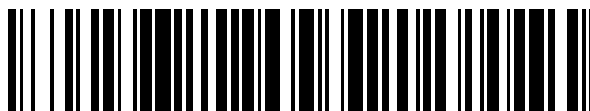


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 972**

51 Int. Cl.:

**A61L 15/32** (2006.01)  
**A61L 26/00** (2006.01)  
**A61K 9/70** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2004 E 04808918 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2012 EP 1694370**

54 Título: **Productos para el cuidado de heridas con contenido de queratina**

30 Prioridad:

**19.12.2003 NZ 53029603**

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

**01.03.2013**

73 Titular/es:

**KERATEC LIMITED (100.0%)  
SPRINGS ROAD  
LINCOLN, CANTERBURY, 8152, NZ**

72 Inventor/es:

**KELLY, ROBERT JAMES;  
RODDICK-LANZILOTTA, ALISA DAWN y  
ALI, MOHAMMAD AZAM**

74 Agente/Representante:

**RIZZO, Sergio**

**ES 2 396 972 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).

**PRODUCTOS PARA EL CUIDADO DE HERIDAS CON CONTENIDO DE QUERATINA**

**Descripción**

**Campo**

[0001] La invención está relacionada con los productos para el cuidado de heridas que  
5 contienen queratina.

**Antecedentes de la invención**

[0002] Las heridas y lesiones pueden causarse por una variedad de sucesos,  
incluyendo la cirugía, lesiones traumáticas, quemaduras, abrasiones e injertos de piel.  
La curación de heridas puede ser difícil y puede provocar problemas como úlceras y  
10 septicemia. Son especialmente preocupantes las heridas crónicas, como escaras por  
presión y úlceras diabéticas. El tratamiento de estas afecciones cobra una importancia  
creciente a medida que la población envejece. La cascada convencional de procesos  
bioquímicos que ocurre en la curación de heridas, que implica hemostasia e  
inflamación, formación de tejido de granulación y reepitelización y remodelado, se  
15 interrumpe en el caso de las heridas crónicas debido parcialmente a la prolongada  
respuesta inflamatoria que se produce y a la liberación de enzimas destructivas por  
parte de las células inflamatorias.

[0003] Se ha reconocido durante cierto tiempo que mantener un ambiente húmedo  
puede mejorar la velocidad de curación de la herida. Se han desarrollado muchos  
20 productos que proporcionan este ambiente para aumentar la velocidad de reparación  
de heridas crónicas. Los materiales usados en estos apósitos son biocompatibles  
hasta cierto punto e incluyen ácido poliláctico, quitina, derivados de alginato y  
colágeno. La respuesta de estos materiales a los exudados de heridas y el ambiente  
bioquímico que estos materiales proporcionan es fundamental para su rendimiento en  
25 la herida.

[0004] Los apósitos disponibles en el mercado incluyen diversos materiales sintéticos  
como compuestos de silicona, tejidos de nylon o gasas con petrolato y similares [A.J.  
Platt, A. Phipps y K. Judkins, *A comparative study of silicone net dressing and paraffin  
gauze dressing in skin-grafted sites*. Burns, 22(7), 1996, p. 543-545: Claudia Valenta y  
30 Barbara G. Auner, *The use of polymers for dermal and transdermal delivery*, European  
Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 58(2), 2004, p. 279-289]. Aunque  
estos materiales de apósitos de heridas convencionales no son caros y se encuentran  
fácilmente, generalmente tienen una afinidad pobre con el área de la herida,  
insuficiente permeabilidad al vapor y finalmente resultan insatisfactorias en relación  
35 con la curación a largo plazo de heridas crónicas [Marcel F. Jonkman, Izaak Molenaar,  
Paul Nieuwenhuis, Peter Bruin y Albert J. Pennings, *New method to assess the water*

*vapour permeance of wound coverings*, *Biomaterials*, 9(3), 1988, p. 263-267]. Los materiales de apósitos para heridas de alto rendimiento a menudo se derivan de materiales naturales que tienen propiedades similares a aquellas de la piel del paciente.

5 **[0005]** Los apósitos para heridas pueden crearse utilizando materiales naturales o a través de una combinación de materiales sintéticos y materiales naturales (JP# 47470/1988; Jen Ming Yang y Hao Tzu Lin, *Properties of chitosan containing PP-g-AA-g-NIPAAm bigraft nonwoven fabric for wound dressing*, *Journal of Membrane Science*, 243(1-2), 2004, p. 1-7). El uso de apósitos para heridas es una parte extremadamente  
 10 importante del control de heridas y vital para lograr un resultado de curación exitoso [Gordon Freedman, Hyacinth Entero y Harold Brem, *Practical treatment of pain in patients with chronic wounds: pathogenesis-guided management*, *The American Journal of Surgery*, 188(1), 2004, p. 31-35]. Un apósito para heridas óptimo protege el tejido dañado, mantiene un ambiente húmedo, es permeable al agua, mantiene un  
 15 control microbiano, libera agentes curativos en el lugar de la herida, es fácil de aplicar, no exige cambios frecuentes y no es tóxico ni antigénico.

**[0006]** Actualmente, existen disponibles en el mercado varias formas de materiales de apósitos para heridas, incluyendo apósitos oclusivos, apósitos no adherentes, apósitos absorbentes y apósitos en forma de láminas, espumas, polvos y geles. Se han  
 20 realizado intentos de facilitar apósitos mejorados, especialmente para heridas crónicas, que ayuden en el proceso de curación de la herida usando materiales biológicos como células y factores de crecimiento. Hasta ahora, estos materiales biológicos han demostrado ser muy costosos debido a factores como los procesos de fabricación y cuestiones de almacenamiento y estabilidad y además han demostrado  
 25 una relevancia clínica mínima en la aceleración del proceso de curación de heridas crónicas. Sobre todo, el tratamiento de heridas efectivo exige la comprensión del proceso de reparación tisular y el conocimiento de las propiedades de los materiales del apósito para heridas. Solo cuando estos factores se consideran conjuntamente el proceso de selección de apósito puede llevarse a cabo de forma racional e  
 30 informada.

**[0007]** Las proteínas de queratina están presentes en una amplia gama de tejidos biológicos, realizando un papel estructural en la piel, el pelo y otros materiales. Las queratinas extraídas del pelo han demostrado ser un componente valioso en los apósitos para heridas. US 5932552 proporciona un material de queratina  
 35 biocompatible preparado mediante reducción u oxidación para su uso como un componente en los productos para el cuidado de heridas. Aquellos métodos incluidos

en la técnica para la oxidación de queratinas para crear un grupo polar son duros y degradan la queratina, provocando el daño de la proteína y la pérdida de características físicas básicas de la composición de aminoácidos de la proteína y estructura terciaria. Además de la oxidación, los procesos utilizados en la preparación de estos materiales son irreversibles y los grupos de ácido cisteico formados no pueden reconvertirse en cistina para llevar a cabo una función estructural útil. Aquellos métodos incluidos en la técnica para la reducción para crear proteínas solubles se realizan en condiciones alcalinas rigurosas que también causan el daño de la proteína y la pérdida de características físicas básicas de las proteínas de queratina.

5  
10 **[0008]** Los componentes esenciales de las fibras de queratina, específicamente las proteínas de filamentos intermedios y las proteínas de la matriz presentes en la lana y el pelo, desempeñan un papel específico en la fibra que se refleja en su estructura terciaria y la composición de aminoácidos. Estas mismas características pueden capitalizarse en la creación de materiales con buenas propiedades físicas y altas capacidades de absorción cuando se usan formas purificadas de estas proteínas. Para ello, los métodos utilizados para aislar queratinas deben ser suaves, para evitar el deterioro de la proteína, crear modificaciones de cistina que sean reversibles, para permitir la reconstitución de materiales resistentes a través de la creación de enlaces de cistina y facilitar el aislamiento de fracciones proteínicas de queratina específicas de la fuente de queratina. La presente invención proporciona nuevos materiales para su uso en productos para el cuidado de heridas que están preparados según estos principios.

**Objetivo de la invención**

25 **[0009]** Un objetivo de la invención consiste en proporcionar un producto para el cuidado de heridas que usa una fracción proteínica de queratina. Otro objetivo de la invención reside en proporcionar una fracción proteínica de queratina que esté intacta y S-sulfonada para su uso en el cuidado de heridas o al menos para proporcionar al público una opción útil.

**Resumen de la invención**

30 **[0010]** La presente invención proporciona un material para su uso en los apósitos para heridas, que comprende una fracción proteínica de queratina S-sulfonada intacta producida en forma de película, fibra, espuma o hidrogel, y que ha sido tratada químicamente para eliminar la funcionalidad S-sulfonato y generar enlaces disulfuro. El término "intacto" indica proteínas que no han sido hidrolizadas de forma significativa y que son equivalentes a las proteínas de queratina en su forma nativa sin la formación de enlaces disulfuro cruzados durante el proceso de queratinización.

35

[0011] La fracción proteínica de queratina intacta puede ser una fracción de la familia de proteínas de los filamentos intermedios.

[0012] La fracción proteínica de queratina intacta puede ser una fracción de la familia de proteínas con alto contenido de azufre.

5 [0013] El material a usar en el vendaje de heridas puede encontrarse en forma de un hidrogel.

[0014] La proteína de queratina intacta puede enlazarse de forma cruzada químicamente con glutaraldehído.

#### **Breve descripción de los dibujos**

10 [0015] La invención se describirá ahora, a modo de ejemplo exclusivamente, en relación con los siguientes modos de realización específicos:

**Figura 1:** muestra la respuesta de las heridas tratadas con queratina y otros materiales.

**Figura 2:** muestra la proliferación de fibroblastos de ovejas en materiales de queratina;

15 **Figura 3:** muestra la proliferación de fibroblastos humanos en materiales de queratina;

**Figura 4:** muestra el efecto de estimulación con Con(A) en el crecimiento de células T en presencia matrices de queratina; y

**Figura 5:** muestra el efecto de Con(A) en la estimulación del crecimiento de células T en presencia de matrices de queratina después de 72 horas.

#### **20 Descripción detallada de la invención**

[0016] Las proteínas de queratina alfa dura como aquellas que se derivan del pelo humano, lana, fibras animales, cuernos, pezuñas u otras fuentes de mamíferos, pueden clasificarse en componentes específicos según sus propiedades bioquímicas, específicamente su peso molecular y composición de aminoácidos. La Tabla 1 ilustra  
25 la composición de aminoácidos determinada por métodos analíticos convencionales de fracciones proteínicas de queratina típicas conocidas en la técnica y también el tema de esta invención. Esto implica la hidrólisis ácida del analito que convierte toda la cistina y derivados de cistina lábiles en cisteína, normalmente registrado como media-cistina.

30 **Tabla 1:** composición de aminoácidos de fracciones de queratina: proteína de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada (SIFP, en inglés), proteína con alto contenido en azufre de queratina S-sulfonada (SHSP, en inglés), péptido de queratina S-sulfonada (SPEP), según su uso en la invención. Las proteínas de los filamentos intermedios (IFP), proteínas con alto contenido de azufre (HSP) y lana pura cortesía  
35 de Gillespie y Marshall, *Variability in the proteins of wool and hair*, Proc. Sixth Int. Wool

Text. Res. Conf., Pretoria, 2, 67-77, 1980. Todos los residuos se expresan como %mol. La S-sulfocisteína, cistina y cisteína se miden como S-carboximetil cisteína tras la reducción y alquilación, y se registra como cys.

5		SIFP	SHSP	SPEP	IFP	HSP	Lana pura
	Cya	0,4	1,7	0,7	0	0	0
	Asp	7,9	2,6	S	9,6	2,3	5,9
	Glu	15,4	8,6	15	16,9	7,9	11,1
	Ser	10,9	14,3	11,4	8,1	13,2	10,8
	Gly	8,1	9,1	8,4	5,2	6,2	8,6
10	His	0,9	0,8	0,9	0,6	0,7	0,8
	Arg	7,9	6,8	6,9	7,9	6,2	6,2
	Thr	6,5	10,4	6,5	4,8	10,2	6,5
	Ala	7,5	3,6	7,5	7,7	2,9	5,2
	Pro	5,4	12,6	5,7	3,3	12,6	6,6
	Tyr	1,1	1,8	1,2	2,7	2,1	3,8
15	Val	6,5	6,3	5,8	6,4	5,3	5,7
	Met	0,2	0	0,3	0,6	0	0,5
	Lan	0,2	0,2	0,3	0	0	0
	Ile	3,7	2,9	3,4	3,8	2,6	3
	Leu	8,9	3,9	8	10,2	3,4	7,2
20	Phe	2,5	1,5	2,1	2	1,6	2,5
	Lys	2,1	0,4	2,1	4,1	0,6	2,7
	Cys	4,2	12,4	4,6	6	22,1	13,1

[0017] La Tabla 2 ilustra el peso molecular determinado mediante métodos analíticos convencionales de fracciones proteínicas de queratina típicas conocidas en la técnica y también el tema de esta invención. Los análisis convencionales implican la escisión de enlaces de cistina dentro de la queratina utilizando la reducción de forma que la masa de la proteína se determine en su estado original y no enlazado, más similar al estado no queratinizado de la proteína. La masa se determina utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida. En el caso del péptido SPEP, la masa se determina utilizando espectrometría de masas. Utilizando estos métodos la queratina se hace soluble sin hidrólisis de enlaces peptídicos y se determina una medición precisa del peso molecular.

35

**Tabla 2:** Peso molecular de las fracciones de queratina: proteína de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada (SIFP, en inglés), proteína con alto contenido en azufre de queratina S-sulfonada (SHSP, en inglés), péptido de queratina S-sulfonada (SPEP), según su uso en la invención. Las proteínas de los filamentos intermedios (IFP) y proteínas con alto contenido de azufre (HSP) cortesía de Gillespie y Marshall, *Variability in the proteins of wool and hair*, Proc. Sixth Int. Wool Text. Res. Conf, Pretoria, 2: 67-77 1980.

Fracción proteínica de queratina	Peso molecular/kD
SIFP	45-60
SHSP	10-25
SPEP	<1
IFP	45-60
HSP	11-23

**[0018]** Tanto la composición de aminoácidos como el peso molecular varían, en escasa medida, entre los tipos de queratina, entre especies y también dentro de las razas de una especie, por ejemplo entre lanas de diferentes razas ovinas. Las cifras dadas en las Tablas 1 y 2 son indicativas para la fuente de queratina mencionada. Sin embargo, los tipos individuales de proteínas de queratina, o fracciones proteínicas de queratina, tienen características distintivas, especialmente el peso molecular y contenido de aminoácidos.

**[0019]** El tema de la invención son materiales que contienen fracciones proteínicas de queratina s-sulfonada. "Intacto" hace referencia a proteínas que no han sido hidrolizadas de forma significativa, definiéndose la hidrólisis como la escisión de enlaces con la adición de agua. Gillespie (*Biochemistry and physiology of the skin*, vol 1, Ed. Goldsmith Oxford University Press, London, 1983, pp475-510) considera que "intacto" se refiere a proteínas en el estado polimérico queratinizado y se refiere además subunidades de polipéptido que forman complejo para formar queratinas intactas en la lana y el pelo. Para el fin de esta invención, "intacto" se refiere a las subunidades de polipéptido descritas por Gillespie. Éstas son equivalentes a las proteínas de queratina en su forma nativa sin los enlaces disulfuro cruzados formados a lo largo del proceso de queratinización.

**[0020]** Las fracciones proteínicas de queratina son grupos distintos dentro de la familia de proteínas de queratina, como las proteínas de los filamentos intermedios, las proteínas con alto contenido en azufre o proteínas con alto contenido en glicina-tirosina bien conocidas en la técnica. Las proteínas de los filamentos intermedios se

describen en detalle por Orwin et al (*Structure and Biochemistry of Mammalian Hard Keratin*, Electron Microscopy Reviews, 4.47,1991) y son también denominadas proteínas con bajo contenido en azufre por Gillispie (*Biochemistry and physiology of the skin*, vol 1, Ed. Goldsmith Oxford University Press, London. 1983. pp475-510). Las características clave de esta familia de proteínas son el peso molecular en el intervalo de 40 - 60 kD y un contenido de cisteína, medido como media cistina, de aproximadamente el 4%. La familia de proteínas con alto contenido en azufre también se describe por Orwin y Gillispie en las mismas publicaciones. Esta familia de proteínas tiene un alto grado de heterogeneidad pero puede caracterizarse por tener un peso molecular en el intervalo de 10 - 30 kD y un contenido de cisteína de más del 10%. El subgrupo de esta familia, las proteínas con contenido ultra alto de azufre pueden tener un contenido de cisteína de hasta el 34%. La familia de proteínas con alto contenido de glicina-tirosina también se describe por Orwin y Gillispie en las mismas publicaciones. Esta familia también se denomina proteínas con alto contenido en tirosina y sus características son un peso molecular de menos de 10 kD, un contenido de tirosina normalmente superior al 10% y un contenido de glicina normalmente superior al 20%.

**[0021]** Para el fin de esta invención, una "fracción proteínica de queratina" es una forma purificada de queratina que contiene de forma predominante, aunque no completa, un grupo de proteínas diferenciado como se describe arriba. En el contexto de esta invención las queratinas S-sulfonadas tienen cisteína/cistina presente predominantemente en forma de S-sulfocisteína, comúnmente conocida como la sal de Bunte. Este grupo altamente polar imparte un grado de solubilidad a las proteínas. Aunque estén estables en solución, el grupo S-sulfo es un derivado de cisteína lábil, altamente reactivo con los tioles, como cisteína y otros agentes reductores. La reacción con agentes reductores lleva a la conversión del grupo de S-sulfo cisteína de nuevo a cisteína. La S-sulfo cisteína es químicamente diferente al ácido cisteico, aunque ambos grupo contengan el grupo S03. El ácido cisteico es producido de forma irreversible por la oxidación de cisteína o cistina y una vez que se forma no puede formar enlaces disulfuro cruzados de nuevo en cisteína. La S-sulfocisteína es reactiva hacia la cisteína y forma fácilmente enlaces disulfuro cruzados.

**[0022]** Puede prepararse SIFP mediante métodos como aquellos descritos en W003011894.

**[0023]** Este aspecto y otros detalles de la invención se describirán ahora más específicamente.

**[0024]** Las queratinas altamente S-sulfonadas han demostrado ser capaces de



formarse en una variedad de matrices incluyendo películas, fibras y esponjas porosas utilizando métodos como aquellos descritos en NZ/PCT/00169 (WO 03/018673).

**[0025]** Las proteínas de los filamentos intermedios de queratina de lana purificada son especialmente adecuadas para la reformación en matrices, debido en parte a su alto peso molecular y su estructura terciaria. Los métodos descritos en NZ/PCT/00169 realizan un uso extensivo de estos materiales para formar matrices útiles.

**[0026]** Las S-sulfo queratinas pueden prepararse mediante una variedad de métodos; incluyendo aquellos descritos en PCT/NZ02/00125 (WO 03/011894).

**[0027]** Las matrices de esponja porosa son especialmente útiles en el ambiente de una herida puesto que pueden desempeñar un papel importante en la absorción de exudados de la herida y manteniendo un ambiente sano para la curación de la herida. Además, pueden actuar como medio para la administración de otros agentes de curación, como factores de crecimiento, agentes antibacterianos o células cultivadas, que estimulan el proceso curativo. Estas características se mejoran mediante el uso de fracciones proteínicas de queratina S-sulfonada para construir las matrices. La naturaleza altamente polar del grupo S-sulfo hace que las matrices que se derivan de este material sean altamente absorbentes. Además, las queratinas S-sulfonadas son biocompatibles y no provocan una respuesta adversa *in vitro*.

**[0028]** Las películas son un componente importante en los apósitos para el tratamiento de heridas, proporcionando una barrera para proteger la herida y mantener un ambiente apropiado para fomentar la curación. Las películas de queratinas S-sulfonadas son biocompatibles y no provocan una respuesta adversa *in vitro*. Como tal, son componentes útiles en un apósito para heridas.

**[0029]** Las fibras reconstituidas de las proteínas de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada pueden usarse como un componente para apósitos para heridas. Las fibras son especialmente versátiles puesto que pueden formarse en construcciones tejidas o no tejidas y puede usarse el diseño de fibra como un buen control de la química del material para efectuar la interacción del apósito con la herida. Se ha realizado mucho trabajo sobre el uso de fibras regeneradas en el cuidado de heridas, específicamente fibras de alginato. Las fibras de queratina reconstituidas derivadas de proteínas de los filamentos intermedios S-sulfonadas son un material nuevo para su uso en aplicaciones similares.

**[0030]** Los hidrogeles se usan frecuentemente en los apósitos para heridas y juegan un papel importante en el control del ambiente de la herida y proporcionan un medio adecuado para la administración de agentes activos para estimular o ayudar en la curación. Las queratinas S-sulfonadas, en concreto proteína de los filamentos

intermedios de queratina intacta S-sulfonada, es un sustrato excelente para la formación de hidrogeles como resultado del alto grado de orden e interacción intermolecular que se puede lograr como resultado de la naturaleza intacta de las proteínas.

5 **[0031]** Los materiales de queratina derivados de las fracciones proteínicas SIFP y SHSP contienen diferentes cantidades del grupo S-sulfo altamente polar, y por tanto, difieren en sus características fisicoquímicas, en especial en su capacidad de absorber humedad. Los apósitos para heridas derivados de una combinación de los mismos absorben la humedad en mayor o menor medida, y por tanto puede controlarse el  
10 grado en que absorberán exudados de heridas.

**[0032]** Las proteínas de queratina S-sulfonadas preparadas como spray o polvos liofilizados son materiales altamente absorbentes que constituyen un componente valioso en los apósitos para heridas, en especial para su uso en el apósito de tipo hidrogel en el que los alginatos o derivados de colágeno son los materiales utilizados  
15 frecuentemente en los productos disponibles actualmente. La combinación de las proteínas SIFP y SHSP lleva a un grado de control sobre la capacidad absorbente del polvo y la naturaleza del gel formado sobre la absorbancia, debido a la variación en la cantidad de grupos S-sulfo presente en cada fracción proteínica.

**[0033]** Debido a la naturaleza intacta de las proteínas y a la solubilidad en agua del  
20 material que surge por la presencia del grupo S-sulfonato polar, las fracciones proteínicas de queratina S-sulfonada, en especial la fracción proteínica de los filamentos intermedios de queratina, pueden formarse fácilmente en una variedad de matrices y las propiedades físicas de estas matrices son tales que pueden proporcionar un papel físico útil en el ambiente de una herida. Los materiales son  
25 tratados químicamente tras la reformación en películas, fibras o esponjas, para eliminar la funcionalidad S-sulfonato y generar enlaces disulfuro cruzados en el material, similares a aquellos presentes en la queratina nativa. Los métodos para este tratamiento se describen en NZ/PCT/00169. Cuando son tratadas de esta forma, las matrices de queratina son menos absorbentes y conservan su estructura en el  
30 ambiente de una herida. Están bien adaptadas para administrar los agentes bioactivos al lugar de la herida, como agentes antibacterianos, factores de crecimiento, tratamientos antibióticos, células cultivadas u otros fármacos.

**[0034]** Las propiedades físicas y mecánicas del apósito para heridas o membranas de curación pueden mejorarse fácilmente mediante una variedad de métodos. Un método  
35 implica el tratamiento con un reactivo de reducción como solución de tioglicolato de amonio a pH = 7,0 durante 1 hora para eliminar la funcionalidad sulfonato de la

queratina S-sulfonato e introducir disulfuros de la cistina como enlaces cruzados. Esto provoca una mejora significativa en las propiedades mecánicas, especialmente la resistencia a la humedad de los materiales de las membranas. La conversión química se confirma usando estudios de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), ya que el grupo S-sulfonado da lugar a una absorbanza fuerte y elevada en 1022 cm<sup>4</sup> cuya desaparición se observa con la exposición del S-sulfonado a los reactivos descritos.

**[0035]** Un método para la mejora de la resistencia física y mecánica de biomateriales de hidrogel de queratina consiste en aumentar la red de enlace de hidrógeno entre las cadenas proteínicas de queratina o la proteína de queratina y otros polímeros, como alcohol polivinílico y polivinilpirrolidona. Esto puede lograrse utilizando un proceso de congelación-descongelación durante la construcción de láminas de hidrogel. Esto se confirma por un aumento en la insolubilidad de hidrogeles formados mediante este proceso.

**[0036]** También se revela la producción de un biomaterial de hidrogel químicamente reticulado. La mejora de las propiedades físicas como la insolubilidad y resistencia en estados de inflamación se logra utilizando agentes reticulantes químicos como glutaraldehído, que permiten la formación de enlaces cruzados químicos entre las cadenas proteínicas de la queratina.

**[0037]** Además, las propiedades físicas de los hidrogeles y membranas basadas en queratina pueden aumentarse mediante métodos de enlace cruzado de proteínas convencional incluyendo el uso de agentes reticulantes químicos típicos como glutaraldehído, formaldehído, carbodiimidias, p.ej., 1-etil-3-(dimetiaminopropil)carbodiimida, 2,5-hexanodiona, diimidatos, dimetilsuberimidato o bisacrilamidas, p.ej., N,N-metilenbisacrilamida.

**Pruebas *in vitro***

**[0038]** La respuesta biológica para los materiales descritos arriba se ha determinado *in vitro* mediante el crecimiento de células relevantes en la curación de la herida y la respuesta inmunogénica, específicamente fibroblastos y linfocitos.

**Tabla 3:** Materiales de queratina analizados *in vitro*.

Material de queratina	Funcionalidad de cistina	Etiqueta
Esponja	S-sulfonato	A
Esponja	disulfuro	B
Película	S-sulfonato	C
Película	disulfuro	D
Polvo	S-sulfonato	E

**Fibroblastos ovinos:**

**[0039]** La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de diferentes matrices de queratina en la proliferación celular de fibroblastos dérmicos ovinos en relación con el medio celular solo (control). Se usaron muestras paralelas de  $n = 3$  para cada momento temporal.

**[0040]** La cinética de proliferación de fibroblastos ovinos en la mayoría de matrices de queratina es similar. Inicialmente, se siembran los pocillos con  $\sim 10,000$  células (0 horas). Durante las primeras 24 horas tras el sembrado, el cultivo experimenta un tiempo de demora como se pone de manifiesto por la disminución en el número de células. Este fenómeno ha sido reconocido en todos los ensayos llevados a cabo y la caída se observa en los pocillos de control además de aquellos que contienen los materiales de prueba. La experimentación de un periodo de tiempo más corto adicional ha demostrado que este tiempo de demora dura menos de 12h (datos no mostrados) y que la fase exponencial de crecimiento comienza en este punto. Las duplicaciones de la población se producen aproximadamente cada 24h-48h marcando la subconfluencia (confluencia del 80% aproximadamente) el final del crecimiento logarítmico. Esto corresponde al final del periodo experimental (5 días o 120h). Los experimentos de periodo extendido han indicado una meseta en el crecimiento celular poco después de esto con confluencia completa del cultivo. La inhibición del contacto y agotamiento de nutrientes juega un papel clave en la limitación de la velocidad de crecimiento en este punto y el cultivo monocapa presenta signos de muerte celular (es decir, pérdida de la integridad de la membrana, reducción del número de células, vacuolización de células individuales).

**[0041]** Dicha cinética es presentada por los fibroblastos ovinos en la mayoría de sustratos de biopolímeros, específicamente las películas y muestras de esponja.

**[0042]** Con respecto a los tipos de matrices individuales, se realizaron las siguientes observaciones:

**[0043]** Películas. Las películas con la configuración química de disulfuro apoyan el crecimiento de fibroblastos ovinos de un modo más satisfactorio (material D). Una segunda configuración de sal de S-sulfonato de sodio demostrada por el material de película C apoya el crecimiento celular en un grado más bajo y tiende a hincharse en el cultivo. Las células en estas películas mostraron una morfología fibroblástica alargada bipolar o multipolar típica con una buena distribución.

**[0044]** Esponja. El material de esponja porosa de crecimiento de fibroblasto B (configuración disulfuro) igualó el de algunas de las mejores películas. Durante el ensayo, se observó la unión de células a la superficie superior de la esponja. Mediante

microscopía de luz, se consideró que la apariencia morfológica de estas células era similar en todos los sustratos en comparación con el control sin matriz. Se observó mediante microscopía cómo las células infiltraban el material de esponja.

**[0045] Polvo.** Se estableció una serie de dilución de polvos de queratina y el resultado se encuentra presentado en el gráfico como material E. Este resultado representa la curva de crecimiento observado para la concentración de  $2\text{mgml}^{-1}$ . Las soluciones con concentraciones superiores a ésta resultaron en la misma curva, las inferiores demostraron un índice de proliferación celular ligeramente superior que el control. Las pruebas de extractos sugieren que el polvo de queratina puede ser mitogénico en sí mismo, en concentraciones suficientes, para los fibroblastos ovinos.

**Fibroblastos humanos:**

**[0046]** La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto de diferentes matrices de queratina en la proliferación celular de fibroblastos dérmicos humanos en relación con el medio celular solo (control).

**[0047]** Los datos fibroblásticos humanos para los sustratos de queratina correspondientes más o menos reflejaron lo observado con la línea celular ovina. De nuevo, se estableció una curva de crecimiento típica a lo largo de un periodo de 120h. Sin embargo, se alcanzó una confluencia del 100% en los pocillos de control al final de este periodo. A las 120h, los cultivos obtenidos en presencia de la mayoría de materiales de prueba oscilaban entre una confluencia de 83-89%.

**Linfocitos ovinos**

**[0048]** La Figura 4 muestra el efecto de estimulación con ConA en el células T cultivadas en presencia/ausencia de matrices de queratina durante un periodo de 10 días. Los recuentos de timidina tritiada se convirtieron en números de células por pocillo (frente a una serie de estándares) para cada uno de los grupos de tratamiento.

**[0049]** Los análisis resultantes sugieren:

1. Existe una diferencia marcada en los números de células durante el experimento de 240h entre los linfocitos T ovinos no activados y los estimulados con ConA. El número de células de control (cultivadas en ausencia de biopolímeros de queratina) muestra una diferencia de seis veces la cantidad entre las células estimuladas y no estimuladas a las 240h. Las células cultivadas en ausencia de conA alcanzaron concentraciones de 50000 células/pocillo el día 10, mientras que las células de control con complemento de ConA superaban las 300000 células/pocillo en el mismo momento. Dichas concentraciones altas se pudieron obtener puesto que las células se mantenían en cultivo de suspensión, por lo tanto el factor limitativo era el suministro de nutrientes reducido y no un

requisito de superficie.

2. Existía poca diferencia en los índices de proliferación celular entre los pocillos de muestra (presencia de matriz) y los de control (ausencia de matriz). Este efecto se observó tanto en células estimuladas como en células no estimuladas.

5 En otras palabras:

(a) Las células no estimuladas cultivadas en presencia de matrices proliferaron en el mismo grado que aquellas cultivadas puramente en pocillos de referencia de cultivo tisular. Esto indica que aunque los biomateriales de queratina no son no inmunogénicos, parecen ser antigénicamente inertes. Si fueran no inmunogénicos, se esperaría que los linfocitos expuestos al biomaterial no proliferaran. Si es inerte, los índices de proliferación celular imitarían aquellos del control como parece ser el caso.

(b) las células estimuladas cultivadas en presencia de matrices proliferaron a una velocidad similar o levemente superior a la de los pocillos de control (que no contenían matriz de queratina). Esto sugiere que las células T activadas no están siendo inhibidas de forma alguna por la propia matriz o cualquier subproducto de degradación que pueda producir durante este corto periodo. El fracaso en la inhibición de células T activas por los biomateriales probados demuestra que el producto no interfiere con la respuesta inmune normal mediada por las células.

**[0050]** La Figura 5 muestra el efecto de estimulación con ConA en los linfocitos T cultivados en presencia de una variedad de matrices a las 72h. Los recuentos totales reflejan el nivel de captación de timidina e incorporación en el ADN, que se utiliza después como una medida de proliferación (ver el gráfico anterior). El cultivo de 72h se considera la mejor medida de tiempo para la comparación entre tratamientos pues las células se encuentran dentro del crecimiento en fase exponencial.

**[0051]** Los resultados se presentan como un gráfico de barras verticales con los tratamientos estimulados y no estimulados uno al lado del otro. Las barras de error representan medias  $\pm$  desviación estándar para  $n = 3$ . Los recuentos de pocillos no estimulados (no etiquetados) muestran muy poca variación con pequeñas puntuaciones de error. Los recuentos totales para células estimuladas son ligeramente más variables aunque los análisis de la prueba T de Student indican que solo el material C es diferente de forma significativa ( $p = 0,075$ ) del control.

**[0052]** Las células T no tratadas muestran proliferación en el mismo grado en presencia o ausencia de las matrices. Esto demuestra que los biomateriales no son no inmunogénicos, sino inertes. Ninguna matriz probada estimuló la respuesta inmune

normal a un grado mayor que el control (ninguna serie de pocillos de matriz).

[0053] Las células T activadas mantenidas en cultivo con matrices de queratina proliferaron normalmente a una velocidad similar o superior en comparación con aquellas del control (sin presencia de matriz). Esto demuestra que los biomateriales son biocompatibles con células T estimuladas, mitogénicas hasta un grado y definitivamente no interfieren con la respuesta inmune normal. No se produjo inhibición de las células T activadas por ninguna matriz o sus subproductos.

[0054] En resumen, las matrices probadas no interfieren con la respuesta inmune celular del cuerpo y son biocompatibles con la línea celular de linfocitos T ovina.

#### 10 **Pruebas *in vivo***

[0055] El efecto de las matrices de queratina en el ambiente de una herida se determinó utilizando un modelo animal.

[0056] Se realizó un ensayo aleatorio aplicando 4 muestras a grupos de ratas con heridas por escisión. Había 6 ratas macho por grupo. Se establecieron dos heridas (8 mm de diámetro) en la espalda de cada rata a lo largo de la línea media. Una herida sirvió como el control con el vehículo o se aplicó solución salina y se aplicó el material de prueba a la otra herida. Se monitorizó la velocidad de curación mediante fotografías normales. Se fotografiaron las heridas cada dos días y se cuantificó el área de las heridas en curación. El cambio de porcentaje (%) para cada herida se determinó en cada momento temporal y se determinó la velocidad relativa de curación de la herida experimental frente a la de control en cada rata. Se calculó después la diferencia media en cada momento y se detalla en la table 4.

[0057] Los apósitos estudiados fueron: **KP-U**: Apósito para heridas de membrana de queratina (ejemplo 1), **KP-T**: apósito para heridas de membrana de queratina (ejemplo 3), **HG-GL**: hidrogel de queratina (ejemplo 4), **HG-O**: hidrogel de queratina (ejemplo 2), **HG-C** producto de apósitos para heridas en hidrogel disponible en el mercado.

[0058] Se usaron veinticuatro ratos en el ensayo y se llevaron a cabo estudios de ensayo hasta el punto terminal de curación.

[0059] Los resultados basados en la velocidad de curación de heridas pueden resumirse de la siguiente forma:

(i) el material de apósito para heridas **HG-GL** acelera de forma significativa la curación, produciéndose la diferencia más marcada en las etapas tempranas de curación.

(ii) el material de apósito para heridas **KP-T** mostró cierta mejora en la velocidad de curación, especialmente durante los primeros 3 a 5 días.

**Tabla 4:** Área ocupada por el sitio de la herida tras la administración de diversos apósitos para heridas. **KP-U:** Apósito para heridas de membrana de queratina (ejemplo 1), **KP-T:** Apósito para heridas de membrana de queratina (ejemplo 3). **HG-GL:** hidrogel de queratina (ejemplo 4), **HG-O:** hidrogel de queratina (ejemplo 2), **HG-C** producto de apósito para heridas en hidrogel disponible en el mercado.

5

Días tras la herida	Área de la herida, % del original						
	Administración	KP-U	KP-T	HG-O	HG-GL	HG-C	Blanco
1		100	100	100	100	100	100
3		102	90	97	77	97	93
5		94	90	81	70	90	84
9		64	69	-	-	-	-
11		39	33	35	24	40	36
13		28	24	23	13	25	23
15		15	11	19	9	13	18
17		18	11	14	5	6	12
19		5	3	8	2	2	6

10

15

## Ejemplos

20

**[0060]** Los métodos para la preparación de diversas formas de queratina se describirán ahora a modo de ejemplo.

### **Ejemplo 1:** PRODUCCIÓN DE MEMBRANAS DE QUERATINA PARA SU USO EN UN PRODUCTO PARA EL CUIDADO DE HERIDAS

25

**[0061]** Se preparó una solución de proteína de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada al 10% (SIFP) utilizando polvo de proteína de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada disueltos en agua destilada con una adición gradual de 1M NaOH durante 2 horas en agitación mecánica. El pH se mantuvo en el intervalo de 8,0-9,5 y finalmente se ajustó a 8,5. La solución de proteína de queratina se centrifugó a 27000 g durante 10 min para eliminar cualquier burbuja de aire y material no disuelto. La solución de proteína de queratina resultante fue incorporada a una placa de Petri y los solventes se evaporaron en condiciones ambientales para dejar una membrana de queratina. El solvente también puede incluir cierto porcentaje de solvente miscible acuoso con base orgánica, como un alcohol.

35



**Ejemplo 2: PRODUCCIÓN DE UN HIDROGEL DE QUERATINA PARA SU USO EN PRODUCTOS PARA EL CUIDADO DE HERIDAS**

**[0062]** Se preparó una solución de proteína de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada (SIFP) al 10% como se describe en el **Ejemplo 1**. Después, se mezcló íntimamente la solución con polímeros solubles en agua, como alcohol polivinílico (PVA) comprendiendo un contenido sólido del 20% y polivinilpirrolidona (PVP) comprendiendo un contenido sólido del 10% para lograr una reología óptima y una composición óptima, es decir, SIFP: PVA: PVP = 100: 60: 40 (p/p, %) para crear el hidrogel. La solución combinada se moldeó y se endureció mediante un ciclo de congelación/descongelación para producir un hidrogel basado en queratina. Esto implica congelar el material a -80°C durante 1 h y descongelarlo a 23°C durante 1 hora. Se repitió este ciclo de congelación/descongelación hasta 7 veces para obtener el hidrogel. Se lavó el hidrogel resultante con agua destilada múltiples veces para eliminar cualquier resto de polímeros y queratina sin reaccionar.

15

**Ejemplo 3: PRODUCCIÓN DE MEMBRANAS DE QUERATINA CON ENLACE CRUZADO PARA SU USO EN UN PRODUCTO PARA EL CUIDADO DE HERIDAS**

**[0063]** Para mejorar la resistencia física y también las propiedades mecánicas de materiales producidos como se ha descrito en el **Ejemplo 1**, las membranas se trataron con agentes reductores para inducir el enlace cruzado químico. Se utilizó la inmersión de las membranas en una solución de 0,25 M tioglicolato de amonio ajustado a pH 7,0 durante 60 minutos para eliminar el grupo sulfonato de la proteína de queratina S-sulfonada (SIFP), y permitir la formación de enlaces disulfuro (-S-S-). Las membranas resultantes se lavaron múltiples veces con agua destilada para eliminar cualquier reactivo residual.

25

**Ejemplo 4: PRODUCCIÓN DE HIDROGEL DE QUERATINA CON ENLACE CRUZADO QUÍMICO PARA SU USO EN UN PRODUCTO PARA EL CUIDADO DE HERIDAS**

**[0064]** Tras la preparación de la solución de PVA, PVP, queratina como se ha descrito en el **ejemplo 2**, se añadió de un 0,05% a un 0,1% de agente reticulante de glutaraldehído en la solución mezclada. La solución combinada se moldeó y se endureció mediante un ciclo de congelación/descongelación para producir un hidrogel basado en queratina. Esto implicó congelar el material a -80°C durante 1 h y descongelarlo a 23°C durante 1 hora. Se repitió este ciclo de congelación/descongelación hasta 7 veces para obtener el hidrogel. El hidrogel

35

resultante se lavó con agua destilada múltiples veces para eliminar cualquier polímero y queratina sin reaccionar, así como residuos de glutaraldehído sin reaccionar. La observación física mostró una mejora significativa de su estabilidad dimensional o resistencia. Estas características se confirmaron también mediante el comportamiento de insolubilidad de hidrogeles en solvente acuoso, tras haberse fabricado como una proteína de queratina de mezcla íntima y polímeros de un solvente acuoso (es decir, agua).

**Ejemplo 5:** PRODUCCIÓN DE MEMBRANA DE QUERATINA CON ENLACE CRUZADO DISULFURO PARA SU USO EN UN PRODUCTO PARA EL CUIDADO DE HERIDAS

**[0065]** Se preparó una solución de proteína de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada (SIFP) al 10% como se describe en el **Ejemplo 1**. Después, se mezcló la solución íntimamente con 1% de 0,25 M de solución de tioglicolato de amonio ( $\text{NH}_4\text{TG}$ ), donde las composiciones son: SIFP:  $\text{NH}_4\text{TG}$  = 99 : 1 (p/p, %). La solución mezclada se moldeó después en una placa de Petri y se evaporaron los solventes en condiciones ambientales para crear una membrana de queratina de enlace cruzado disulfuro. La membrana resultante se lavó con agua destilada múltiples veces para eliminar cualquier  $\text{NH}_4\text{TG}$  residual.

**Ejemplo 6:** PRODUCCIÓN DE HIDROGEL DE QUERATINA CON ENLACE CRUZADO DISULFURO PARA SU USO EN UN PRODUCTO PARA EL CUIDADO DE HERIDAS

**[0066]** Se preparó una solución de proteína de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada (SIFP) al 10% como se describe en el **Ejemplo 1**. Después, se mezcló la solución íntimamente con 1% de 0,25 M de solución de tioglicolato de amonio ( $\text{NH}_4\text{TG}$ ), donde las composiciones son: SIFP:  $\text{NH}_4\text{TG}$  = 99 : 1 (p/p, %). Después, se moldeó la solución mezclada y se endureció mediante un ciclo de congelación/descongelación para producir un hidrogel de queratina de enlace cruzado disulfuro. Esto implicó congelar el material a  $-80^\circ\text{C}$  durante 1 h y descongelarlo a  $23^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Se repitió este ciclo de congelación/descongelación hasta 7 veces para obtener el hidrogel de enlace cruzado químico.

**Ejemplo 7:** PRODUCCIÓN DE HIDROGEL DE QUERATINA SIN ENLACE CRUZADO PARA SU USO EN UN PRODUCTO PARA EL CUIDADO DE HERIDAS

[0067] Se preparó una solución de proteína de los filamentos intermedios de queratina S-sulfonada (SIFP) al 10% como se describe en el **Ejemplo 1**. La solución combinada se moldeó y se endureció mediante un ciclo de congelación/descongelación para producir un hidrogel basado en queratina. Esto implica congelar el material a -80°C durante 1 hora y descongelar a 23°C durante una hora. Se repitió este ciclo de congelación/descongelación hasta 7 veces para obtener el hidrogel de proteína de queratina.

**Aplicabilidad industrial**

[0068] La invención será útil en una amplia gama de productos para el cuidado de heridas. Dichos productos ayudarán en la curación y velocidad de curación de las heridas proporcionando un ambiente bioquímico alrededor del lugar de la herida que induce la curación.

15

20

25

30

35

## Reivindicaciones

1. Un material para su uso en el vendaje de heridas, que comprende un fracción proteínica de queratina S-sulfonada intacta fabricada en forma de una película, una  
5 fibra, una espuma o un hidrogel, y que ha sido tratado químicamente para eliminar la funcionalidad S-sulfonato y generar enlaces disulfuro, el término "intacto" indica proteínas que no han sido hidrolizadas de forma significativa y que son equivalentes a las proteínas de queratina en su forma nativa sin enlaces disulfuro cruzados formados durante el proceso de queratinización.
- 10
2. Un material según la reivindicación 1 para su uso en el vendaje de heridas, donde la fracción proteínica de queratina intacta es una fracción de la familia de proteínas de los filamentos intermedios.
- 15
3. Un material según la reivindicación 1 para su uso en el vendaje de heridas, donde la fracción proteínica de queratina intacta es una fracción de la familia de proteínas con alto contenido en azufre.
- 20
4. Un material según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el vendaje de heridas, que se encuentra en forma de un hidrogel.
5. Un material según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en el vendaje de heridas, que comprende proteína de queratina intacta reticulada químicamente con glutaraldehído.

Figura 1

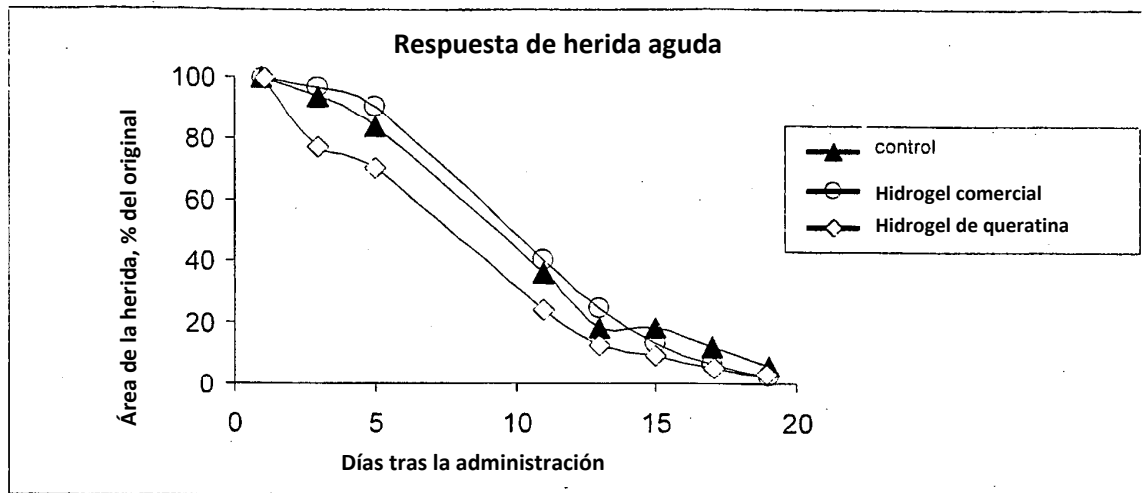


Figura 2

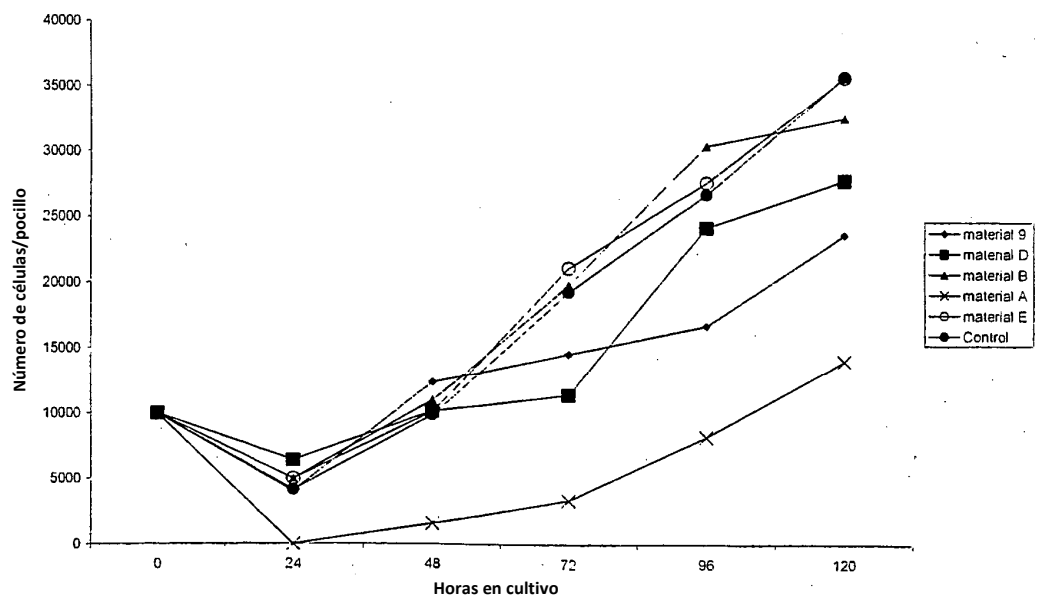


Figura 3

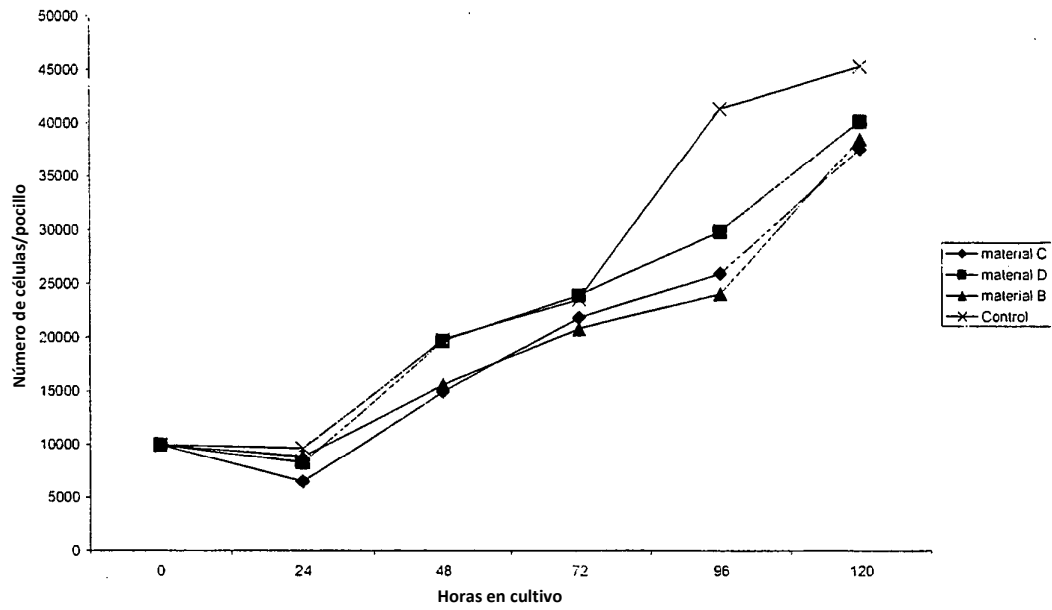


Figura 4

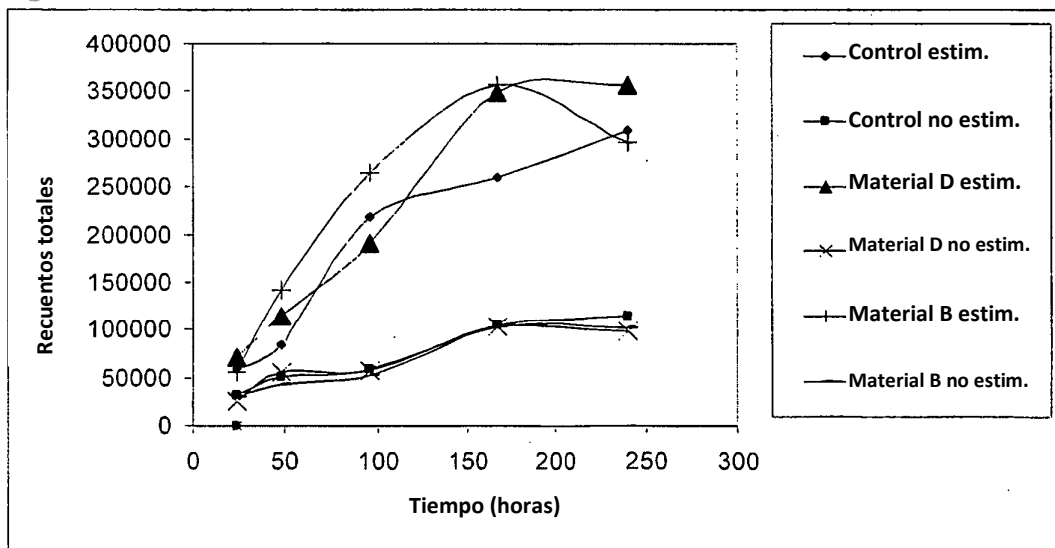


Figura 5

