

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 006 134**

51 Int. Cl.:

A61K 8/65 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61L 27/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 18159139 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2024 EP 3351237**

54 Título: **Matrices de ácido hialurónico-colágeno para aplicaciones de relleno dérmico y para dar volumen**

30 Prioridad:

04.11.2011 US 201161555970 P

04.09.2012 US 201213603213

06.09.2012 US 201213605565

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2025

73 Titular/es:

ALLERGAN, INC. (100.00%)

2525 Dupont Drive

Irvine, CA 92612, US

72 Inventor/es:

YU, XIAOJIE;

MANESIS, NICHOLAS J. y

POLLOCK, JACOB F.

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 3 006 134 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

Matrices de ácido hialurónico-colágeno para aplicaciones de relleno dérmico y para dar volumen

5 Campo técnico

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/555.970, presentada el 4 de noviembre de 2011, y también es una continuación en parte de la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 13/605.565, presentada el 6 de septiembre de 2012, que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/531.533, presentada el 6 de septiembre de 2011, y que es una continuación en parte de la solicitud de patente estadounidense n.º 13/603.213, presentada el 4 de septiembre de 2012, que reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/531.533, presentada el 6 de septiembre de 2011.

Esta solicitud generalmente se refiere a composiciones implantables biocompatibles y más específicamente se refiere a composiciones a base de ácido hialurónico-colágeno útiles como rellenos dérmicos tal como se define en las reivindicaciones. El documento WO 2011/119468 A1 divulga hidrogeles de polisacárido-proteína para el aumento de tejido blando. El documento WO 2010/003104 A2 divulga kits para uso en el relleno y la regeneración de tejido que comprende instrucciones para su uso.

20 Sumario

La presente invención generalmente se refiere a un producto estético para tejidos blandos tal como se define en las reivindicaciones. En un aspecto, el producto comprende un relleno que comprende un hidrogel homogéneo que tiene una forma adecuada para inyectarlo en tejido humano; y una etiqueta que comprende instrucciones para inyectar el relleno en el tejido humano; en el que el hidrogel homogéneo comprende agua, y una matriz macromolecular reticulada tal como se define en la reivindicación 1.

Algunas realizaciones incluyen un método de mejora de una cualidad estética de tejido blando de un ser humano que comprende: inyectar una composición de hidrogel homogéneo en un tejido blando del ser humano para mejorar de ese modo la cualidad estética del tejido blando; en el que la composición de hidrogel homogéneo comprende agua, y una matriz macromolecular reticulada tal como se define en la reivindicación 6.

Las matrices moleculares reticuladas según la invención comprenden un componente de ácido hialurónico; y un componente de colágeno; en las que el componente de ácido hialurónico se reticula con el componente de colágeno mediante un componente de reticulación; y en las que el componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, en las que al menos una porción de las unidades de reticulación comprende un enlace éster o un enlace amida tal como se define en las reivindicaciones.

40 Breve descripción de los dibujos

Algunos aspectos de la presente divulgación pueden entenderse más claramente con referencia a los dibujos adjuntos de los que:

La figura 1 es un gráfico de barrido de frecuencia y barrido de deformación para un hidrogel según esta invención.

La figura 2 es un perfil de extrusión a través de una aguja de 30G para un hidrogel del ejemplo 4.

La figura 3 muestra micrografías (a un aumento de 5X) de (A) tejido adyacente a una composición de control implantada de gel de ácido hialurónico reticulado comercial, (B) tejido adyacente a una composición implantada del ejemplo 3, y (C) tejido adyacente a una composición implantada del ejemplo 4.

Descripción detallada

Las realizaciones según la invención incluyen un método de mejora de una cualidad estética de tejido blando de un humano tal como se define en las reivindicaciones. Un método de este tipo comprende inyectar una composición de hidrogel homogéneo, o una composición que comprende un hidrogel homogéneo, en un tejido blando del ser humano para mejorar de ese modo la cualidad estética del tejido blando.

Las realizaciones según la invención incluyen un producto estético para tejidos blandos que comprende: un relleno que comprende un hidrogel homogéneo que tiene una forma adecuada para inyectar en tejido humano y una etiqueta que comprende instrucciones para inyectar el relleno en el tejido humano tal como se define en las reivindicaciones.

Un relleno que comprende un hidrogel homogéneo o una composición de hidrogel puede ser cualquier clase de relleno tal como se define en las reivindicaciones que es adecuado para inyectarlo en tejido humano para mejorar

una cualidad estética de un tejido blando, tal como un relleno dérmico, un relleno para reconstrucción o aumento de mamas, un relleno para labios, rejuvenecimiento de manos, o similares. Cuando se inyecta, un hidrogel puede estimular tejido en crecimiento y la generación después de inyectarse en el tejido blando. En algunas realizaciones, un hidrogel puede estimular la formación de colágeno después de inyectarlo en el tejido blando.

Inyectar un hidrogel homogéneo que comprende una matriz macromolecular reticulada que comprende un componente de ácido hialurónico que se reticula con un componente de colágeno tal como se define en las reivindicaciones puede proporcionar una mejora de una cualidad estética durante una duración prolongada, en comparación con inyectar un hidrogel idéntico excepto porque no se reticulan el componente de ácido hialurónico y el componente de colágeno.

Se describe un producto envasado que comprende una jeringa cargada con un hidrogel y una aguja. Una jeringa puede estar dotada de una aguja de cualquier tamaño que sea apropiada para inyectar el hidrogel en el tejido blando de interés, tal como una aguja con un calibre de aproximadamente #25, aproximadamente #30, o mayor.

Un relleno que comprende un hidrogel puede ser adecuado para inyección si puede inyectarse en el tejido blando de interés sin dificultad excesiva, e incluye rellenos que pueden dispensarse desde cánulas que tienen un calibre tan bajo como de aproximadamente #30 o aproximadamente #25 bajo presión manual normal con una meseta de extrusión suave.

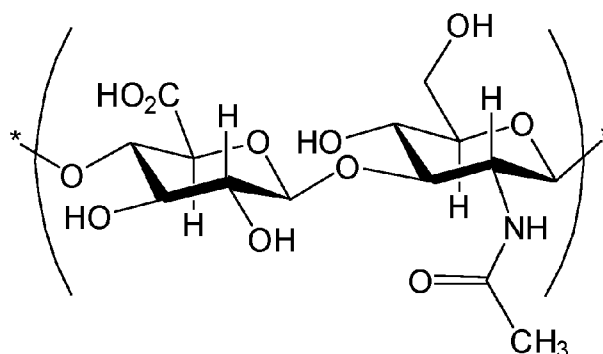
La inyección de un hidrogel homogéneo según la presente invención puede proporcionar un aumento de tejido blando que imita los componentes naturales de la piel. Un hidrogel homogéneo puede inyectarse por vía intradérmica o subcutánea para aumentar el tejido blando y para reparar o corregir anomalías congénitas, defectos adquiridos, o defectos cosméticos. Ejemplos de tales afecciones incluyen anomalías congénitas tales como microsomia hemifacial, hipoplasia malar y cigomática, hipoplasia mamaria unilateral, tórax hundido, agenesia del pectoral (anomalía de Poland), e insuficiencia velofaríngea secundaria a corrección de fisura palatina o fisura palatina submucosa (como implante retrofaríngeo); defectos adquiridos (postraumáticos, posquirúrgicos, o posinfecciosos) tal como cicatrices deprimidas, atrofia subcutánea (por ejemplo, secundaria a lupus eritematoso discoide), lesiones queratósicas, enoftalmos en el ojo enucleado (también síndrome de la porción superior del canal costovertebral), cicatrices de acné de la cara, esclerodermia lineal con atrofia subcutánea, deformidad de nariz en silla de montar, enfermedad de Romberg, y parálisis unilateral de las cuerdas vocales; y defectos cosméticos tales como arrugas glabellares del entrecejo, pliegues nasolabiales profundos, arrugas geográficas peribucales, mejillas hundidas, e hipoplasia mamaria.

Ácido hialurónico reticulado, colágeno, y colágeno reticulado, tal como los usados en rellenos dérmicos, no promueven la infiltración celular y tejido en crecimiento. De manera similar, el colágeno mezclado simplemente en hidrogeles de ácido hialurónico no promueve la integración de tejido o la generación de tejido *de novo*. Sin embargo, los hidrogeles tal como se definen en las reivindicaciones promueven la migración celular en los hidrogeles y la formación de tejido dentro de los geles cuando se implantan *in vivo*.

Un hidrogel puede comprender agua y una matriz macromolecular reticulada tal como se define en las reivindicaciones. Normalmente, una matriz molecular reticulada puede comprender un componente de ácido hialurónico y un componente de colágeno, en la que el componente de ácido hialurónico se reticula con el componente de colágeno mediante un componente de reticulación. Un componente de reticulación puede comprender una pluralidad de unidades de reticulación, en el que al menos una porción de las unidades de reticulación comprenden un enlace éster o un enlace amida tal como se expone en las reivindicaciones.

Una matriz macromolecular reticulada para un hidrogel puede sintetizarse acoplado un ácido hialurónico con un colágeno usando un agente de acoplamiento, tal como una carbodiimida. En estos hidrogeles, el ácido hialurónico puede servir como componente biocompatible de unión a agua, proporcionando degradación a granel e isovolumétrica. Adicionalmente, el colágeno puede conferir adhesión celular y dominios de señalización para promover la unión celular, migración, y otras funciones celulares tales como deposición de matriz extracelular. Los biopolímeros forman hidrogeles homogéneos con composición ajustable, hinchamiento, y propiedades mecánicas. Pueden elaborarse composiciones para ser inyectables para implantación mínimamente invasiva a través de jeringa y aguja.

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano no sulfatado que mejora la retención de agua y resiste tensiones hidrostáticas. Es no inmunógeno y puede modificarse químicamente de numerosas maneras. El ácido hialurónico puede ser aniónico en intervalos de pH alrededor de o por encima del pKa de sus grupos ácido carboxílico.



Ácido hialurónico

- 5 El colágeno es una proteína que forma fibrillas y láminas que portan cargas de tracción. El colágeno también tiene sitios de unión a integrina específicos para adhesión celular y se sabe que promueve la unión, migración, y proliferación celular. El colágeno puede estar cargado positivamente debido a su alto contenido de residuos de aminoácido básicos tales como arginina, lisina, e hidroxilisina.
- 10 Debido a que el ácido hialurónico puede ser aniónico y el colágeno puede ser catiónico, las dos macromoléculas pueden formar complejos poliiónicos en disolución acuosa. Un complejo poliiónico puede ser significativamente menos soluble en agua que cualquiera de ácido hialurónico o colágeno y, por tanto, puede separarse por precipitación de la disolución acuosa cuando las dos macromoléculas están juntas en una mezcla.
- 15 En determinadas condiciones, un ácido hialurónico y un colágeno pueden combinarse en un líquido acuoso en el que ambos componentes son solubles. Luego pueden reticularse un ácido hialurónico y un colágeno mientras que ambos se disuelven en una disolución acuosa para formar un hidrogel. Las condiciones de reacción tales como la concentración de ácido hialurónico, la concentración de colágeno, el pH de la disolución, y la concentración de sal puede ajustarse para ayudar a prevenir la formación de complejos poliiónicos entre el ácido hialurónico aniónico y el
- 20 colágeno catiónico. También puede ayudar a prevenir la formación de microfibrillas de colágeno.

Algunas realizaciones incluyen un método de reticulación de ácido hialurónico y colágeno. Este método generalmente comprende una etapa de disolución que da como resultado una disolución acuosa de pre-reacción. En una etapa de disolución, ácido hialurónico y colágeno se disuelven en una disolución acuosa que tiene un pH bajo y/o una sal para formar una disolución acuosa de pre-reacción.

Un método de reticulación de ácido hialurónico-colágeno comprende además una etapa de activación. En una etapa de activación, una disolución acuosa de pre-reacción se modifica al menos añadiendo un agente de acoplamiento soluble en agua y/o aumentando el pH de la disolución. Si es necesario, también puede añadirse una sal para

30 mantener el ácido hialurónico y el colágeno en disolución al pH mayor. Por tanto, una mezcla de reacción de reticulación comprende ácido hialurónico y colágeno disuelto o dispersado en un medio acuoso, un agente de acoplamiento soluble en agua, y una sal, y tiene un pH mayor que la disolución acuosa de pre-reacción del cual se derivó. La mezcla de reacción de reticulación se deja reaccionar para reticular de ese modo el ácido hialurónico y el colágeno.

En algunas realizaciones, puede aumentarse el pH de la disolución acuosa de pre-reacción y una cantidad sustancial de formación de fibras puede permitirse que se produzca en la disolución antes de añadir el agente de acoplamiento soluble en agua. En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento soluble en agua puede añadirse a la disolución acuosa de pre-reacción antes de producirse sustancialmente cualquier formación de fibras.

Una mezcla de reacción de reticulación puede reaccionar para formar una matriz macromolecular reticulada. Puesto que la reacción se produzca en una disolución acuosa, una matriz macromolecular reticulada puede dispersarse en un líquido acuoso en forma de hidrogel ya que se forma mediante una reacción de reticulación. Una matriz macromolecular reticulada puede mantenerse en forma de hidrogel porque, en muchos casos, una matriz macromolecular reticulada puede usarse en forma de hidrogel.

En algunas realizaciones, una disolución acuosa de pre-reacción o una mezcla de reacción de reticulación puede comprender además de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 90 % de un disolvente orgánico en el que el ácido hialurónico tiene mala solubilidad, tal como etanol, metanol, isopropanol, o similares.

Después de que haya producido una reacción de reticulación, la matriz macromolecular reticulada puede particularse o homogeneizarse a través de una malla. Esto puede ayudar a formar una suspensión o hidrogel inyectable. Una malla usada para particular una matriz macromolecular reticulada puede tener cualquier tamaño de

poro adecuado dependiendo del tamaño de las partículas deseadas. En algunas realizaciones, la malla puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 100 micrómetros, de aproximadamente 50 micrómetros a aproximadamente 70 micrómetros, o de aproximadamente 60 micrómetros.

5 Un hidrogel que comprende una matriz molecular reticulada puede tratarse mediante diálisis para esterilización u otros propósitos. La diálisis puede llevarse a cabo colocando una membrana semipermeable entre el hidrogel y otro líquido para permitir que el hidrogel y el líquido intercambien moléculas o sales que puedan pasar entre la membrana.

10 Una membrana de diálisis puede tener un valor de corte de peso molecular que puede variar. Por ejemplo, el valor de corte puede ser de aproximadamente 5.000 Dalton a aproximadamente 100.000 Dalton, de aproximadamente 10.000 Dalton a aproximadamente 30.000 Dalton, o de aproximadamente 20.000 Dalton.

15 La diálisis puede llevarse a cabo contra una disolución de tampón, o el líquido en el otro lado de la membrana desde el hidrogel puede ser una disolución de tampón. En algunas realizaciones, la disolución de tampón puede ser una disolución de tampón fosfato estéril que puede comprender tampón fosfato, cloruro de potasio, y/o cloruro de sodio. Una disolución de tampón fosfato estéril puede ser sustancialmente isosmótica con respecto a líquido fisiológico humano. Por tanto, cuando se completa la diálisis, el componente líquido de un hidrogel puede ser sustancialmente isosmótico con respecto a líquido fisiológico humano.

20 En algunas realizaciones, un complejo macromolecular reticulado puede comprender además un líquido acuoso. Por ejemplo, el complejo macromolecular reticulado puede absorber el líquido acuoso de modo que se forma un hidrogel. Un líquido acuoso puede comprender agua con una sal disuelta en la misma, tal como un tampón fosfato, cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. En algunas realizaciones, un líquido acuoso puede comprender agua, 25 cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, cloruro de potasio a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM, y tampón fosfato a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, en el que el pH del líquido es de aproximadamente 7 a aproximadamente 8.

30 Un hidrogel puede usarse en un producto estético para tejidos blandos tal como se define en las reivindicaciones. Un producto estético para tejidos blandos puede comprender: un dispositivo estético que tiene una forma adecuada para inyectar o implantar en tejido humano; y una etiqueta que comprende instrucciones para inyectar o implantar el componente estético en tejido humano; en el que el dispositivo estético comprende una matriz macromolecular reticulada tal como se define en el presente documento. Algunos productos pueden comprender la matriz 35 macromolecular reticulada en forma de hidrogel.

El hidrogel de un complejo macromolecular reticulado tiene un módulo de almacenamiento de aproximadamente 50 Pa a 10.000 Pa tal como de aproximadamente 500 Pa a aproximadamente 1000 Pa, aproximadamente 556 Pa, 40 aproximadamente 560 Pa, aproximadamente 850 Pa, aproximadamente 852 Pa, o cualquier valor en un intervalo delimitado por, o entre, cualquiera de estos valores.

En algunas realizaciones, un hidrogel de un complejo macromolecular reticulado puede tener un módulo de pérdida de aproximadamente 1 Pa a aproximadamente 500 Pa, de aproximadamente 10 Pa a 200 Pa, de aproximadamente 100 Pa a aproximadamente 200 Pa, aproximadamente 20 Pa, aproximadamente 131 Pa, aproximadamente 152 Pa, 45 o cualquier valor en un intervalo delimitado por, o entre, cualquiera de estos valores.

En algunas realizaciones, un hidrogel de un complejo macromolecular reticulado puede tener una fuerza de extrusión promedio de aproximadamente 20 N a 30 N, o aproximadamente 25 N, cuando el hidrogel se fuerza a 50 través de una jeringa con una aguja de 30G moviendo el émbolo de una jeringa de 1 ml que contiene el hidrogel a una velocidad de 100 mm/min durante aproximadamente 11 mm, y midiendo la fuerza promedio desde aproximadamente 4 mm hasta aproximadamente 10 mm.

Un complejo macromolecular reticulado puede tener propiedades de hinchamiento ajustables basándose en las condiciones de reacción y la dilución de hidrogel. En algunas realizaciones, un complejo macromolecular reticulado 55 puede tener una razón de hinchamiento de aproximadamente 1 a aproximadamente 7. Una razón de hinchamiento es la razón del peso del complejo macromolecular reticulado cuando se satura con agua hasta el peso del complejo macromolecular reticulado sin nada de agua. Más específicamente, la razón de hinchamiento es la razón de la masa del gel que se ha dejado hinchar completamente hasta la masa del gel a su concentración inicial.

60 En una reacción de reticulación, puede variar el peso molecular de un ácido hialurónico. En algunas realizaciones, un ácido hialurónico puede tener un peso molecular de aproximadamente 500.000 Dalton a aproximadamente 10.000.000 Dalton, de aproximadamente 1.000.000 Dalton a aproximadamente 5.000.000 Dalton, o de aproximadamente 1.000.000 Dalton a aproximadamente 3.000.000 Dalton. Cuando se produce la reacción de reticulación, el producto macromolecular reticulado resultante puede tener un componente de ácido hialurónico 65 derivado del ácido hialurónico en la reacción de reticulación. Por tanto, los intervalos mencionados anteriormente también pueden aplicarse al peso molecular de un componente de ácido hialurónico, por ejemplo, de

aproximadamente 500.000 Dalton a aproximadamente 10.000.000 Dalton, de aproximadamente 1.000.000 Dalton a aproximadamente 5.000.000 Dalton, o de aproximadamente 1.000.000 Dalton a aproximadamente 3.000.000 Dalton. El término "peso molecular" se aplica en esta situación a una porción de la matriz incluso aunque el componente de ácido hialurónico puede no ser realmente una molécula independiente debido a la reticulación.

Puede variar la concentración de ácido hialurónico en una disolución acuosa de pre-reacción o una mezcla de reacción de reticulación. El ácido hialurónico está presente en de aproximadamente 6 mg/ml a aproximadamente 24 mg/ml, tal como aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, o aproximadamente 24 mg/ml

Puede usarse cualquier tipo de colágeno en los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, puede usarse colágeno tipo I, colágeno tipo III, colágeno tipo IV, colágeno tipo VI, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un colágeno o un componente de colágeno comprende colágeno tipo I o colágeno tipo III. En algunas realizaciones, el componente de colágeno comprende colágeno tipo V.

El colágeno puede derivarse de un cultivo celular, un tejido animal, o medios recombinantes, y puede derivarse de fuentes humanas, porcinas, o bovinas. Algunas realizaciones comprenden colágeno derivado de cultivo de fibroblastos humanos. Algunas realizaciones comprenden colágeno que se ha desnaturalizado a gelatina. La fuente y/o las condiciones de extracción/procesamiento de colágeno pueden alterar la manera en la que las macromoléculas de colágeno se agrupan para formar estructuras supramoleculares. Estas estructuras de orden superior pueden tener efectos sobre las propiedades físicas del gel (rigidez, viscosidad) y también pueden tener un efecto sobre la reactividad del colágeno a reactivos de reticulación.

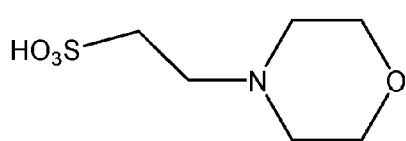
Puede variar la concentración de colágeno en una disolución acuosa de pre-reacción o una mezcla de reacción de reticulación. El colágeno está presente a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, tal como de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 1,7 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, o aproximadamente 12 mg/ml. La concentración de colágeno tiene un efecto sobre las propiedades físicas del gel (rigidez, viscosidad). En general, las concentraciones de colágeno mayores conducen a un módulo de elasticidad mayor.

En algunas realizaciones, la razón en peso de ácido hialurónico con respecto a colágeno en una disolución acuosa de pre-reacción o una disolución acuosa de pre-reacción o una mezcla de reacción de reticulación (por ejemplo [peso de ácido hialurónico]/[peso de colágeno]) puede ser de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, aproximadamente 1, o aproximadamente 2. Cuando se produce la reacción de reticulación, el producto macromolecular reticulado resultante puede tener un componente de colágeno derivado del colágeno en la reacción de reticulación. Por tanto, la matriz macromolecular reticulada resultante puede tener una razón en peso de componente de ácido hialurónico con respecto a componente de colágeno que corresponde a la razón en peso en la reacción de reticulación, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, aproximadamente 1, o aproximadamente 2.

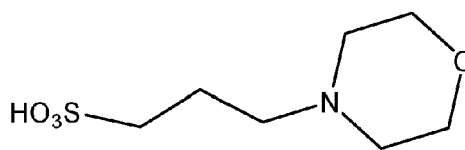
En otras realizaciones de la invención, las composiciones tienen una razón de AH con respecto a colágeno de entre aproximadamente 0,5 y 1 y aproximadamente 7 y 1.

Una sal puede ayudar a filtrar las cargas negativas de ácido hialurónico de las cargas positivas de colágeno, y puede así prevenir la precipitación de un complejo de iones poliiónico desde la disolución. Sin embargo, altas concentraciones de sal pueden reducir la solubilidad de algunos componentes en disolución. Por tanto, en algunas realizaciones, la concentración de sal de una disolución acuosa de pre-reacción o una mezcla de reacción de reticulación puede ser suficientemente alta para filtrar las cargas de modo que no se forme el complejo de iones poliiónico, pero también es suficientemente baja de modo que los componentes de la mezcla permanezcan en disolución. Por ejemplo, la concentración de sal total de algunas disoluciones acuosas de pre-reacción o mezclas de reacción de reticulación puede ser de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, por ejemplo, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 0,5 M, por ejemplo, entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 0,2 M.

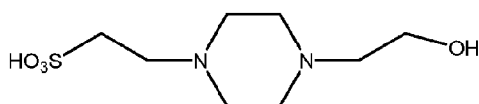
Algunas sales en una disolución acuosa de pre-reacción o una mezcla de reacción de reticulación pueden ser tampones no coordinantes. Puede usarse cualquier tampón no coordinante que sea capaz de tamponar la mezcla y no se coordine con átomos o iones de metal en el colágeno. En algunas realizaciones, el tampón no reacciona con los reactivos de reticulación (carbodiimida y aditivo). Por ejemplo, tampones acetato o fosfatos no pueden usarse en estas realizaciones. Los ejemplos de tampones no coordinantes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil)etanosulfónico (HEPES), ácido 3-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]propanosulfónico (HEPPS), ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfónico (CHES), ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS), etc.



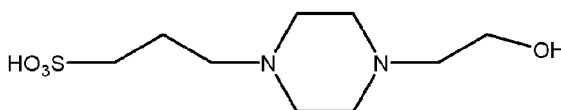
MES



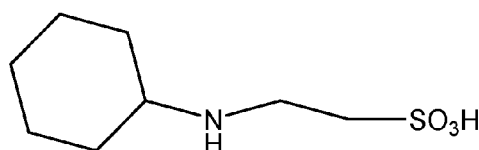
MOPS



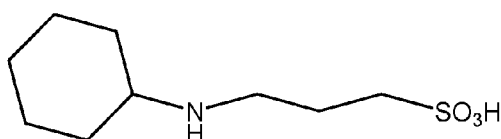
HEPES



HEPPS



CHES



CAPS

Puede variar la concentración de un tampón no coordinante. Por ejemplo, algunas disoluciones acuosas de pre-reacción o mezclas de reacción de reticulación pueden tener una concentración de tampón en un intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 250 mM. Algunas disoluciones acuosas de pre-reacción o mezclas de reacción de reticulación comprenden MES a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 180 mM.

También pueden incluirse sales no tamponantes en una disolución acuosa de pre-reacción o una mezcla de reacción de reticulación como alternativa a, o además de, sales tamponantes. Algunos ejemplos pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de potasio, bromuro de potasio, bromuro de sodio, cloruro de litio, bromuro de litio, yoduro de sodio, y yoduro de potasio. Puede variar la concentración de una sal no tamponante. Por ejemplo, algunas mezclas pueden tener una concentración de sal no tamponante en un intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 500 mM, o de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM. En algunas realizaciones, puede estar presente cloruro de sodio a una concentración en un intervalo de aproximadamente el 0,5 % p/v a aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 0,9 % p/v, aproximadamente el 1,6 % p/v, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 1 mM, de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 50 a 300 mM, de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 330 mM, aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 270 mM.

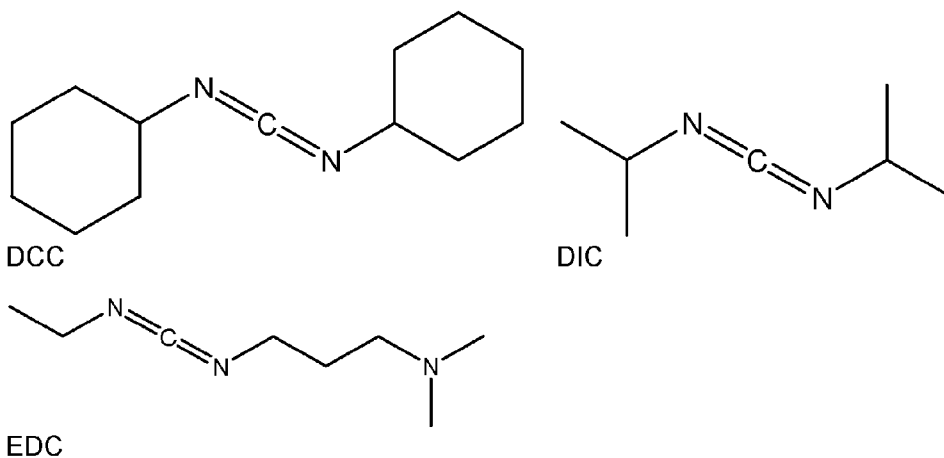
El pH de una disolución acuosa de pre-reacción puede ser menor que el pH de una mezcla de reacción de reticulación. Si el contenido de sal de la disolución acuosa de pre-reacción es bajo, el pH puede ser menor para mejorar la solubilidad del ácido hialurónico y el colágeno. Si el contenido de sal es mayor, el pH puede ser mayor en la disolución acuosa de pre-reacción. En algunas realizaciones, el pH de la mezcla acuosa de pre-reacción es de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, de aproximadamente 3 a aproximadamente 8, de aproximadamente 4 a aproximadamente 6, de aproximadamente 4,7 a aproximadamente 7,4, o aproximadamente 5,4. Para concentraciones de sal bajas, el pH puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3.

En algunas realizaciones, el pH puede ajustarse a neutro para permitir la gelificación de colágeno o la formación de fibras antes de añadir un agente de acoplamiento.

En algunas realizaciones, el pH puede ajustarse a neutro inmediatamente antes, alrededor del momento de, o después de añadir un agente de acoplamiento, de modo que se reduce o no se produce sustancialmente la gelificación de colágeno.

Puede usarse cualquier agente de acoplamiento soluble en agua que pueda reticular el ácido hialurónico con colágeno. Algunos ejemplos no limitativos 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). Los agentes de acoplamiento de carbodiimida pueden facilitar la formación de enlaces éster o amida sin formar parte del enlace. Sin embargo, pueden usarse otros agentes de acoplamiento que formen parte del grupo de reticulación. Puede variar la concentración de un agente de acoplamiento. En algunas realizaciones, un agente de acoplamiento puede estar presente a 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 algunas realizaciones, el agente de acoplamiento es EDC que está presente a una concentración de

aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 50 mM.

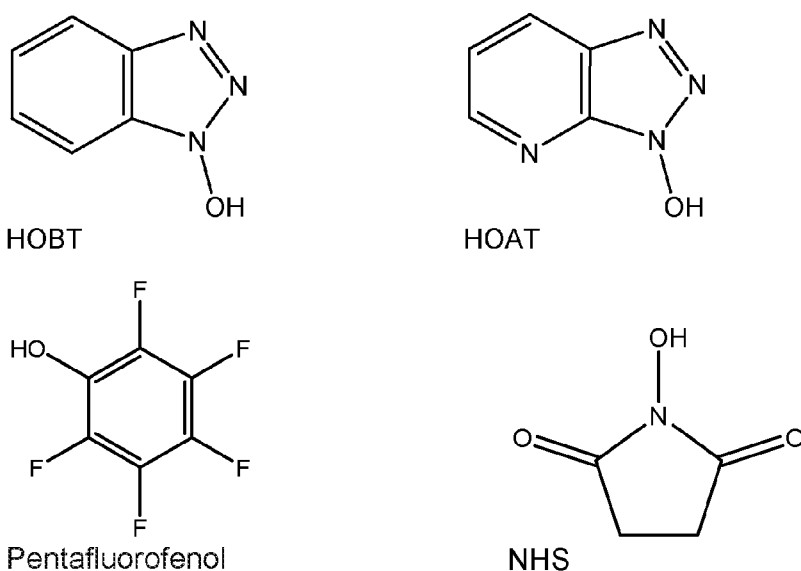


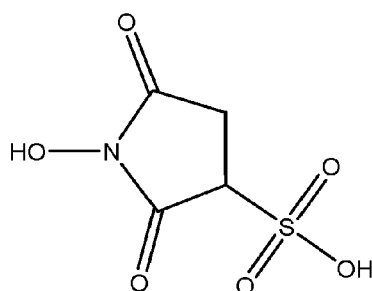
10

Como resultado de una reacción de reticulación, una matriz macromolecular reticulada puede comprender un componente de reticulación que reticula o conecta de manera covalente el componente de ácido hialurónico con el componente de colágeno. Un componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, o enlaces covalentes individuales, entre el componente de ácido hialurónico y el componente de colágeno. Al menos una porción de las unidades de reticulación comprenden un enlace éster o un enlace amida. En algunas realizaciones, al menos una porción de las unidades de reticulación pueden ser -CON- o -CO₂-, en donde el N es un nitrógeno de un residuo de aminoácido.

15

Un agente de activación puede usarse para aumentar la razón de enlaces amida en comparación con enlaces éster formados en el producto reticulado. En algunas realizaciones, un agente de activación puede ser un triazol tal como hidroxibenzotriazol (HOBT) o 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAT); un fenol fluorado tal como pentafluorofenol; una succinimida tal como N-hidroxisuccinimida (NHS) o N-hidroxisulfosuccinimida (sulfoNHS), y similares.





sulfoNHS

Puede variar la concentración de un agente de activación. En algunas realizaciones, el agente de activación puede tener una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, el agente de activación puede ser NHS o sulfoNHS que está a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, el agente de activación puede ser N-hidroxisulfosuccinimida, sal de sodio, a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender un agente de acoplamiento de carbodiimida y un agente de activación. En algunas realizaciones, el agente de acoplamiento es EDC y el agente de activación es NHS o sulfoNHS. En algunas realizaciones EDC está presente a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM y NHS o sulfoNHS está presente a de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 1,7 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 1,7 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, en la que la disolución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 180 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 1,6 % en peso o aproximadamente 270 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, en la que la disolución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 16 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 8 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, en la que la disolución tiene un pH de entre aproximadamente 4,5 y 5,5, por ejemplo, aproximadamente 5,2.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 12 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 12 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 3 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 3 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, en la que la disolución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 12 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 6 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, en la que la disolución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 24 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 12 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 100 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,9 % en peso o aproximadamente 150 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 50 mM, en la que la disolución tiene un pH de aproximadamente 5,4.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción de reticulación puede comprender ácido hialurónico a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, colágeno a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente el 0,5 % en peso a aproximadamente el 2 % en peso o de aproximadamente 80 mM a aproximadamente 330 mM, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, en la que la disolución tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

Ejemplo 1

Método de elaboración de una composición inyectable

Se produjeron disoluciones de ácido hialurónico (AH) y colágeno disolviendo 15 mg de ácido hialurónico de 2,0 MDa en 5 ml de disolución de colágeno(III) humano a 3 mg/ml en ácido clorhídrico 0,01 N (Fibrogen). Luego se liofilizó la disolución de ácido hialurónico/colágeno a -50 °C y 0,02 Torr. Se remojaron las esponjas resultantes en 20 ml de mezcla de etanol:agua en razones que variaban desde 1:2 hasta 5:1 con 50 mM de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y 50 mM de sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida durante 24 h. Luego se lavaron los geles reticulados en el 70 % de isopropanol/el 30 % de agua para esterilización seguido de cinco lavados en tampón fosfato estéril para purificación.

Ejemplo 2

Método de elaboración de una composición inyectable

Se creó una disolución de AH a 3,4 mg/ml disolviendo 34 mg de AH de 2 MDa en 10 ml de tampón MES 100 mM con NaCl al 0,9 % en peso, pH 4,7. Tras la hidratación y disolución completa del AH, se mezcló esta disolución con 10 ml de disolución de colágeno(III) humano 3,4 mg/ml en HCl 100 mM. El pH de la disolución de AH/colágeno(III) resultante se ajustó a 5,4 con disolución de NaOH 10 mM. Se añadieron EDC (192 mg) y 217 mg de sulfoNHS (50 mM cada uno) a la disolución de AH/colágeno(III) y se mezclaron a fondo. La reacción de reticulación avanzó durante 18 h antes de particularse el gel a través de una malla con un tamaño de poro de 100 micrómetros.

Ejemplo 3

Método de elaboración de una composición inyectable

Se concentró colágeno(I) de cola de rata en ácido clorhídrico 0,01 N (Invitrogen) desde 5 mg/ml hasta 8 mg/ml usando un dispositivo centrífugo de filtración con un valor de corte de peso molecular de 20 kDa. Se añadió AH (160 mg, 2 MDa) a 10 ml de la disolución de colágeno y se dejó hidratar durante 60 minutos. Luego se homogeneizó la disolución haciéndola pasar de jeringa a jeringa a través de conector de tipo luer-luer. Se añadieron NaCl (93 mg) y 201 mg de MES a la disolución y se mezclaron. Se añadieron EDC (98 mg) y 111 mg de sulfoNHS a la disolución y se mezclaron rápidamente. Finalmente, se añadieron 200 µl de NaOH 1 N a la disolución que se mezclaron haciéndolos pasar de jeringa a jeringa. Se transfirió la disolución de reacción a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 RPM para eliminar las burbujas de aire. Luego se particuló el gel a través de una malla con un tamaño de poro de 60 micrómetros. Tras el dimensionamiento, se esterilizó el gel mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa con un valor de corte de peso molecular de 20 kDa contra el 70 % de isopropanol/el 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. Luego se continuó la diálisis contra tampón fosfato estéril durante 48 h a 4 °C con tres cambios de tampón. Luego se dispensó el gel en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 4Método de elaboración de una composición inyectable

- 5 Se concentró colágeno(I) de cola de rata en ácido clorhídrico 0,01 N (Invitrogen) desde 5 mg/ml hasta 12 mg/ml usando un dispositivo centrífugo de filtración con un valor de corte de peso molecular de 20 kDa. Se añadió AH (120 mg, 2 MDa) a 10 ml de la disolución de colágeno y se dejó hidratar durante 60 minutos. Luego se homogeneizó la disolución haciéndola pasar de jeringa a jeringa a través de un conector de tipo luer-luer. Se añadieron NaCl (93 mg) y 201 mg de MES a la disolución y se mezclaron. Se añadieron EDC (98 mg) y 111 mg de sulfoNHS a la disolución y se mezclaron rápidamente. Finalmente, se añadieron 200 µl de NaOH 1 N a la disolución que se mezclaron haciéndolos pasar de jeringa a jeringa. Se transfirió la disolución de reacción a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 RPM para eliminar las burbujas de aire. Luego se particuló el gel a través de una malla con un tamaño de poro de 60 micrómetros. Tras el dimensionamiento, se esterilizó el gel mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa con un valor de corte de peso molecular de 20 kDa contra el 70 % de isopropanol/el 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. Luego se continuó la diálisis contra tampón fosfato estéril durante 48 h a 4 °C con tres cambios de tampón. Luego se dispensó el gel en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 5Método de elaboración de una composición inyectable

- 20 Se concentró colágeno(I) de cola de rata en ácido clorhídrico 0,01 N (Invitrogen) desde 5 mg/ml hasta 12 mg/ml usando un dispositivo centrífugo de filtración con un valor de corte de peso molecular de 20 kDa. Se añadió AH (120 mg, 2 MDa) a 10 ml de la disolución de colágeno y se dejó hidratar durante 60 minutos. Luego se homogeneizó la disolución haciéndola pasar de jeringa a jeringa a través de un conector de tipo luer-luer. Se añadieron NaCl (93 mg), 201 mg de MES, y 200 µl de NaOH 1 N a la disolución, se mezclaron, y se dieron 45 minutos para la polimerización del colágeno. Luego se añadieron EDC (98 mg) y 111 mg de sulfoNHS y se mezcló la disolución final haciéndola pasar de jeringa a jeringa. Se transfirió la disolución de reacción a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 RPM para eliminar las burbujas de aire. Luego se particuló el gel a través de una malla con un tamaño de poro de 60 micrómetros. Tras el dimensionamiento, se esterilizó el gel mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa con un valor de corte de peso molecular de 20 kDa contra el 70 % de isopropanol/el 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. Luego se continuó la diálisis contra tampón fosfato estéril durante 48 h a 4 °C con tres cambios de tampón. Luego se dispensó el gel en jeringas en condiciones asépticas.

Ejemplo 6Caracterización de reología de las composiciones

- 40 Se usó reología oscilatoria en placas paralelas para caracterizar las propiedades mecánicas de los geles usando un dispositivo Anton Paar MCR 301. Se usó un diámetro de placa de 25 mm a una altura de hueco de 1 mm. Se aplicó un barrido de frecuencia de desde 0,1 hasta 10 Hz a una deformación fija del 2 % con aumento logarítmico de la frecuencia seguido de un barrido de deformación entre el 0,1 % y el 300 % a una frecuencia fija de 5 Hz con aumento logarítmico de la deformación. El módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') se determinaron a partir de mediciones de barrido de frecuencia a 5 Hz.

- 45 El gel del ejemplo 4 tenía un módulo de almacenamiento (G') de 556 Pa y un módulo de pérdida (G'') de 131 Pa. El barrido de frecuencia (A) y el barrido de deformación (B) se muestran en la figura 1.

Ejemplo 7Ensayo de extrusión

- 50 Para determinar la fuerza requerida para extruir los geles, se eyectaron desde jeringas BD de 1 ml a través de agujas de 30G usando un dispositivo Instron 5564 con software Bluehill 2. Se empujó el émbolo a una velocidad de 100 mm/min durante 11,35 mm y se registró el perfil de extrusión.

- El perfil de extrusión a través de una aguja de 30G para el gel del ejemplo 4 se muestra en la figura 2. El gel tenía una fuerza de extrusión promedio de 25 N desde 4 hasta 10 mm.

Ejemplo 8Método de elaboración de rellenos dérmicos

- 65 Se disolvió ácido hialurónico, peso molecular de 2 MDa, en disolución de colágeno(I) humano en ácido clorhídrico 0,01 N (Advanced BioMatrix). Se añadió cloruro de sodio al 0,9 % en peso y se añadió ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico a 100 mM a la disolución y se mezclaron. Se dejó hidratar el ácido hialurónico durante 1 h y

se homogeneizó la disolución mediante mezclado de jeringa a jeringa. Se ajustó el pH de la disolución a 5,4 mediante adición de hidróxido de sodio 1 N. Se añadieron 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (50 mM) y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida (50 mM) a la disolución de ácido hialurónico/colágeno y se mezclaron rápidamente mediante transferencia de jeringa a jeringa. Se transfirió la disolución a un vial de vidrio y se centrifugó durante 5 min a 4000 RPM para eliminar las burbujas de aire. Se dejó reaccionar el gel resultante durante 16 h a 4 °C. Luego se particuló el gel a través de una malla con un tamaño de poro de 100 micrómetros. Tras el dimensionamiento, se esterilizó el gel mediante diálisis a través de una membrana de éster de celulosa con un valor de corte de peso molecular de 20 kDa contra el 70 % de isopropanol/el 30 % de agua durante 3 h a 4 °C. Luego se continuó la diálisis contra tampón fosfato estéril, pH 7,4, durante 48 h a 4 °C con cuatro cambios de tampón. Luego se dispensó el gel en jeringas en condiciones asépticas.

Se usó este procedimiento para producir hidrogeles con concentraciones variables de ácido hialurónico y colágeno. Cuando se requería, se concentró colágeno(I) humano en ácido clorhídrico 0,01 N desde 3 mg/ml hasta la concentración de reacción deseada en dispositivos centrífugos de filtración con un valor de corte de peso molecular de 20 kDa. Se sintetizó una muestra de 50 ml de cada gel, se esterilizó mediante exposición a isopropanol al 70 %, y se purificó mediante diálisis contra tampón fosfato, pH 7,4. Los geles sintetizados se describen en la tabla 2 junto con sus propiedades reológicas.

ID de muestra	[AH] (mg/ml)	[Col(I)] (mg/ml)	G' (Pa)	G'' (Pa)
A*	3	3	199	24,6
B	12	6	1260	154
C	16	8	2450	288
D	12	12	3160	420
E	24	12	5440	433
F	12	3	1110	52,2
G	16	3	1490	60,6
H	20	3	1770	49,5

Tabla 2: Concentraciones de síntesis de hidrogeles de ácido hialurónico-colágeno(I) humano y propiedades reológicas (*: comparativo)

Ejemplo 9

Concentración de biopolímero de los rellenos dérmicos

Para determinar la concentración de biopolímero en los geles, se comparó el peso del gel hidratado con el del gel seco. Se pesó una muestra de 2 ml de gel y se secó mediante congelación instantánea en nitrógeno líquido seguido de liofilización a -50 °C y 0,02 Torr. También se pesó y se secó de la misma manera una disolución del tampón apropiado para tener en cuenta el contenido de sal del gel. Se calculó el contenido total de sólidos del gel dividiendo el peso seco entre el volumen húmedo, suponiendo una densidad de 1 g/ml para el gel húmedo, para dar un valor en mg/ml. El contenido de sólidos de la sal se restó entonces de este valor para determinar la concentración de biopolímero en el gel.

ID de muestra	[AH](mg/ml)	[Col(I)] (mg/ml)	Concentración final (mg/ml)
A*	3	3	5,3
B	12	6	16,3
C	16	8	19,4
D	12	12	22,6
E	24	12	31,6

Tabla 3: Concentraciones finales de hidrogeles de ácido hialurónico-colágeno(I) humano (*: comparativo).

Ejemplo 10

Razones de hinchamiento

Las razones de hinchamiento relativas al contenido inicial de agua se determinaron para geles mediante el aumento de peso cuando se equilibraron con tampón fosfato. Para cada gel, se inyectó aproximadamente 1 ml en un tubo

Falcon de 15 ml y se pesó, seguido de la adición de 10 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Se mezclaron a fondo los geles con el tampón y se agitaron con vórtex durante 30 segundos. Luego se dejaron equilibrar los geles en el tampón durante 48 horas a 4 °C. Después de este tiempo, se centrifugaron las suspensiones a 4000 RPM en un rotor de cubeta oscilante durante 5 minutos. Luego se decantó el tampón sobrenadante y se midió el peso del gel hinchado. Se determinó la razón de hinchamiento dividiendo el peso final del gel hinchado entre el peso del gel inicial.

ID de muestra	[AH] (mg/ml)	[Col(I)] (mg/ml)	Razón de hinchamiento
A*	3	3	0,96
B	12	6	1,67
C	16	8	1,69
D	12	12	1,49
E	24	12	1,65

Tabla 4: Razones de hinchamiento de hidrogeles de ácido hialurónico-colágeno(I) humano (comparativo)

Ejemplo 11

AH/Colágeno para defectos faciales de la mejilla

Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos divulgados en el presente documento para un trastorno facial.

Una mujer de 58 años presentó una cara delgada. Sentía su cara vieja, opaca y áspera debido a la menor amplitud de su contorno de mejilla. La evaluación preoperatoria de la persona incluye antecedentes de rutina y exploración física además de consentimiento informado a fondo que divulga todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que es un candidato para la administración de las composiciones de relleno dérmico y los métodos divulgados en el presente documento.

Se proporciona una composición de la invención, tal como se describe en el ejemplo 4, en una jeringa de 20 ml. Se usan cánulas de infiltración romas de un orificio (diámetro interior de 3 mm) para colocar aproximadamente 15 ml de la composición en la jeringa por vía subcutánea y bajo el sistema musculoaponeurótico superficial en las mejillas izquierda y derecha.

Se monitoriza al individuo durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa el área de tratamiento y determina que el tratamiento fue exitoso. Las mejillas de la mujer están más llenas que antes del tratamiento, tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento porque parece más joven que cuando llegó a tratamiento.

Ejemplo 12

Tratamiento de defectos faciales de los párpados

Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos divulgados en el presente documento para un tratamiento de defectos de los párpados.

Una mujer de 37 años presentaba arrugas finas alrededor de sus ojos e informó que sus ojos le daban un aspecto viejo y enfadado. La evaluación preoperatoria de la persona incluye antecedentes de rutina y exploración física además de consentimiento informado a fondo que divulga todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que es un candidato para la administración de las composiciones de relleno dérmico y los métodos divulgados en el presente documento.

Se proporciona una composición, tal como la elaborada tal como se describe en el ejemplo 5, en una jeringa de 20 ml. Se inyectan aproximadamente 2,5 ml de la composición con una aguja fina por vía subcutánea en la piel debajo de las arrugas en las regiones adyacentes a los ojos.

Se monitorizó al individuo durante aproximadamente 7 días. El médico evalúa el ojo de la paciente y determina que el tratamiento fue exitoso. Tanto la mujer como su médico están satisfechos con los resultados del procedimiento porque sus ojos parecen descansados y la piel parece rejuvenecida. Aproximadamente un año después del procedimiento, la mujer indica que su calidad de vida ha mejorado.

Ejemplo 13

Tratamiento de cicatrices de acné

5 Este ejemplo ilustra el uso de composiciones y métodos divulgados en el presente documento para un tratamiento de cicatrices de acné.

10 Un hombre de 25 años presenta una cicatrización patológica del acné en su línea de la mandíbula, incluyendo depresiones y picaduras. Informa que no está satisfecho con su aspecto y siente que está inhibido socialmente debido a su percepción de su aspecto. La evaluación preoperatoria de la persona incluye antecedentes de rutina y exploración física además de consentimiento informado a fondo que divulga todos los riesgos y beneficios relevantes del procedimiento. El médico que evalúa al individuo determina que es un candidato para la administración de las composiciones de relleno dérmico y los métodos divulgados en el presente documento.

15 Se proporciona una composición, tal como la elaborada tal como se describe en el ejemplo 12, en jeringas de 10 ml. El médico inyecta una pequeña cantidad de la composición debajo de la piel en cada área deprimida o picada de la línea de la mandíbula del paciente para levantar el área para que coincida con la piel circundante.

20 El individuo vuelve para una visita de seguimiento con el médico en 14 días. El médico evalúa al paciente y determina que el tratamiento fue exitoso. El hombre informa que está satisfecho con los resultados del procedimiento porque su piel tiene un aspecto más liso y la cicatrización patológica del acné es sustancialmente menos visible. Aproximadamente seis meses después del procedimiento, el hombre vuelve para un tratamiento de seguimiento. Informa al médico que su calidad de vida ha mejorado mucho desde el procedimiento y él ya no se avergüenza de su aspecto.

25

REIVINDICACIONES

1. Producto estético para tejidos blandos que comprende:
 - 5 un relleno que comprende un hidrogel homogéneo que tiene una forma adecuada para inyectarlo en tejido de mamífero; y
 - una etiqueta que comprende instrucciones para inyectar el relleno en el tejido;
 - 10 en el que el hidrogel homogéneo comprende agua, y una matriz macromolecular reticulada que comprende:
un componente de ácido hialurónico; y
un componente de colágeno;
 - 15 en el que el componente de ácido hialurónico se reticula con el componente de colágeno mediante un componente de reticulación; y
 - 20 en el que el componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación,
en el que al menos una porción de las unidades de reticulación comprenden un enlace éster o un enlace amida,
 - 25 en el que la concentración de ácido hialurónico es de desde 6 mg/ml hasta 24 mg/ml; la concentración de colágeno es de desde 1 mg/ml hasta 15 mg/ml; y el hidrogel tiene un valor de módulo de almacenamiento de entre 50 Pa y 10.000 Pa.
2. Producto según la reivindicación 1, en el que el componente de colágeno comprende colágeno tipo I o colágeno tipo III.
3. Producto según la reivindicación 1, en el que la matriz macromolecular reticulada tiene una razón en peso del componente de ácido hialurónico con respecto al componente de colágeno de aproximadamente 1 a aproximadamente 7.
4. Producto según la reivindicación 1, en el que el hidrogel está en forma de un relleno dérmico.
5. Producto según la reivindicación 1, en el que el hidrogel está en forma de un relleno para labios.
6. Método de mejorar una cualidad estética de tejido blando de un ser humano que comprende:
 - 40 inyectar una composición de hidrogel homogéneo en un tejido blando del ser humano para mejorar de ese modo la cualidad estética del tejido blando;
 - 45 en el que la composición de hidrogel homogéneo comprende agua, y una matriz macromolecular reticulada que comprende:
un componente de ácido hialurónico; y
un componente de colágeno;
 - 50 en el que el componente de ácido hialurónico se reticula con el componente de colágeno mediante un componente de reticulación; y
 - 55 en el que el componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación, en el que al menos una porción de las unidades de reticulación comprenden un enlace éster o un enlace amida,
 - 60 en el que la concentración de ácido hialurónico es de desde 6 mg/ml hasta 24 mg/ml; la concentración de colágeno es de desde 1 mg/ml hasta 15 mg/ml; y el hidrogel tiene un valor de módulo de almacenamiento de entre 50 Pa y 10.000 Pa.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el componente de colágeno comprende colágeno tipo I o colágeno tipo III.
8. Método según la reivindicación 6, en el que el hidrogel está en forma de un relleno dérmico.
9. Método según la reivindicación 6, en el que el hidrogel está en forma de un relleno para labios.

10. Relleno dérmico que comprende:
5 un hidrogel homogéneo que tiene una forma adecuada para inyectarlo en tejido de mamífero;
en el que el hidrogel homogéneo comprende agua, y una matriz macromolecular reticulada que comprende:
un componente de ácido hialurónico; y
10 un componente de colágeno;
en el que el componente de ácido hialurónico se reticula con el componente de colágeno mediante un
componente de reticulación; y
15 en el que el componente de reticulación comprende una pluralidad de unidades de reticulación,
en el que al menos una porción de las unidades de reticulación comprenden un enlace éster o un enlace
amida,
20 en el que la concentración de ácido hialurónico es de desde 6 mg/ml hasta 24 mg/ml; la concentración de
colágeno es de desde 1 mg/ml hasta 15 mg/ml; y el hidrogel tiene un valor de módulo de almacenamiento
de entre 50 Pa y 10.000 Pa.
- 25 11. Relleno dérmico según la reivindicación 10, en el que el componente de colágeno comprende colágeno tipo
I o colágeno tipo III.
12. Relleno dérmico según la reivindicación 10, en el que la matriz macromolecular reticulada tiene una razón
en peso del componente de ácido hialurónico con respecto al componente de colágeno de
aproximadamente 1 a aproximadamente 7.
- 30 13. Producto según las reivindicaciones 1-5, método según las reivindicaciones 6-9, o relleno dérmico según las
reivindicaciones 10-12, en los que la concentración de ácido hialurónico y la concentración de colágeno
está en una disolución acuosa de pre-reacción o una mezcla de reacción de reticulación.

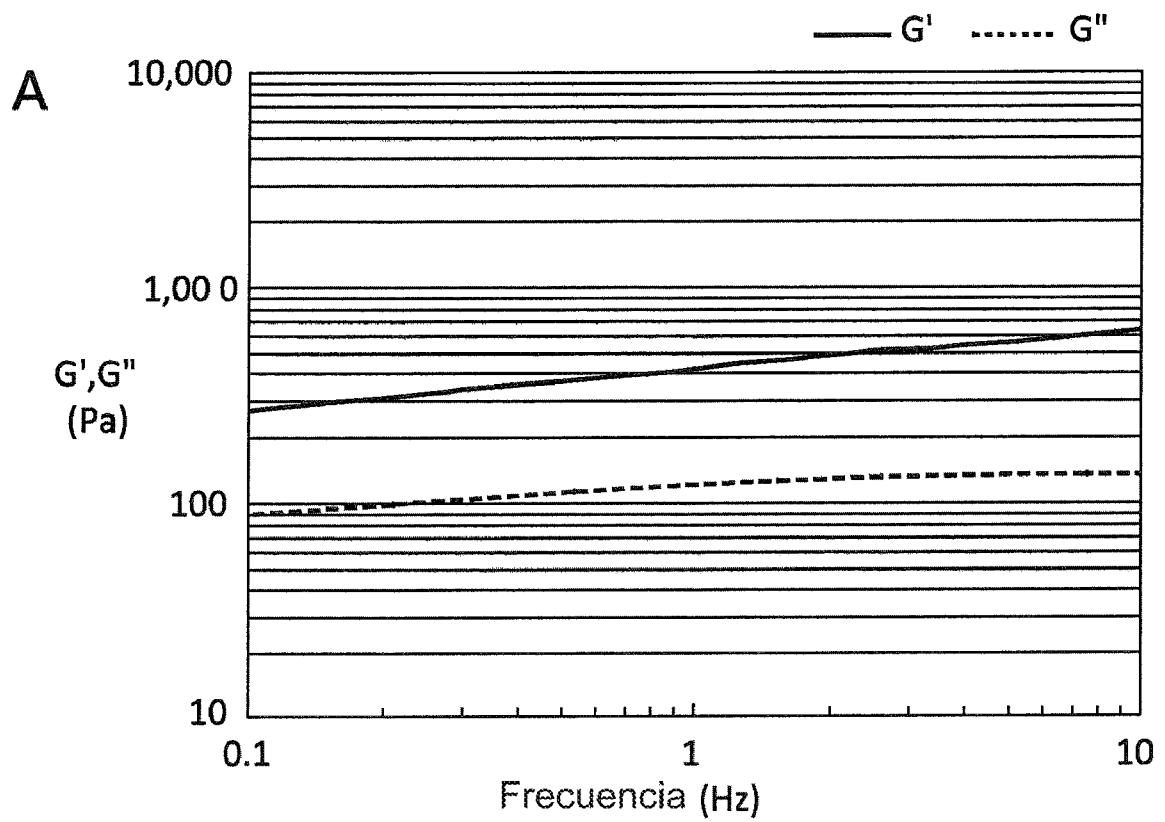


FIG. 1A

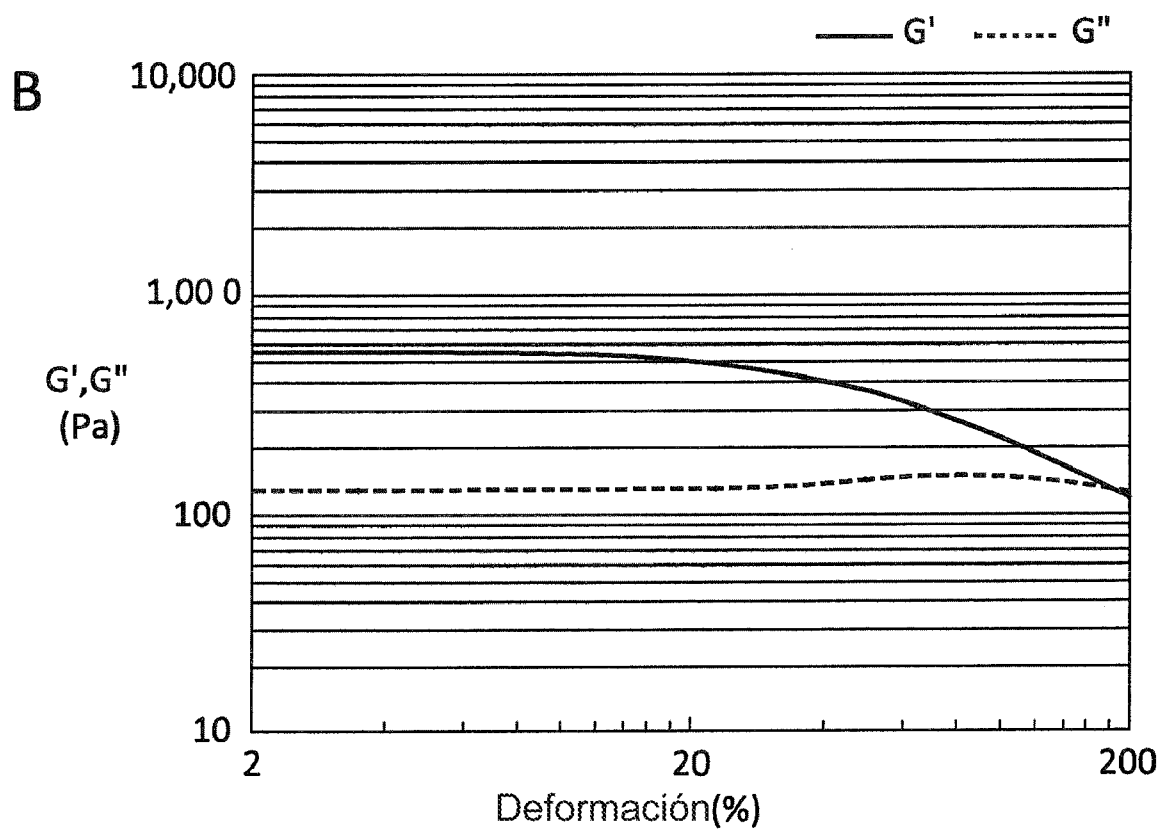


FIG. 1B

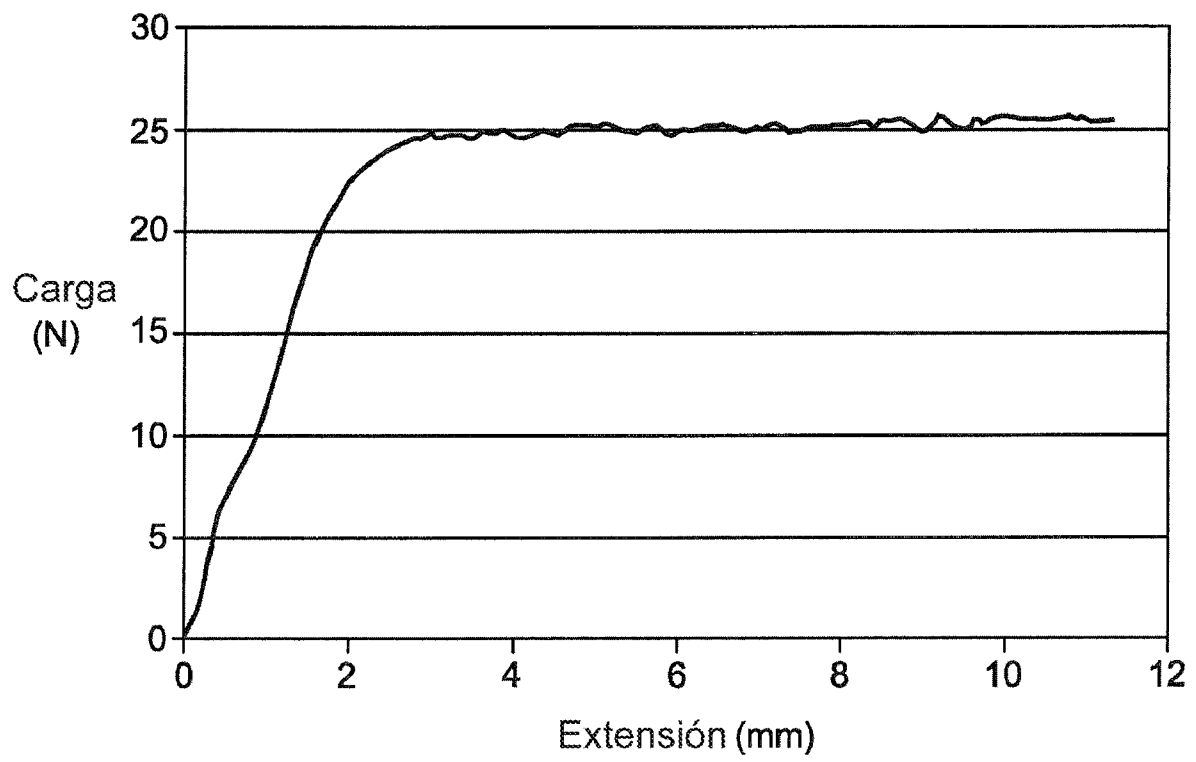


FIG. 2

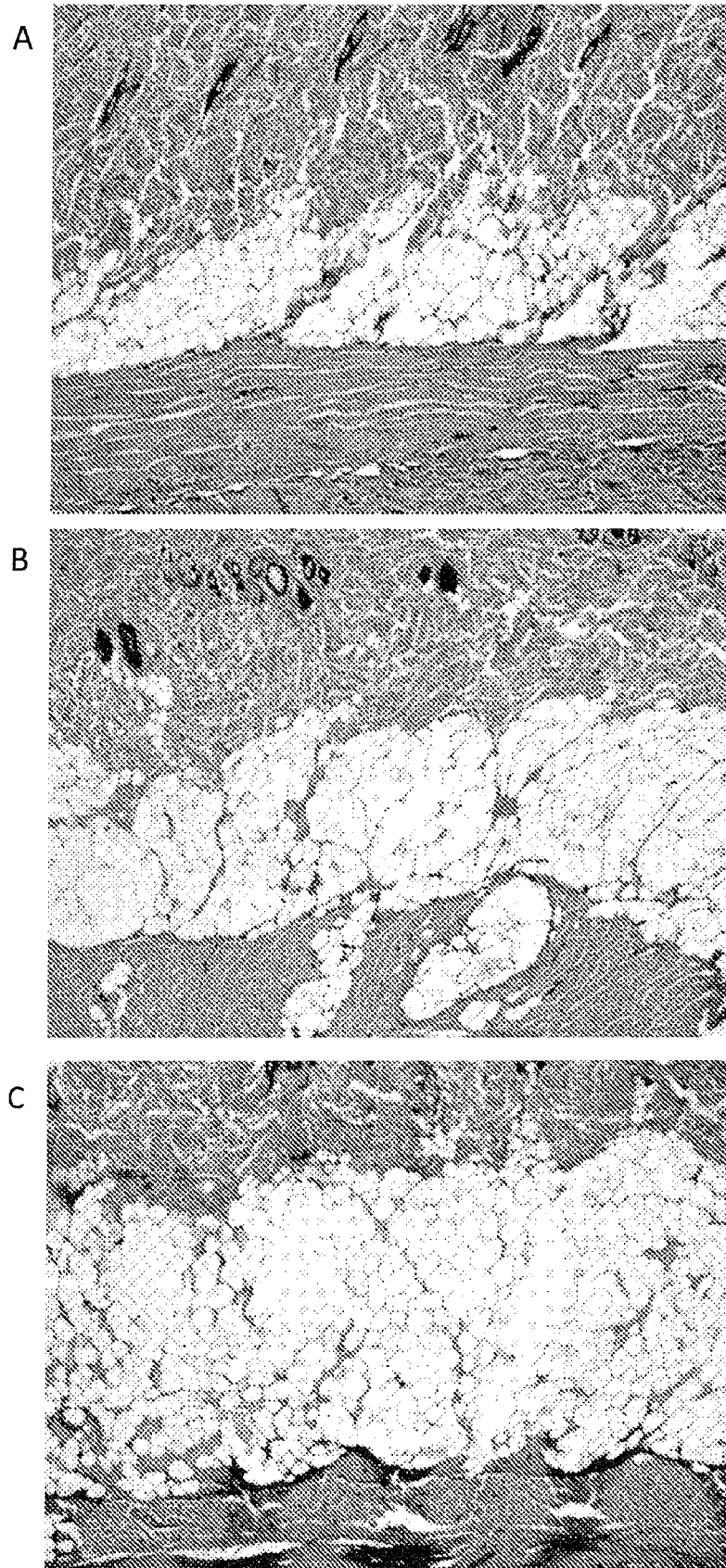


FIG. 3