraldehído añadiendo 2  $\mu\text{l}$  de GA al 25 % a 48  $\mu\text{l}$  de PBS y mezclando en un tubo Eppendorf. Todas las puntas se enfriaron a < 10 °C antes de su uso.

### Preparación y composición de la muestra de ensayo

Todos los componentes se mantuvieron en hielo hasta que se necesitaron. La cantidad requerida de soluciones madre de HA, PBS y tropoelastina se combinó en un tubo de 5 ml sobre hielo usando una pipeta. La composición resultante se mezcló usando un agitador magnético a 2-8 °C durante 2 minutos y se centrifugó brevemente en una centrífuga para eliminar cualquier burbuja de aire. Se añadió glutaraldehído y la composición resultante se mezcló usando un agitador magnético a 2-8 °C durante 2 minutos más. Se retiró la barra de agitación; la muestra se centrifugó brevemente en una centrífuga para eliminar cualquier burbuja de aire y después se incubó a 37 °C durante 16 horas. Composición final: 50 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 %, glutaraldehído al 0,05 %.

## Resultados

El material producido tenía la apariencia de un gel viscoso rosa. El material era capaz de pasar directamente a través de una aguja 31G y no cambiaba de aspecto después de pasar por la aguja. Una imagen de SEM de una muestra del material (Figura 3) muestra una mezcla homogénea de glóbulos con un diámetro aproximado de 1  $\mu\text{m}$ . La conectividad clara entre los glóbulos es evidente. El análisis SEM del material después de la extrusión a través de una aguja de 31G y después de un lavado con exceso de agua o PBS no reveló cambios en la estructura del material.

Ejemplo 5: Efecto de la valoración de la concentración de tropoelastina frente al agente de control de la coalescencia en la formación de glóbulos formados a partir de tropoelastina mediante catálisis alcalina.

## Materiales y métodos

Se produjo una solución madre de 200 mg/ml de tropoelastina disolviendo 300 mg de tropoelastina en 1,5 ml de PBS durante la noche a 4 °C. Se produjo una solución madre de ácido hialurónico (HA) al 2 % (p/v) (sal sódica de HA de cordón umbilical humano; n.º de catálogo Sigma H1876) disolviendo 100 mg de HA en 5 ml de PBS durante la noche a 4 °C.

Para producir una valoración volumétrica de la concentración de tropoelastina frente a la del HA, se prepararon las siguientes muestras mezclando las soluciones apropiadas en hielo:

Muestra A: 50  $\mu\text{l}$  de solución de tropoelastina + 450  $\mu\text{l}$  de PBS + 500  $\mu\text{l}$  de solución de HA. El pH inicial de 6,8 se ajustó mediante la adición de 4  $\mu\text{l}$  de NaOH 1 M para proporcionar un pH de 10,7. La solución final producida es 10 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 % (p/v).

Muestra B: 125 µl de solución de tropoelastina + 375 µl de PBS + 500 µl de solución de HA. El pH inicial de 6,8 se ajustó mediante la adición de 7 µl de NaOH 1 M para proporcionar un pH de 10,3. La solución final producida es 25 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 % (p/v).

5 Muestra C: 250 µl de solución de tropoelastina + 250 µl de PBS + 500 µl de solución de HA. El pH inicial de 6,8 se ajustó mediante la adición de 10,5 µl de NaOH 1 M para proporcionar un pH de 10,4. La solución final producida es 50 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 % (p/v).

10 Muestra D: 375 µl de solución de tropoelastina + 125 µl de PBS + 500 µl de solución de HA. El pH inicial de 6 se ajustó mediante la adición de 16 µl de NaOH 1 M para proporcionar un pH de 10,3. La solución final producida es 75 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 % (p/v).

Todas las muestras se incubaron después a 37 °C durante la noche (16 h) en un tubo de fondo plano de 5 ml.

## 15 Resultados

Muestra A: 10 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 % (p/v), pH 10,7

20 El material producido era un líquido blanco homogéneo capaz de pasar a través de una aguja de 30G después de extrusiones secuenciales a través de una aguja de 18G, 21G, 25G y 30G. Una imagen de SEM (Figura 4A) de la solución resultante revela una mezcla relativamente homogénea de glóbulos coalescentes formados a partir de tropoelastina con un intervalo de diámetros de aproximadamente 1 a 4 µm.

Muestra B: 25 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 % (p/v), pH 10,3

25 El material producido era una pasta blanca espesa formada en el fondo del tubo y cubierta por un líquido blanco. La pasta se puede mezclar con el resto de la solución; sin embargo, la solución siguió siendo bastante heterogénea y obstruyó una aguja de 29G; es probable que el material pudiera extruirse a través de una aguja de calibre más ancho, tal como la de 18G [Nota: La extrusión se intentó directamente en una aguja fija de 29G; aquí no se probó ningún planteamiento de extrusión secuencial]. Una imagen de SEM (Figura 4B) de la solución resultante después de la mezcla demuestra la presencia de glóbulos coalescidos con un intervalo de diámetros de aproximadamente 1 a 4 µm.

Muestra C: 50 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 % (p/v), pH 10,4

35 El material producido era una pasta/sólido blanco espeso formado en el fondo del tubo. Esta pasta podría mezclarse parcialmente con el líquido anterior, sin embargo, esto dio lugar a una suspensión heterogénea que contenía trozos de material sólido. No se podría pasar a través de una aguja de 29G, aunque es probable que el material se pueda extruir a través de una aguja de calibre más ancho, tal como la 18G [Nota: La extrusión se intentó directamente en una aguja fija de 29G; aquí no se probó ningún planteamiento de extrusión secuencial]. Una imagen de SEM (Figura 4C) de la solución resultante después de la mezcla demuestra la presencia de glóbulos coalescidos con un intervalo de diámetros de aproximadamente 1-10 µm.

Muestra D: 75 mg/ml de tropoelastina, HA al 1 % (p/v), pH 10,3

45 El material producido era una pasta/sólido blanco espeso formado en el fondo del tubo. Esta pasta podría mezclarse parcialmente con el líquido anterior, sin embargo, esto dio lugar a una suspensión heterogénea que contenía trozos de material sólido. No se podría pasar a través de una aguja de 29G, aunque es probable que el material se pueda extruir a través de una aguja de calibre más ancho, tal como la 18G [Nota: La extrusión se intentó directamente en una aguja fija de 29G; aquí no se probó ningún planteamiento de extrusión secuencial]. Una imagen de SEM (Figura 4D) de la solución resultante después de la mezcla demuestra la presencia de glóbulos coalescidos con un intervalo de diámetros de aproximadamente 0,5-20 µm.

50 Usando las imágenes de SEM anteriores, la distribución de tamaños de los diámetros de los glóbulos se muestra en la Figura 5. A medida que aumenta la concentración de tropoelastina, aumenta el tamaño de los glóbulos y el nivel de coalescencia.

Ejemplo 6: Efecto de la agitación sobre la formación de glóbulos en presencia de un agente de control de la coalescencia.

## 60 Materiales y métodos

65 Se produjo una solución de tropoelastina de 222 mg/ml disolviendo 100 mg de tropoelastina en 450 µl de PBS durante la noche a 4 °C. Se produjo una solución madre de carboximetilcelulosa de alta viscosidad al 2 % (p/v) (CMC; n.º de catálogo Sigma C5013) disolviendo 2 g de CMC en 100 ml de PBS durante la noche con agitación a temperatura ambiente. Manteniendo las soluciones en hielo durante todo el proceso, se mezclaron 450 µl de solución de tropoelastina con 500 µl de CMC al 2 % (p/v). Se abrió un vial nuevo de solución de glutaraldehído al 25 % (v/v) sobre

hielo y se mezclaron 2 µl de GA al 25 % (v/v) con 48 µl de PBS antes de añadirlos inmediatamente a la solución de tropoelastina. La mezcla resultante de 100 mg/ml de tropoelastina, CMC al 1 % (p/v) y GA al 0,05 % (v/v) se agitó usando una punta de pipeta enfriada (las puntas de pipeta se enfriaron previamente colocándolas a -20 °C durante la noche). La mezcla se colocó en una incubadora a 37 °C y se agitó usando un agitador magnético durante 4 horas. La solución se refrigeró después durante la noche (16 h) sin agitación.

#### Resultados

El material producido era rosado, opaco y viscoso después de la incubación inicial de 4 horas a 37 °C. Tras la refrigeración, el material se volvió levemente traslúcido (aunque se mantuvo rosado y viscoso); sin embargo, al calentarse a temperatura ambiente, rápidamente se volvió opaco una vez más. El material era capaz de pasar a través de una aguja de 31G. Tras el paso a través de una aguja, la solución se mantuvo inalterada.

Cuando se observó bajo el SEM, la muestra (Figuras 6A y 6B) mostró glóbulos coalescidos de diferentes tamaños.

Ejemplo 7: Producción de glóbulos en presencia de un agente de control de la coalescencia mediante un proceso de polimerización alcalina. Materiales y métodos

Se añadieron 450 µl de tropoelastina (222 mg/ml) a 500 µl de CMC al 2 % en hielo. Tras mezclar minuciosamente, el pH de la solución se ajustó de 7,1 a 10,2 con 19 µl de NaOH 1 M y, a continuación, se añadieron 31 µl de PBS mientras la muestra permanecía en hielo. La muestra se incubó después a 37 °C durante 4 h con agitación y después se almacenó a 4 °C. Para una muestra neutra, el pH se ajustó después a temperatura ambiente de 9,7 a 7,4 con 11 µl de HCl 1 M. Las soluciones resultantes contenían 100 mg/ml de tropoelastina, CMC al 1 % (p/v).

#### Resultados

El material producido era un líquido blanco homogéneo que era capaz de pasar a través de una aguja de 26G-29G. Una imagen de SEM de la solución alcalina (Figuras 7A y 7B) y la solución alcalina neutralizada (Figuras 7C y 7D) revela un material que comprende glóbulos coalescidos. Ambos materiales son un líquido viscoso marrón claro traslúcido a 4 °C que se convierte en un líquido viscoso blanco/marrón opaco con el calentamiento.

Ejemplo 8: Estabilidad de las micropartículas formadas a partir de tropoelastina en presencia de un agente de control de la coalescencia.

Las muestras producidas según el Ejemplo 4A y el Ejemplo 6 se almacenaron a 4 °C durante más de 60 días. Después de más de 60 días, el material seguía siendo susceptible de inyección y su aspecto no había cambiado según lo juzgado por SEM.

Ejemplo 9: Formación de material inyectable que comprende tropoelastina reticulada y goma xantana (GX)

#### Materiales y métodos

Se añadieron 450 µl de tropoelastina (222 mg/ml) a 500 µl de GX al 3 % en hielo y se mezclaron bien. Se abrió un vial nuevo de solución de glutaraldehído al 25 % (v/v) sobre hielo y se mezclaron 2 µl de GA al 25 % (v/v) con 48 µl de PBS antes de añadirlos inmediatamente a la solución de tropoelastina. La muestra se incubó después a 37 °C durante 4 h con agitación y después se almacenó a 4 °C. La mezcla resultante contenía 100 mg/ml de tropoelastina, GX al 1,5 % (p/v), GA al 0,05 % (v/v).

#### Resultados

El material producido era un gel viscoso rosa traslúcido a 4 °C que se convirtió en un gel rosa opaco con el calentamiento. Las imágenes de SEM (Figuras 8A y 8B) muestran que el material está compuesto de acreciones. El material era capaz de pasar a través de una aguja de 31G. Tras el paso a través de una aguja, la solución se mantuvo inalterada.

Ejemplo 10: Formación de material para su suministro a través de una aguja o cánula de orificio ancho que comprende tropoelastina reticulada y HPC

#### Materiales y métodos

Se añadieron 450 µl de tropoelastina (222 mg/ml) a 500 µl de hidroxipropilcelulosa (HPC) al 4 % en hielo y se mezclaron bien. Se abrió un vial nuevo de solución de glutaraldehído al 25 % (v/v) sobre hielo y se mezclaron 2 µl de GA al 25 % (v/v) con 48 µl de PBS antes de añadirlos inmediatamente a la solución de tropoelastina. La muestra se incubó después a 37 °C durante 4 h con agitación y después se almacenó a 4 °C. La mezcla resultante contenía 100 mg/ml de tropoelastina, HPC al 2 % (p/v), GA al 0,05 % (v/v).

## Resultados

Se produjo un material voluminoso, blando y de tinte rosado (Figura 9A). Las imágenes de SEM (Figura 9B) muestran que el material es fibroso con alguna evidencia de acreciones. El material podría hacerse pasar a través de un orificio de 2 mm con una jeringa.

Ejemplo 11 - Optimización de una formulación para su administración a través de una aguja de calibre fino

Se realizaron estudios de optimización para determinar los posibles límites de la relación de masa entre tropoelastina y agente de control de la coalescencia para una formulación de tropoelastina susceptible de inyección a través de calibres de aguja en el intervalo de 29G a 31G. Las muestras en negrita de la tabla siguiente no fueron capaces de pasar por una aguja de 29/31G.

| Agente                         | [tropoelastina]<br>(mg/ml) | [agente]<br>(p/v) | Alc. o Ret. <sup>a</sup> | Mezcla <sup>b</sup> | Relación de masa<br>tropoelastina:agente |
|--------------------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------|------------------------------------------|
| HA <sup>c</sup>                | 10                         | 1 %               | Alc.                     | No                  | 1:1                                      |
|                                | 25                         | 1 %               | Alc.                     | No                  | 2,5:1                                    |
|                                | 25                         | 1,5 %             | Ret.                     | No                  | 1,6:1                                    |
|                                | 50                         | 1 %               | Ret.                     | No                  | 5:1                                      |
|                                | 75                         | 0,5 %             | Ret.                     | No                  | 15:1                                     |
| CMC (visc. media) <sup>d</sup> | 10                         | 1,8 %             | Alc.                     | No                  | 0,56:1                                   |
|                                | 10                         | 1,9 %             | Alc.                     | No                  | 0,53:1                                   |
|                                | 25                         | 1,6 %             | Alc.                     | No                  | 1,56:1                                   |
|                                | 25                         | 1,75 %            | Alc.                     | No                  | 1,43:1                                   |
| CMC (visc. alta) <sup>e</sup>  | 10                         | 1 %               | Ret.                     | No                  | 1:1                                      |
|                                | 50                         | 1 %               | Ret.                     | No                  | 5:1                                      |
|                                | 90                         | 1 %               | Ret.                     | Sí                  | 9:1                                      |
|                                | 90                         | 1 %               | Alc.                     | Sí                  | 9:1                                      |
|                                | 100                        | 1 %               | Ret.                     | Sí                  | 10:1                                     |
|                                | <b>100</b>                 | <b>0,5 %</b>      | <b>Ret.</b>              | <b>Sí</b>           | <b>20:1</b>                              |
|                                | <b>150</b>                 | <b>1 %</b>        | <b>Ret.</b>              | <b>Sí</b>           | <b>15:1</b>                              |
| GX <sup>f</sup>                | 100                        | 1 %               | Ret.                     | Sí                  | 10:1                                     |
|                                | 100                        | 1,5 %             | Ret.                     | Sí                  | 6,67:1                                   |
|                                | <b>100</b>                 | <b>0,5 %</b>      | <b>Ret.</b>              | <b>Sí</b>           | <b>20:1</b>                              |

<sup>a</sup> Alc. o Ret.: Polimerización alcalina (Alc.) o reticulación (Ret.)

<sup>b</sup> Mezcla: ¿Se sometió la mezcla a agitación durante la coacervación?

<sup>c</sup> HA: ácido hialurónico

<sup>d</sup> CMC (visc. media): carboximetilcelulosa (viscosidad media)

<sup>e</sup> CMC (visc. alta): carboximetilcelulosa (viscosidad alta)

<sup>f</sup> GX: goma xantana

Ejemplo 12: Método de uso de la composición inyectable en el realce de tejidos

## Descripción

La composición es un gel producido a partir de una tropoelastina humana sintética generada por la especie de bacteria *Escherichia coli*, reticulada químicamente con glutaraldehído en presencia de una solución al 1 % de un derivado de celulosa a pH = 7 y con una concentración final de tropoelastina de 100 mg/ml.

## Indicación

## ES 3 010 268 T3

La composición está indicada para la implantación dérmica media a profunda para la corrección de arrugas y surcos faciales de moderados a graves, tal como los surcos nasolabiales.

Cómo se suministra

5

La composición se suministra en una jeringa desechable con una aguja de 31G x 1/2".

Procedimiento de tratamiento

10 1. Es esencial consultar con el paciente y que esté informado de las indicaciones, contraindicaciones, advertencias, precauciones, respuestas al tratamiento, reacciones adversas y método de administración del tratamiento. Se debe elaborar un historial médico completo del paciente antes del tratamiento.

15 2. Evalúe la necesidad de analgesia del paciente.

3. Limpie el área a tratar utilizando alcohol u otra solución antiséptica adecuada.

20 4. Antes de la inyección, presione el émbolo para que una pequeña cantidad de la composición sea visible en la punta de la aguja.

25 5. La composición debe administrarse con una aguja de calibre fino (31G x "1/2"). La aguja se introduce en un ángulo aproximado de 30° paralelo a la longitud de la arruga o del surco. La técnica de inyección, teniendo en cuenta el ángulo y la orientación del bisel, la profundidad de la inyección y la cantidad administrada, puede diferir. Si la composición se inyecta demasiado profundamente o por vía intramuscular, la duración del efecto será más corta.

30 6. Inyecte la composición aplicando una presión uniforme sobre el émbolo mientras tira lentamente de la aguja hacia atrás. La arruga debe quedar levantada y eliminada al final de la inyección. Es importante detener la inyección justo antes de sacar la aguja de la piel para evitar la fuga de material o que este acabe en la piel de forma demasiado superficial.

35 7. Cuando se complete la inyección, la zona tratada debe masajearse suavemente para que se conforme al contorno de los tejidos circundantes.

8. El uso típico para cada sesión de tratamiento es de 1 ml por zona de tratamiento.

La técnica de inyección correcta es fundamental para el resultado final del tratamiento.

40

45

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir una composición de tropoelastina que comprende  
5 proporcionar tropoelastina, y  
coacervar la tropoelastina en una fase líquida con un agente de control de la coalescencia, en donde  
10 (a) la concentración de tropoelastina en la composición de tropoelastina es de 5 mg/ml a 300 mg/ml; y  
(b) la concentración del agente de control de la coalescencia en la composición de tropoelastina es del 0,5 %  
(p/v) al 3,5 % (p/v).
- 15 2. El proceso de la reivindicación 1, en donde el agente de control de la coalescencia es un polisacárido.
3. El proceso de la reivindicación 2, en donde el polisacárido comprende uno o más de carboximetilcelulosa,  
hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ácido hialurónico, goma xantana, goma guar,  $\beta$ -glucano,  
alginatos, carboximetildextrano y/o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 20 4. El proceso de la reivindicación 1, en donde el agente de control de la coalescencia se selecciona de entre  
una glicoproteína, un éster lipídico o de ácido graso, un polímero sintético o un surfactante.
5. El proceso de la reivindicación 1, en donde al menos uno de:  
25 - la fase líquida tiene un pH de 7 a 13;  
- la temperatura de la fase líquida es de 37 °C; y  
- la fase líquida incluye además sal.
- 30 6. El proceso de la reivindicación 1, en donde la fase líquida comprende además un agente de reticulación, en  
donde preferiblemente el agente de reticulación comprende uno o más de divinilsulfona (DVS), diglicidil éter  
de 1,4-butanodiol (BDDE) y 1,2,7,8-diepoxioctano (DEC).
- 35 7. El proceso de la reivindicación 6, en donde el agente reticulante se añade a la fase líquida después de la  
coacervación.
8. El proceso de la reivindicación 1, en donde la tropoelastina forma uno o más glóbulos de tropoelastina en la  
40 fase líquida.
9. El proceso de la reivindicación 8, que comprende además la extrusión de la tropoelastina coacervada a través  
de una aguja de calibre fino para dispersar uno o más glóbulos de tropoelastina formados en la fase líquida.
- 45 10. El proceso de la reivindicación 1, en donde la composición de tropoelastina resultante comprende una masa  
en forma de partículas.
11. El proceso de la reivindicación 1, en donde la relación en masa entre la tropoelastina y el agente de control  
de la coalescencia es de 0,2:1 a 100:1.
- 50 12. El proceso de la reivindicación 1, en donde al menos uno de  
- la tropoelastina está en solución antes de la etapa de coacervación; y  
- la tropoelastina comprende monómeros de tropoelastina.
- 55 13. Un proceso para producir una composición de tropoelastina globular que comprende:  
preparar una solución de tropoelastina,  
60 preparar una solución de agente de control de la coalescencia que comprende uno o más de  
carboximetilcelulosa, ácido hialurónico o goma xantana,  
preparar una solución de glutaraldehído,
- 65

combinar la solución de tropoelastina, la solución de agente de control de la coalescencia y la solución de glutaraldehído para formar una solución combinada, en donde la solución combinada tiene un pH de 7 a 13, y

5           calentar la solución a 37 °C, en donde preferiblemente la solución combinada se calienta a 37 °C durante al menos 24 horas.

14.       El proceso de la reivindicación 13, en donde la concentración de tropoelastina en la solución combinada es de 5 mg/ml a 50 mg/ml, y en donde la concentración del agente de control de la coalescencia en la solución combinada comprende del 0,5 % (p/v) a aproximadamente el 3,5 % (p/v).

10

15

20

25

30

35

40

45

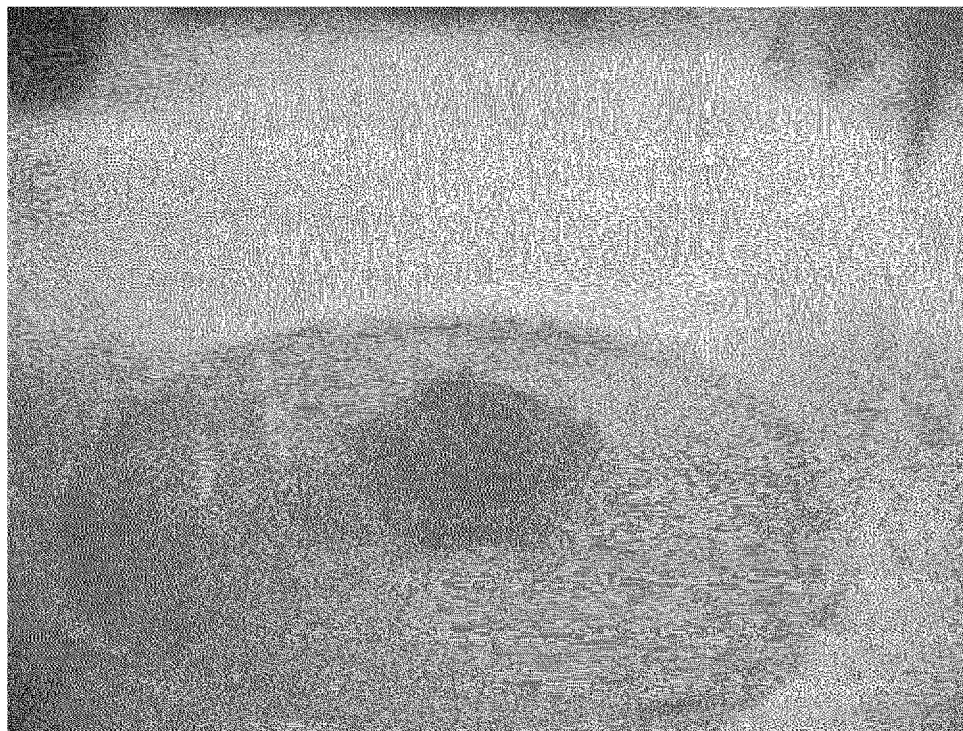
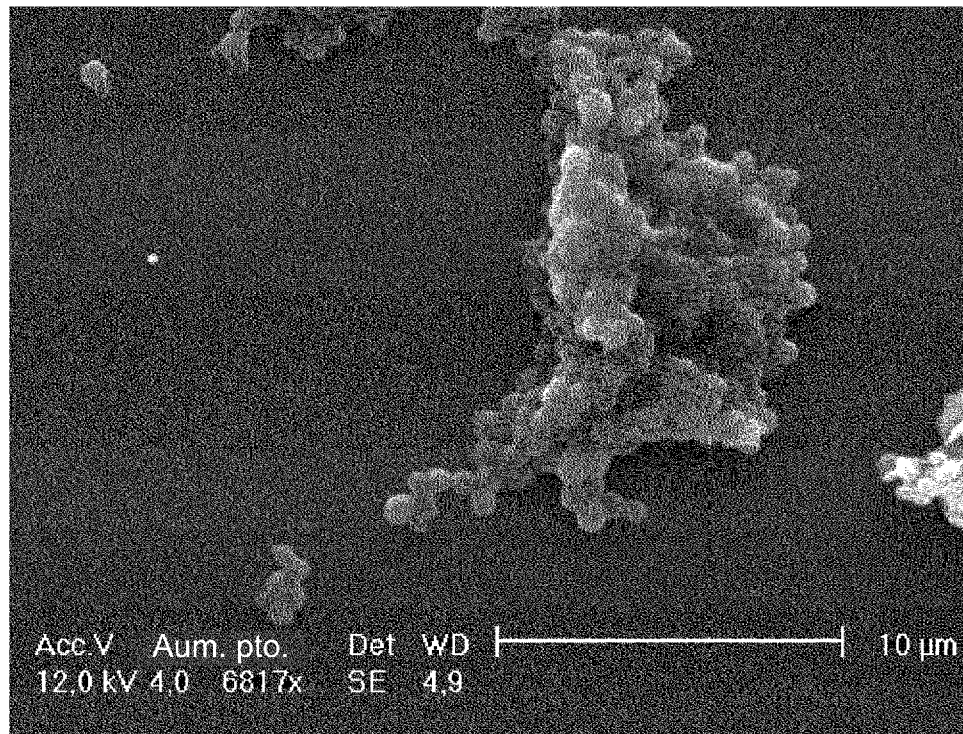
50

55

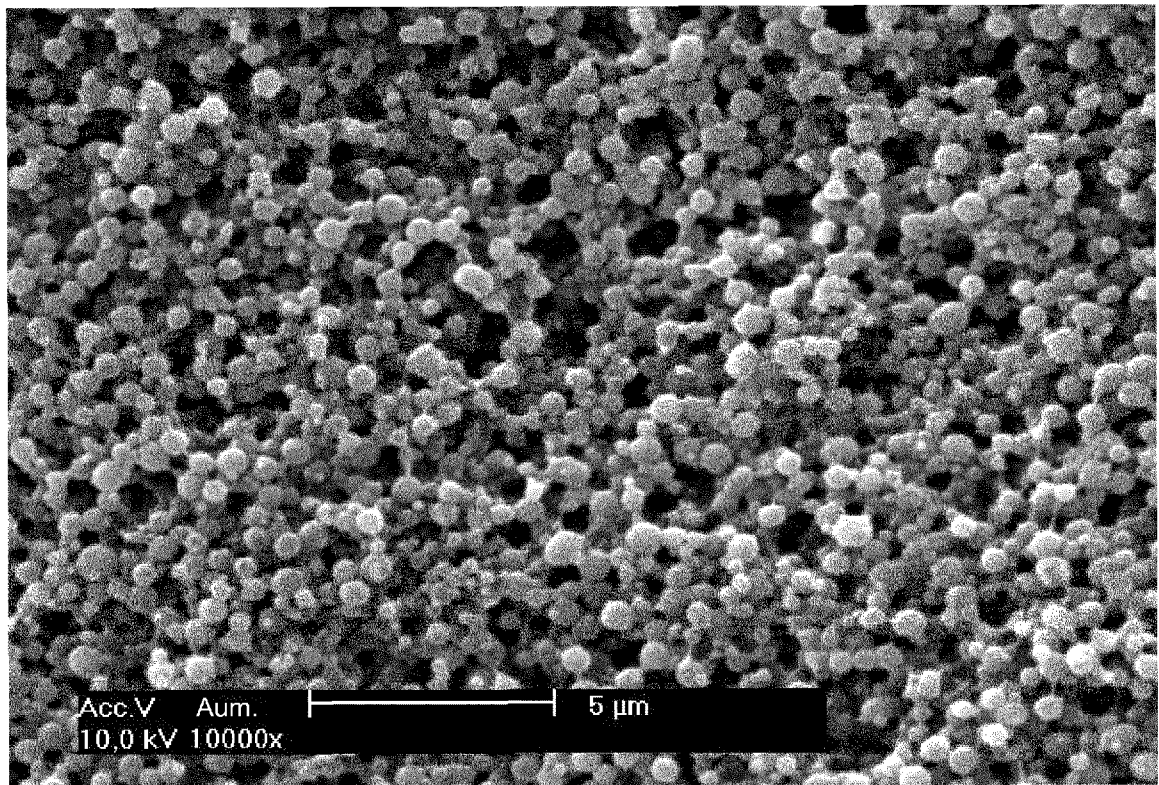
60

65

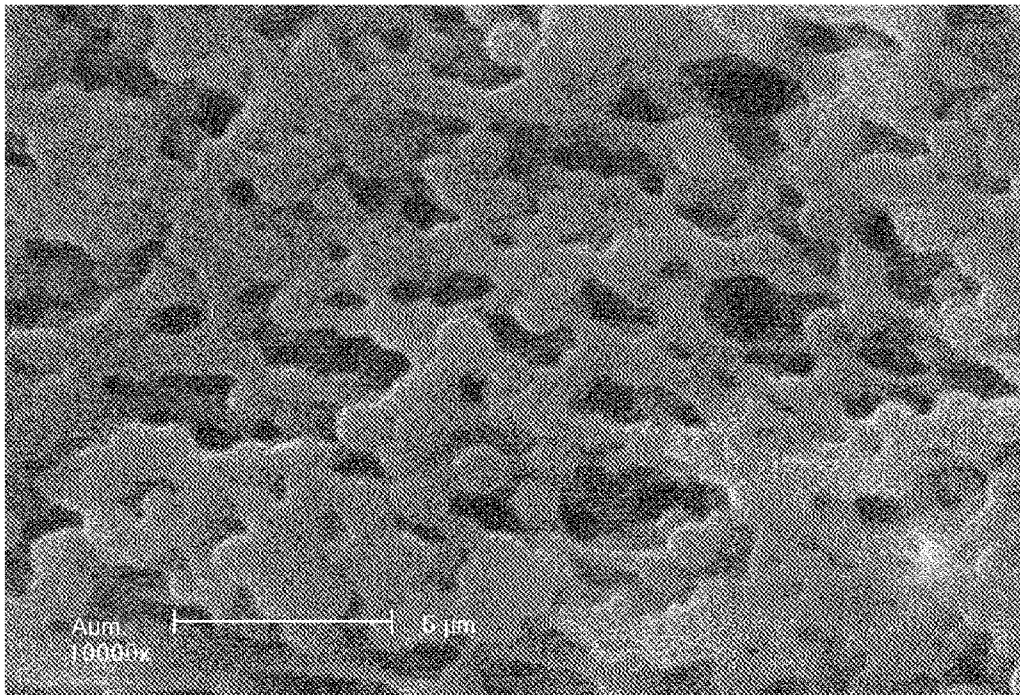
**Figura 1A y 1B**



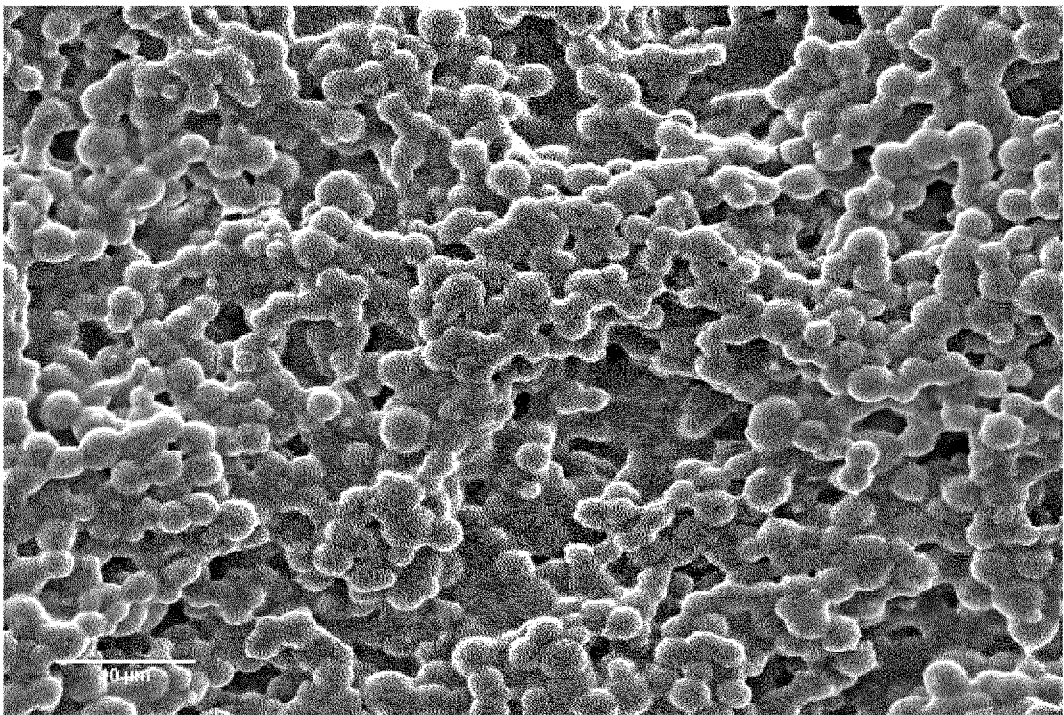
**Figura 2**



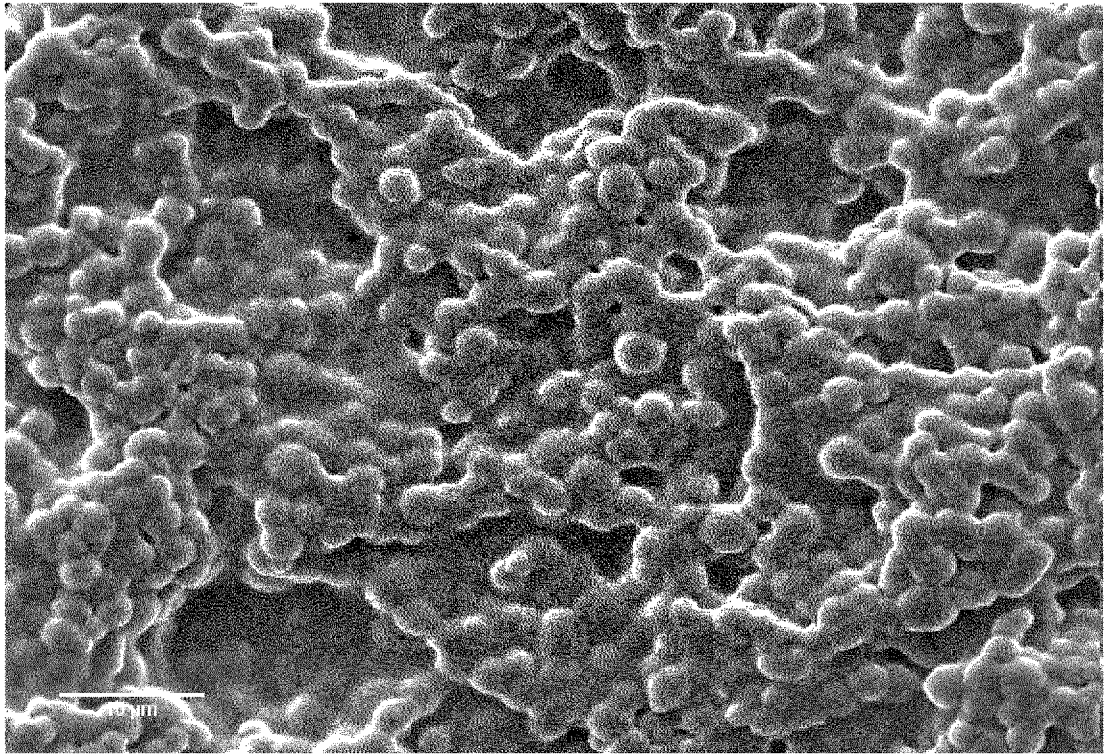
**Figura 3**



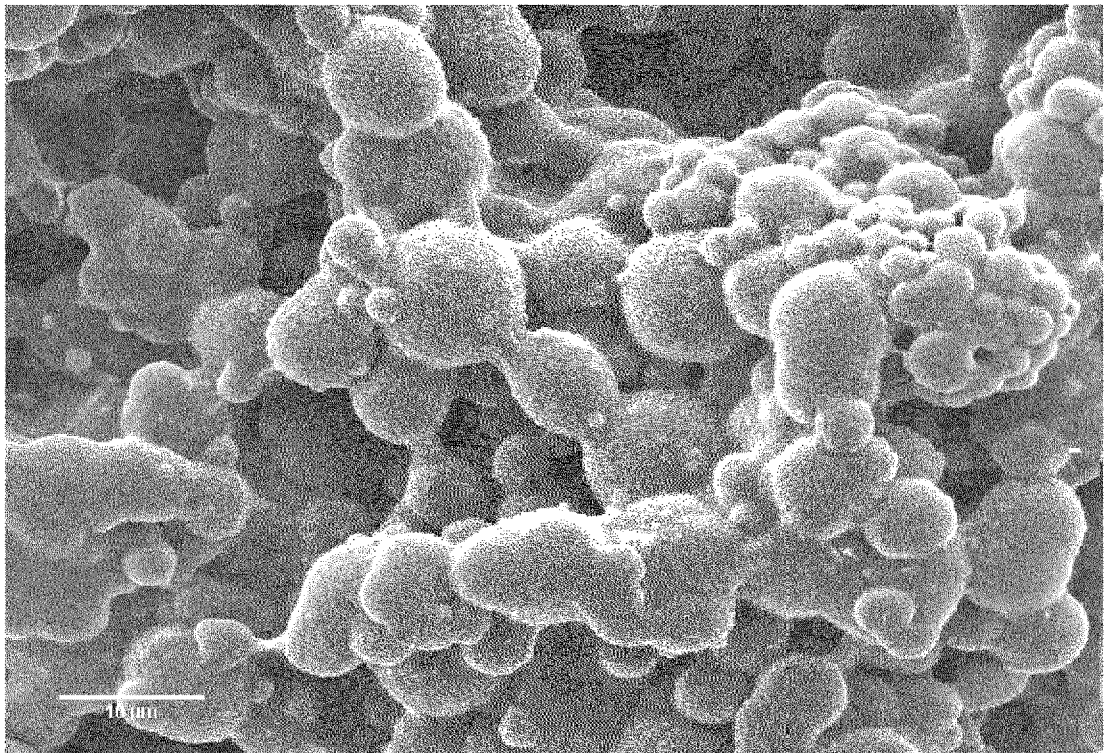
**Figura 4A**



**Figura 4B**



**Figura 4C**



**Figura 4D**

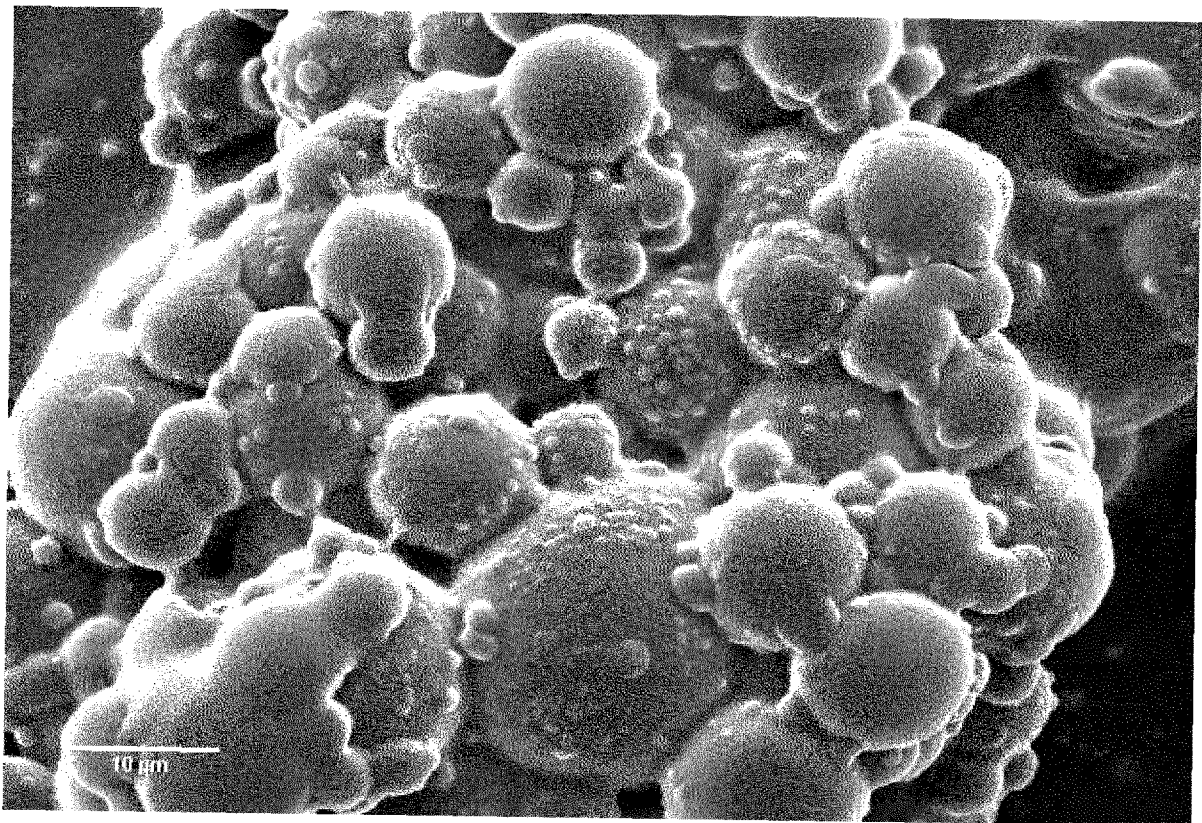
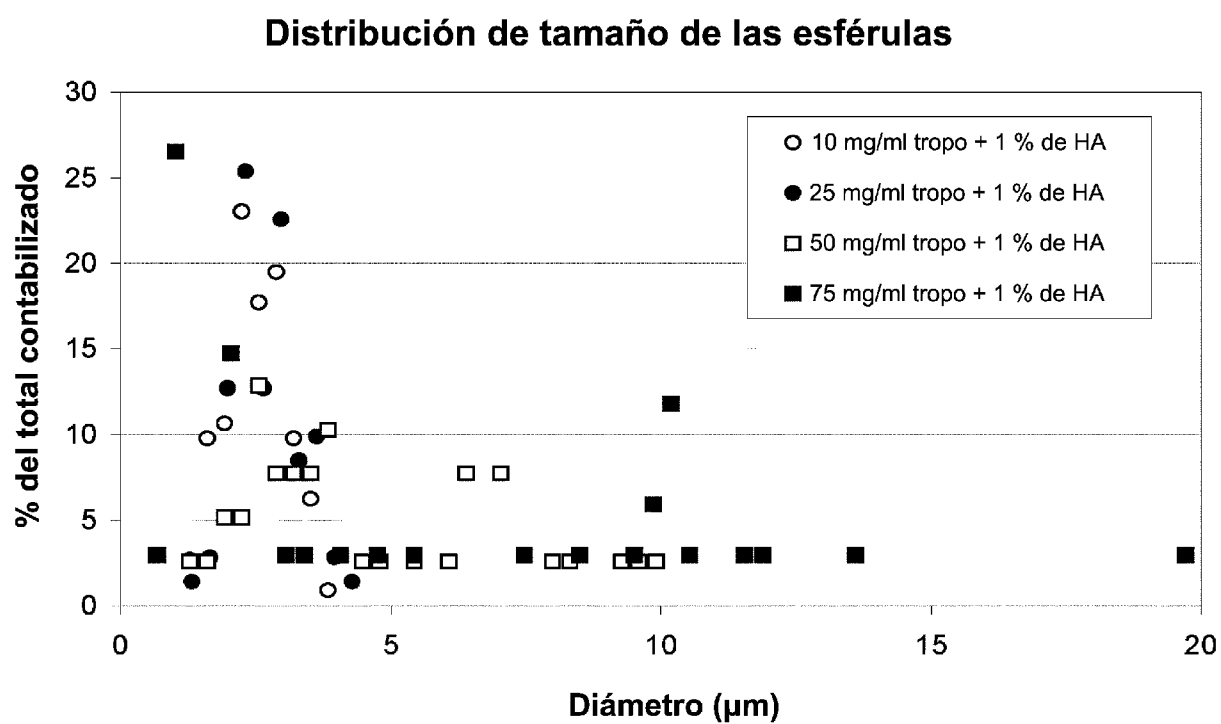
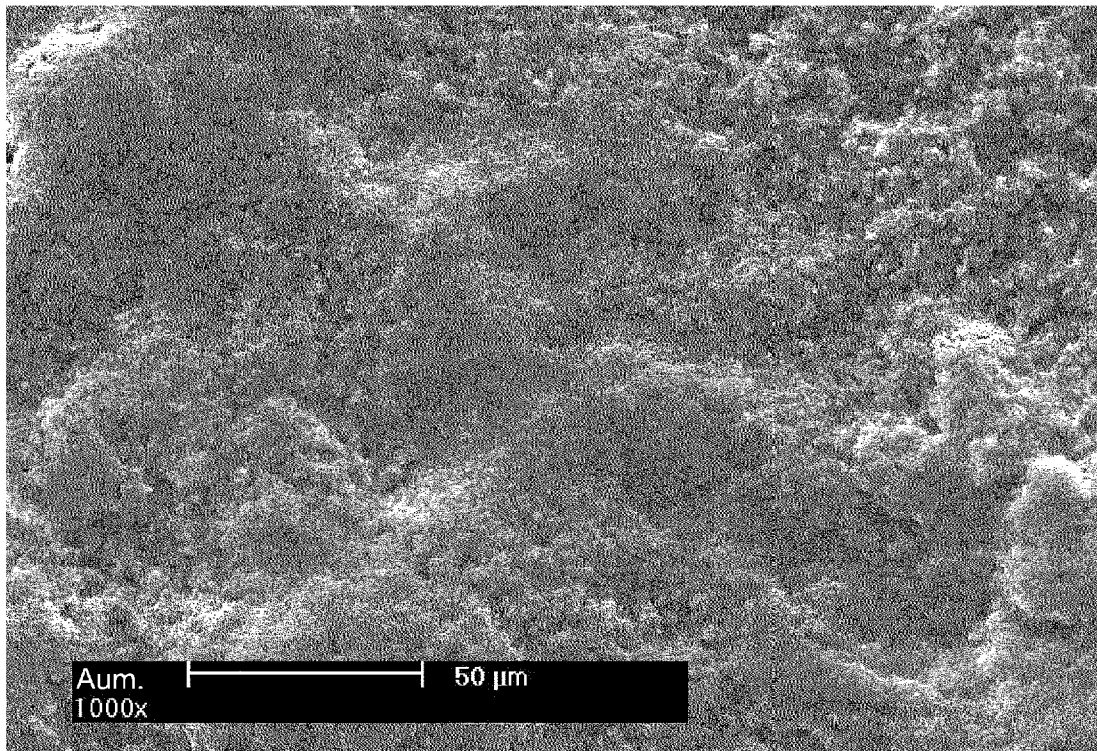
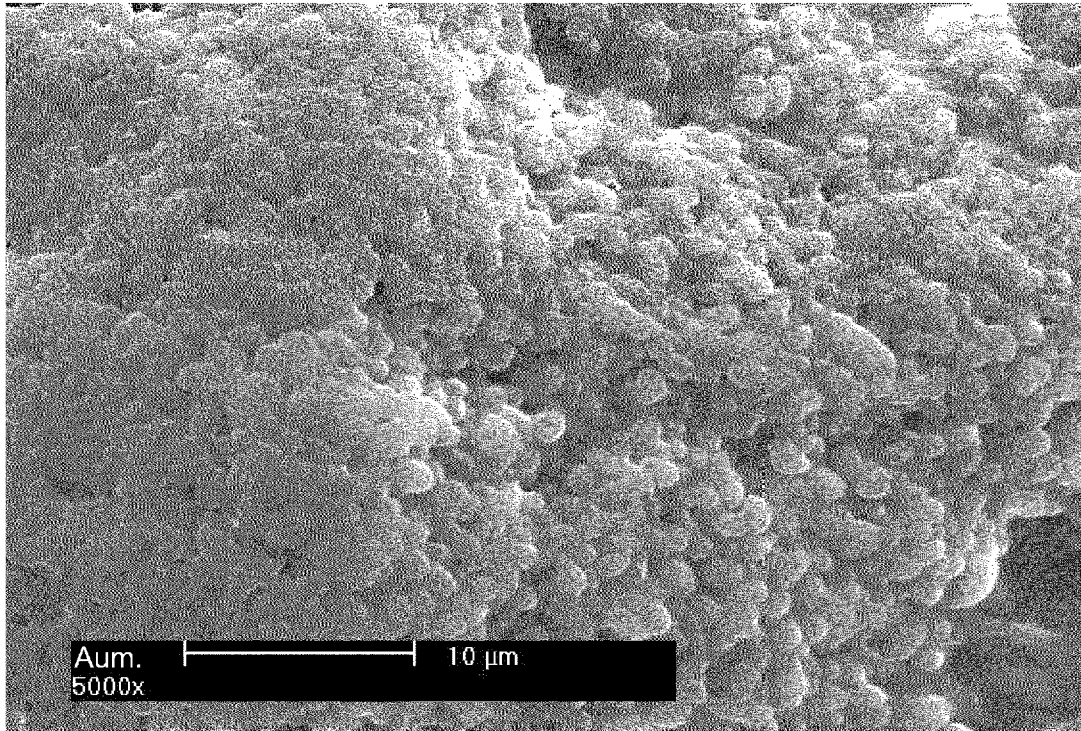


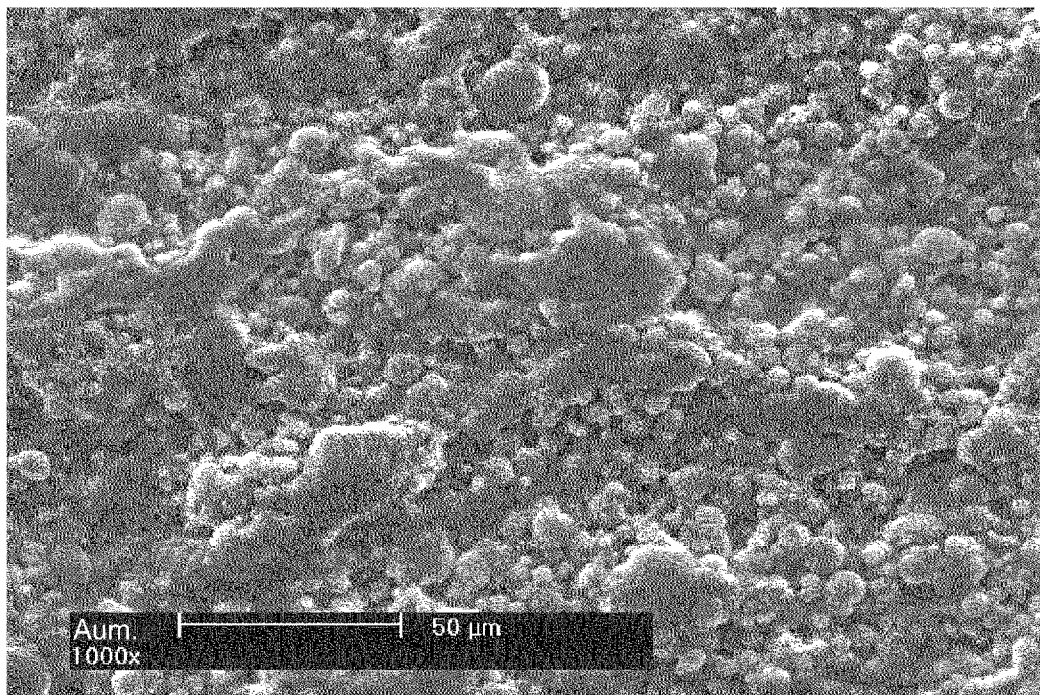
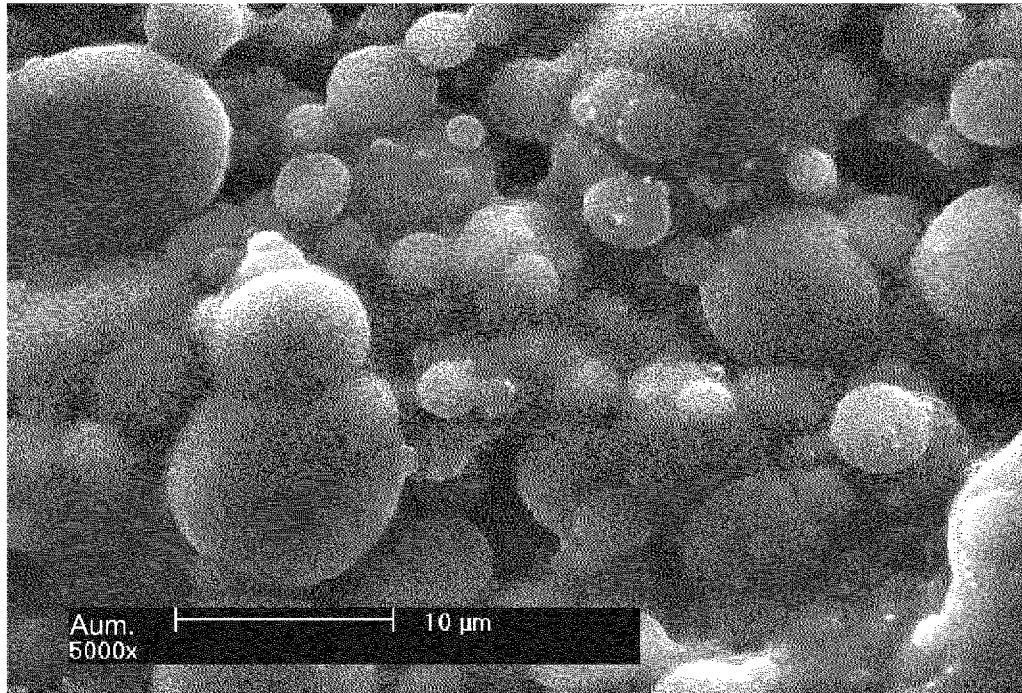
Figura 5



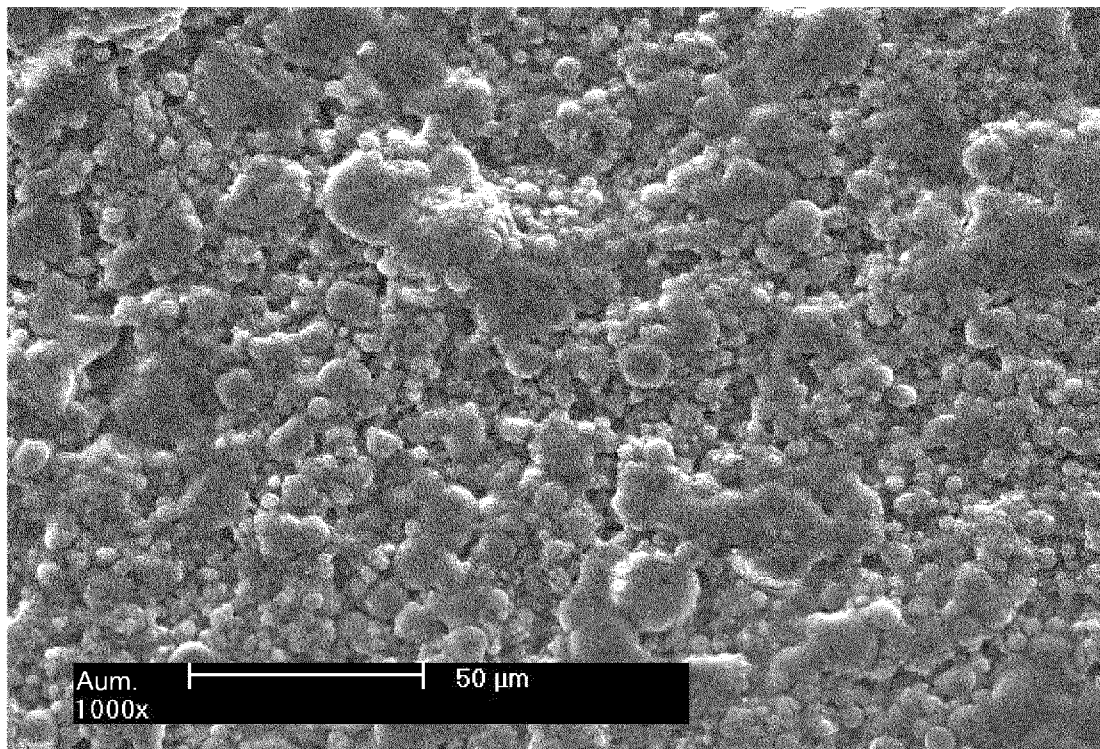
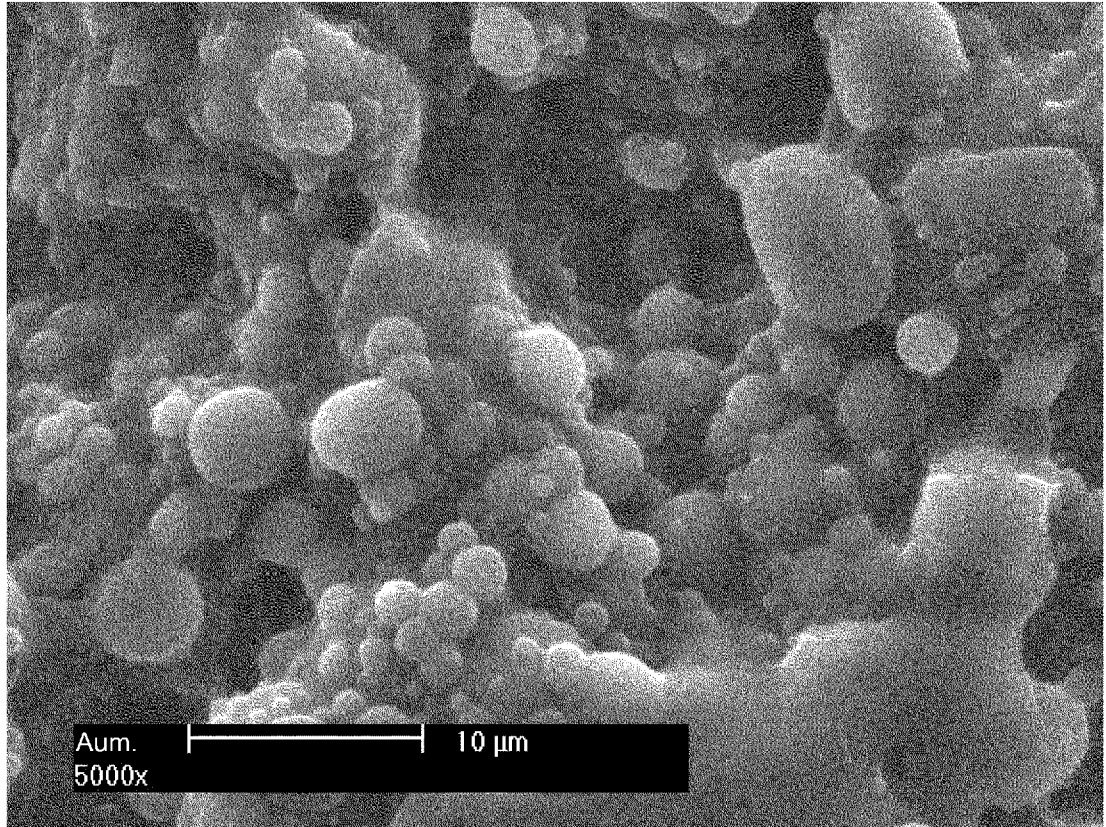
**Figura 6A y 6B**



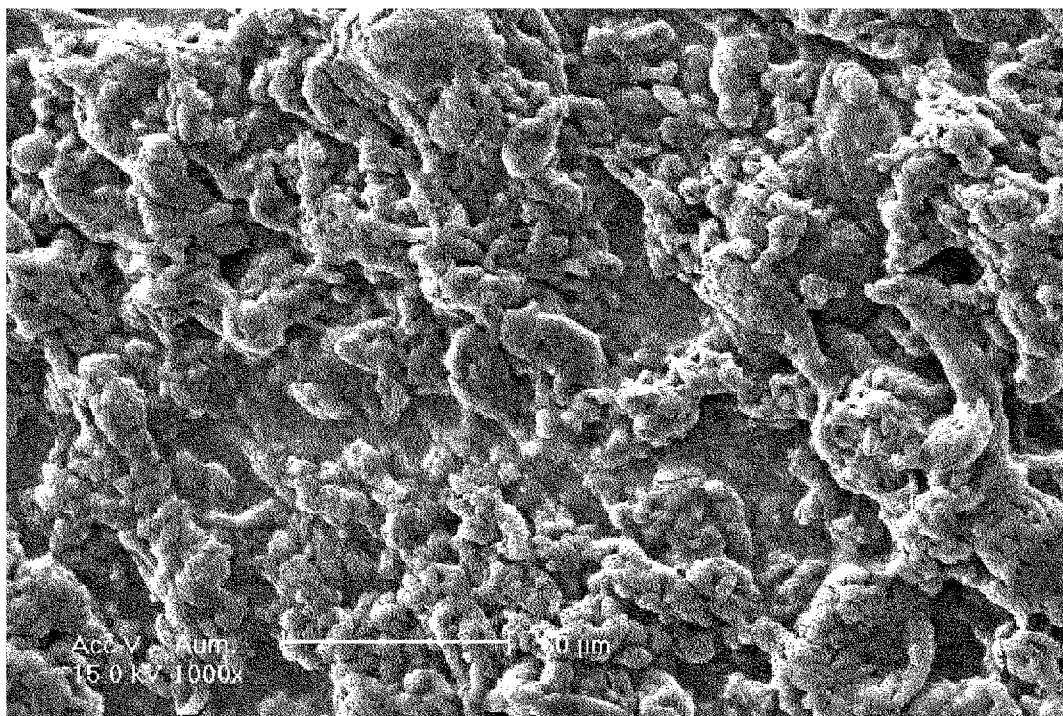
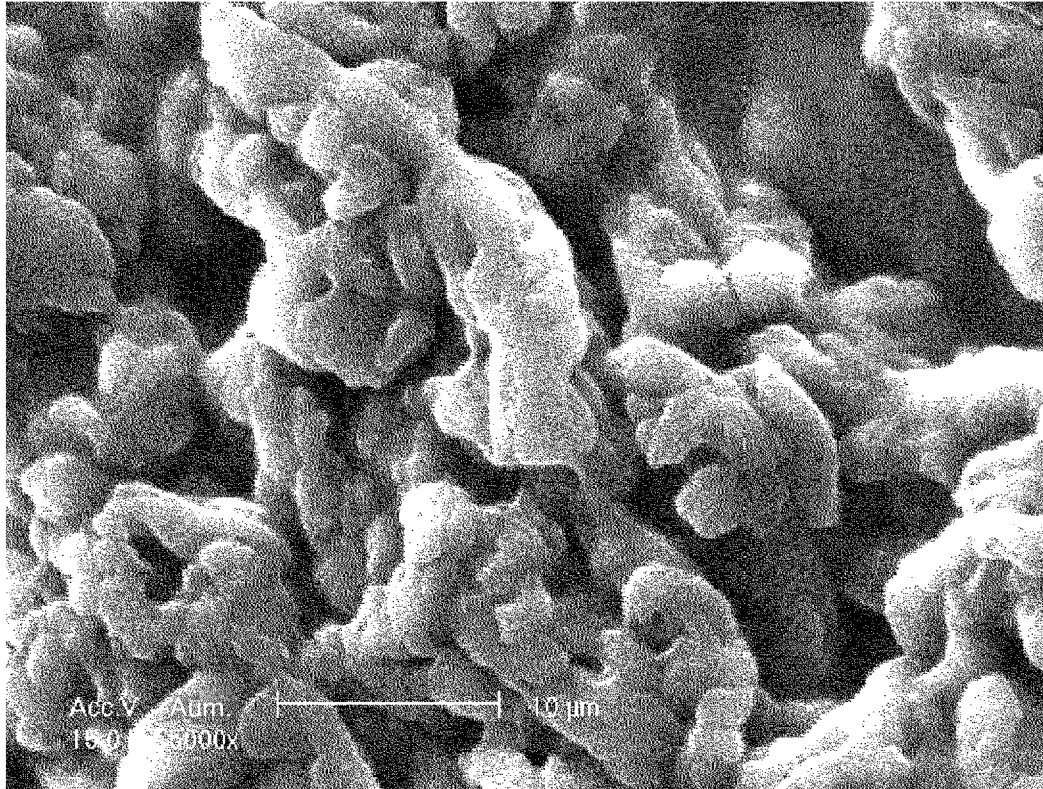
**Figura 7A y 7B**



**Figura 7C y 7D**



**Figura 8A y 8B**



**Figura 9A y 9B**

