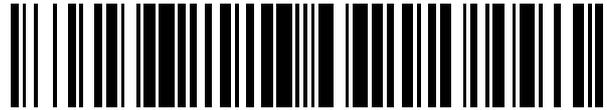


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 460 926**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2003 E 03718328 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1495048**

54 Título: **Redes de proteína heterogéneas reticuladas con enlaces que contienen silicona, y procedimientos de producción de las mismas**

30 Prioridad:

10.04.2002 US 119477
22.04.2002 US 127523
26.04.2002 US 133885
05.07.2002 US 393958 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.05.2014

73 Titular/es:

KERAPLAST TECHNOLOGIES LTD. (100.0%)
19206 HUEBNER ROAD, SUITE 102
SAN ANTONIO, TX 78258, US

72 Inventor/es:

VAN DYKE, MARK E.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 460 926 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

Redes de proteína heterogéneas reticuladas con enlaces que contienen silicón, y procedimientos de producción de las mismas

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud reivindica la fecha de prioridad de la siguiente solicitud: la solicitud de patente de los Estados Unidos con N° de serie 10/133.885, presentada el 26 de abril de 2002. Son solicitudes relacionadas, para las que se reivindica la prioridad según se requiera, la solicitud de patente de los Estados Unidos con N° de serie 10/127.523, presentada el 22 de abril de 2002, la solicitud de patente de los Estados Unidos con N° de serie 10/119.477, presentada el 10 de abril de 2002; y la solicitud provisional de los Estados Unidos con N° 60/393.958, presentada el 10
10 5 de julio de 2002. Una solicitud relacionada es la solicitud con N° de serie 10/254.364, presentada el 25 de septiembre de 2002, que reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos con N° 60/324.709.

Campo de la invención

15 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan solo para fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

La presente descripción se dirige a procedimientos para producir redes proteínicas heterogéneas biocompatibles reticuladas con un agente de reticulación heterogéneo que no sea glutaraldehído, preferentemente un agente de reticulación a base de silicón. Las α -queratinas, o queratinas de elevado peso molecular (HMWK, *high molecular weight keratin*), son unas proteínas preferidas para su uso en la formación de las redes. El agente de reticulación
20 preferentemente reacciona con grupos colgantes reactivos que existen en las moléculas de queratina y, o bien no producen producto secundario alguno, o bien producen productos secundarios biocompatibles, tal como hidrógeno, agua y dióxido de carbono, o bien producen productos secundarios que pueden retirarse de la red.

Antecedentes de la invención

25 Las proteínas, tal como las proteínas de queratina, son beneficiosas en la curación de tejidos epiteliales dañados. Desafortunadamente, las propiedades químicas y técnicas de las proteínas de queratina han estado relativamente limitadas a las conseguidas usando químicas oxidativas y reductivas, y reticulaciones de proteína de cadena lateral. Existe una necesidad de proteínas, y de procedimientos para reticular proteínas, preferentemente α -queratinas, para formar películas que tengan una amplia gama de propiedades químicas y técnicas de tal modo que puedan ampliarse las aplicaciones potenciales de materiales a base de proteína.

30 Los documentos EP-A-0 540 357 y US-A-5 300 285 divulgan el uso de copolímeros de proteína-silicón en el cuidado del pelo de una persona. El fin del revestimiento para pelo en el documento EP-A-0 540 357 es añadir brillo y textura al pelo y el documento US-A-5 300 285 describe una forma de volver a formar puentes disulfuro en el pelo de una persona con unas condiciones menos severas. Ninguno de los documentos EP-A-0 540 357 y US-A-5 300 285, ni solos ni uno en combinación otro, divulga o sugiere la producción y el uso previsto de la película proteínica tal
35 como se define en las reivindicaciones, en particular "cicatrización" que es completamente diferente del uso en los documentos EP-A-0 540 357 y US-A-5 300 285.

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan solo para fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

Sumario de la invención

40 Se proporciona un procedimiento para fabricar una red de queratina entrelazada mediante un agente de reticulación a base de silicón, comprendiendo dicho procedimiento exponer una pluralidad de moléculas de α -queratina que comprenden grupos colgantes reactivos a un agente de reticulación a base de silicón multifuncional en unas condiciones efectivas para formar reticulaciones de interproteína covalentes entre primeras funcionalidades reactivas
45 en dicho agente de reticulación y primeros grupos colgantes reactivos en un primer grupo de dichas moléculas de α -queratina, siendo efectivas dichas condiciones también para formar reticulaciones de interproteína covalentes entre segundas funcionalidades reactivas en dicho agente de reticulación y segundos grupos colgantes reactivos en un segundo grupo de moléculas de α -queratina.

50 También se proporcionan redes que comprenden material proteínico que consiste esencialmente en las moléculas de α -queratina que comprenden reticulaciones de interproteína que comprenden primeros enlaces covalentes entre primeras funcionalidades reactivas en una pluralidad de moléculas de un agente de reticulación a base de silicón y primeros grupos colgantes reactivos en una pluralidad de primeras moléculas de α -queratina y segundos enlaces covalentes entre segundas funcionalidades reactivas en una pluralidad de moléculas de dicho agente de reticulación a base de silicón y segundos grupos colgantes reactivos en una pluralidad de segundas moléculas de α -queratina.

Descripción detallada de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan solo para fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

- 5 La presente descripción se dirige hacia procedimientos para reticular proteínas, preferentemente usando agentes de reticulación heterogéneos que no sean glutaraldehído para formar películas o redes proteínicas heterogéneas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “heterogéneo” hace referencia a una película o red proteínica, que comprende preferentemente moléculas de proteína que tienen un peso molecular relativamente elevado de al menos aproximadamente 50 kDa, preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 85 kDa, o derivados de las mismas. Las moléculas de proteína están entrelazadas por un material de reticulación a base de silicona.

- 10 Los procedimientos que se describen en el presente documento pueden usarse para tratar una amplia diversidad de proteínas para formar estructuras de red, preferentemente películas elastoméricas. Los ejemplos de proteínas de origen natural adecuadas incluyen, pero no se limitan necesariamente a, queratina, colágeno y elastina. Las proteínas pueden ser naturales, sintéticas o recombinantes. Las proteínas preferidas tienen un contenido de cisteína relativamente elevado. Las proteínas lo más preferidas son proteínas de queratina, incluso más preferentemente proteínas de α -queratina, también denominadas a veces queratinas de elevado peso molecular (HMWK).

- 15 Una fuente preferida de proteínas de queratina es el pelo o pelaje. El pelo puede ser animal o humano. Las queratinas se definen, de manera imprecisa, como las proteínas endurecidas e insolubilizadas que se hallan en las células epidérmicas de los vertebrados. El pelo humano está compuesto casi completamente de queratinas.

- 20 El pelo humano tiene una cutícula, que es una capa externa tubular resistente constituida por células aplanadas dispuestas en un patrón de solapamiento escamoso. El volumen interno del pelo se denomina el córtex y se construye a partir de células alargadas que están densamente apretadas con queratinas fibrosas. Las queratinas fibrosas están dispuestas en haces a los que se hace referencia como microfibrillas y poseen una estructura terciaria α -helicoidal. Las microfibrillas están unidas entre sí con una matriz de queratina amorfa.

- 25 La matriz de queratina amorfa y las microfibrillas varían en función y composición. La matriz es la “cola” que mantiene juntas las microfibrillas. Esta “cola” de matriz tiene un contenido de azufre elevado, y está compuesta por queratinas de bajo peso molecular (LMWK) que habitualmente tienen un peso molecular promedio de de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 kDa. Las microfibrillas están compuestas por queratinas de elevado peso molecular (HMWK) que tienen un contenido de azufre relativamente más bajo, pero que tienen un peso molecular promedio más elevado de habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 85 kDa. Las HMWK y las LMWK varían en propiedades químicas, tal como la reactividad y la solubilidad.

- 30 La presencia de reticulaciones de disulfuro que forman una red tridimensional de cadenas de polipéptido proporciona, en gran parte, su integridad estructural a las queratinas. Esta estructura de red vuelve las queratinas insolubles. Las queratinas pueden hacerse, no obstante, solubles en agua mediante la destrucción de esta estructura tridimensional a través de escisión de enlace de disulfuro. La escisión de enlace de disulfuro puede realizarse o bien de forma oxidativa, o bien de forma reductiva o bien usando alguna combinación de ambos tipos de escisión de enlace. La escisión de enlace oxidativa con peróxido de hidrógeno, por ejemplo, da como resultado la formación de residuos ácido sulfónico producidos a partir de cistina. El material producido usando peróxido de hidrógeno para la escisión de enlace de disulfuro es sumamente iónico y tiene una excelente solubilidad en agua. La escisión de enlace reductiva con mercaptoetanol, por ejemplo, da como resultado la formación de residuos cisteína producidos a partir de cistina. El material producido usando esta técnica reductiva es sumamente reactivo y volverá a reticularse fácilmente.

Escisión de enlace de disulfuro y extracción de queratina

- 35 Las proteínas, preferentemente α -queratinas, pueden procesarse y/o aislarse de cualquier forma que vuelva las mismas lo bastante solubles en los medios de reacción para que tengan lugar una reacción o reacciones de reticulación. Un número de las reacciones que se describen a continuación requieren un disolvente anhidro. Los expertos en la materia reconocerán que los disolventes anhidros incluyen un gran número de disolventes, incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, 1,2-dimetoxietano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido (DMSO), N-metil pirrolidona, y otros. En general, las reacciones requieren la presencia de al menos algo de agua.

Oxidación/Reducción de Residuos Cistina

- 40 Las queratinas pueden usarse como un material fuente (por ejemplo, pelo humano), y el pelo puede oxidarse mediante un agente oxidante adecuado. Los agentes oxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, percarbonatos, persulfatos, dióxido de cloro, peróxido de sodio y de calcio, perboratos e hipoclorito. Los oxidantes se usan a una concentración de hasta aproximadamente un 35 %, preferentemente a de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %. La oxidación preferentemente tiene lugar a temperaturas de reflujo.

En una realización preferida, el pelo se trata con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), a de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 10 %, lo más preferentemente un 1 %, con el fin de alterar la cutícula e hinchar el material fuente de queratina. Este proceso también convierte una cierta fracción de los residuos cistina en grupos ácido sulfónico. La cantidad de oxidación puede controlarse haciendo que varíe el tiempo de oxidación, preferentemente de aproximadamente 0 horas a aproximadamente 4 horas, a la vez que se retienen las otras condiciones de la constante de reacción de oxidación. Estas condiciones incluyen la concentración y el tipo de oxidante, la temperatura y la relación de los medios de extracción con respecto al material fuente de queratina. Después de que la reacción se haya completado, el pelo oxidado se filtra y se lava, preferentemente con agua desionizada. El filtrado se desecha y se deja secar el pelo.

10 Cuando se mantienen constantes otras condiciones de oxidación, la tasa de conversión de cistina en residuos ácido sulfónico es aproximadamente proporcional a la cantidad de tiempo que se usa para la oxidación. Las cistinas residuales en los sólidos de queratina oxidada resultantes se convierten en otros restos que contienen azufre usando técnicas reductoras. Preferentemente, el grupo cistina con puentes disulfuro se convierte en un grupo tiol, que tiene utilidad por sí mismo, o puede modificarse usando una diversidad de técnicas químicas.

15 Reacción con un agente reductor

Si está oxidado, el pelo oxidado se trata preferentemente con un agente reductor. El tratamiento de proteínas de queratina oxidadas con agentes reductores facilita la formación de cisteína a partir de cistina, pero tiende a dejar los grupos previamente oxidados sin alteración. Los agentes reductores adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, ácido tioglicólico y sales del mismo, mercaptoetanol, ditiotreitól, tioglicerol, ácido tioláctico, glutatión, cisteína, sulfuro de sodio y sulfhidrato de sodio. Los agentes reductores preferidos son ácido tioglicólico y mercaptoetanol, lo más preferentemente ácido tioglicólico.

Con el fin de tratar el pelo oxidado con el agente reductor, el pelo previamente oxidado se suspende en el agente reductor habitualmente a una concentración de hasta aproximadamente 10 N, preferentemente de aproximadamente 0,1 N y 1 N; a un pH mayor que aproximadamente 7, preferentemente igual a o mayor que 9, lo más preferentemente 9; una temperatura de de aproximadamente 25 a aproximadamente 80 °C, preferentemente de aproximadamente 60 °C, preferentemente durante un periodo de tiempo de de aproximadamente 1 a aproximadamente 72, lo más preferentemente de aproximadamente 24 horas. La reacción tiene lugar bajo una atmósfera inerte, preferentemente nitrógeno. La fracción líquida se separa de cualesquiera sólidos restantes usando medios conocidos, incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, filtración, o canulación y / o centrifugación, preferentemente bajo una atmósfera inerte. Un procedimiento preferido de separación es la filtración. Una vez que se han retirado los sólidos, las proteínas de queratina solubles se aíslan de la solución mediante la adición de un no disolvente miscible en agua, o mediante secado por pulverización. Los no disolventes miscibles en agua incluyen, pero no se limitan necesariamente a, etanol, metanol, alcohol isopropílico, tetrahidrofurano, acetona, dioxano y similares, de nuevo bajo una atmósfera inerte. Un no disolvente preferido es el etanol. El precipitado se separa del no disolvente usando medios conocidos, preferentemente por filtración y enjuagado usando alícuotas adicionales del no disolvente. Las proteínas de queratina resultantes se secan usando técnicas conocidas, preferentemente durante una noche a vacío a temperatura ambiente. Este proceso da como resultado que las queratinas tengan tanto grupos ácido sulfónico como grupos tiol.

Los tioles poseen unas reactividades similares a los alcoholes, y pueden usarse para realizar una multitud de reacciones químicas conocidas, tal como las que se describen por McMurry, J., *Organic Chemistry*, Brooks / Cole Publishing Co., Monterey, CA (1984); Scudder, P. H., *Electron Flow in Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1992); Stowell, J. C., *Intermediate Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1994). La relación del ácido sulfónico con respecto al tiol se controla principalmente por la cantidad de sitios reactivos primarios que sigan existiendo después de la oxidación. Por supuesto, la tasa de reducción también se verá afectada por la concentración o concentraciones de reactivos, la temperatura o temperaturas de reacción y el tiempo o tiempos de exposición.

Extracción reductiva/reductiva

También se conocen químicas reductoras para la escisión de enlace de disulfuro en las queratinas: véase Wardell, J. L., "Preparation of Thiols" en *The Chemistry of the Thiol Group*, Patai, S. (Editor), páginas 163-353, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1974). Las HMWK pueden extraerse a partir de pelo usando al menos dos extracciones reductoras, según se describe en Crewther, W. G., Fraser, R. D. B., Lennox, F. G., y Lindley, H., "The Chemistry of Keratins" en *Advances in Protein Chemistry*, Anfinsen, C. B., Jr., Anson, M. L., Edsall, J. T. y Richards, F. M. (Editores), Academic Press, Nueva York, páginas 191-346 (1965).

Los agentes reductores adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, ácido tioglicólico y sales del mismo, mercaptoetanol, ditiotreitól, tioglicerol, ácido tioláctico, glutatión, cisteína, sulfuro de sodio y sulfhidrato de sodio. Los agentes reductores preferidos son ácido tioglicólico y mercaptoetanol, lo más preferentemente ácido tioglicólico.

Con el fin de reducir y extraer de manera selectiva las proteínas deseadas, el pelo (o otra fuente de proteína) se suspende en un agente reductor a una concentración de de aproximadamente 0,1 N a aproximadamente 10 N, preferentemente de aproximadamente 1,0 N. Un suave hinchamiento de fibras de pelo se consigue a un pH de aproximadamente 9 o más, preferentemente a un pH de de aproximadamente 9 a aproximadamente 10,5. Por lo tanto, la reducción inicial tiene lugar a una temperatura ambiente de de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 °C, preferentemente a aproximadamente 25 °C. El periodo de tiempo requerido para lograr la primera reducción es de aproximadamente 4 a aproximadamente 24 horas, lo más preferentemente de aproximadamente 12 horas. La reacción tiene lugar bajo una atmósfera inerte, preferentemente nitrógeno. La fracción líquida se separa de los sólidos restantes usando medios conocidos, incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, filtración, canulación, y / o centrifugación, preferentemente bajo una atmósfera inerte. Un procedimiento preferido de separación es la filtración.

Una segunda extracción se realiza sobre los sólidos reducidos usando un agente de hinchamiento adecuado, preferentemente urea, bases tal como hidróxido de amonio, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. Un agente de hinchamiento lo más preferido para esta segunda extracción es urea concentrada. La segunda extracción retira de manera efectiva las α -queratinas fibrosas reducidas del interior de la cutícula. La segunda extracción tiene lugar en urea de aproximadamente 1 M a aproximadamente 10 M, preferentemente urea de aproximadamente 7 M, durante un periodo de al menos aproximadamente 1 hora, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 72 horas, lo más preferentemente de aproximadamente 24 horas. La segunda extracción tiene lugar a temperatura ambiente, pero puede tener lugar a unas temperaturas de de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 100 °C, preferentemente de aproximadamente 25 °C. La fracción líquida se separa de la cutícula intacta y vacía, usando medios conocidos. Los medios adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, filtración, canulación y / o centrifugación, preferentemente bajo una atmósfera inerte. Un procedimiento preferido de separación es la filtración.

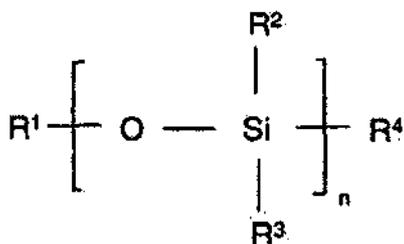
Una vez que se ha retirado la cutícula, las proteínas de queratina extraídas pueden retenerse en solución para su uso adicional, o estas pueden aislarse de la solución mediante la adición a un no disolvente miscible en agua, o mediante secado por pulverización. Los no disolventes miscibles en agua incluyen, pero no se limitan necesariamente a, etanol, metanol, alcohol isopropílico, tetrahidrofurano, acetona, dioxano y similares, de nuevo bajo una atmósfera inerte. Un no disolvente preferido es el etanol. El precipitado se separa del no disolvente usando medios conocidos, preferentemente por filtración y enjuagado usando alicoutas adicionales del no disolvente. Las proteínas precipitadas se secan usando técnicas conocidas, preferentemente durante una noche a vacío a temperatura ambiente. Las proteínas de queratina secas se muelen hasta dar un polvo, al que a veces se hace referencia como "polvo de HMWK".

Agentes de reticulación a base de silicona

En una realización lo más preferida, el agente de reticulación es un material a base de silicona multifuncional. Las siliconas son una familia de materiales biocompatibles que se han usado en una miríada de aplicaciones médicas. El revestimiento de gel de silicona, una forma de polímero de silicona ligeramente reticulado, promueve la cicatrización y disminuye el grado de formación de cicatriz hipertrófica. La tecnología de la química de la silicona es variada y útil, en particular con respecto a la formación de elastómero, debido a que se han desarrollado muchas modalidades de reticulación. Thomas, D. R., "Cross-linking of Polydimethylsiloxanes"; en Siloxane Polymers, Clarson, S. J. y Semlyen, J. A. (Editores), PTR Prentice Hall, New Jersey, páginas 567-615 (1993). Muchas de estas químicas de reticulación pueden adaptarse para su uso en otros sistemas de tal modo que se han producido redes interpenetrantes y de copolímero que comprenden al menos algo de silicona. Los atributos de cicatrización beneficiosos de los biomateriales de silicona, combinados con su química flexible, los hacen candidatos ideales para reticular biomateriales a base de queratina.

Las siliconas son bioinertes y resilientes en los sistemas biológicos. Un agente de reticulación bioinerte tiene la ventaja de mantener el sigilo biológico del sistema del cual este es una parte. La combinación de queratinas con agentes de reticulación a base de silicona combina la eficacia de cicatrización de ambos biomateriales sin comprometer la biocompatibilidad inherente de las queratinas.

Son agentes de reticulación de silicona, o polisiloxanos, adecuados, las moléculas que tienen uniones de Si-O recurrentes:



en las que n es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, y R¹, R², R³ y R⁴ pueden ser una gran diversidad de grupos, en los que al menos dos de R¹, R², R³ y R⁴ comprenden una "funcionalidad reactiva", que se define como

una funcionalidad que es reactiva hacia grupos colgantes reactivos en las moléculas de proteína que van a entrelazarse. Las funcionalidades reactivas adecuadas comprenden uno o más restos reactivos seleccionados de entre el grupo que consiste en enlaces carbono-carbono insaturados reactivos, oxígenos reactivos, nitrógenos reactivos, azufres reactivos y halógenos reactivos. Las funcionalidades reactivas preferidas incluyen, pero no se limitan necesariamente a, enlaces carbono-carbono insaturados reactivos, grupos hidrido, grupos hidroxilo, grupos alquilamina, grupos alquilmercapto, grupos alcoxi, grupos trifluoroalquilo, en los que el resto alquilo comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Un trifluoroalquilo preferido es un grupo trifluoropropilo; un grupo alcoxi preferido es un grupo epoxi, y un enlace carbono-carbono insaturado preferido es un grupo vinilo.

Los ejemplos de grupos R^1 , R^2 , R^3 y R^4 adecuados, algunos de los cuales son funcionalidades reactivas y algunos de los cuales no lo son, incluyen, pero no se limitan necesariamente a, hidrógeno; grupos heteroalquilo y alquilo cíclicos, lineales y ramificados que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, comprendiendo dichos grupos tanto grupos no sustituidos como grupos sustituidos con al menos una funcionalidad reactiva, en los que dichos grupos heteroalquilo comprenden uno o más heteroátomos seleccionados de entre el grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre; grupos heteroalqueno y alqueno cíclicos, lineales y ramificados que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y versiones funcionalizadas con mercapto de los mismos e híbridos de resonancia de los mismos, comprendiendo dichos grupos tanto grupos no sustituidos como grupos sustituidos con al menos una funcionalidad reactiva; grupos carboxilo y sales, ésteres y amidas de los mismos que comprenden grupos alquilo cíclicos, lineales y ramificados, grupos heteroalquilo, grupos alqueno y grupos heteroalqueno que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono en los que dichos grupos hetero comprenden uno o más heteroátomos seleccionados de entre el grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre; grupos aromáticos; alcanoles y alquenoles que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono; alcanolamidas y alqueno amidas que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono; y combinaciones de los mismos; grupos alcoxi (a los que a veces se hace referencia en el presente documento como "alquil éteres") que comprenden uno o más restos alquilo que tienen un total de de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, grupos hidrido y grupos hidroxilo. Los grupos heteroalquilo preferidos incluyen, pero no se limitan necesariamente a, grupos acetoxi, grupos silano que comprenden opcionalmente uno o más sustituyentes alquilo que tienen un total de de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y combinaciones de los mismos. Los grupos alcoxi preferidos incluyen, pero no se limitan necesariamente a, grupos epoxi.

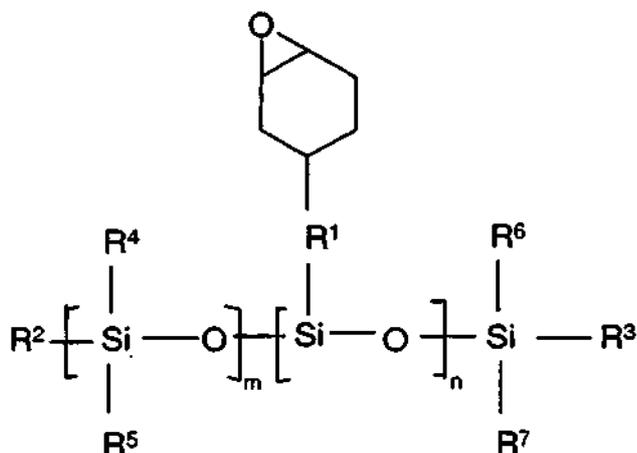
Preferentemente, R^1 y R^4 son restos que comprenden funcionalidades reactivas que están adaptadas para reaccionar con grupos funcionales complementarios en las moléculas de proteína que van a entrelazarse, preferentemente moléculas de α -queratina. En una realización preferida, R^1 y R^4 están seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo lineales, ramificados o cíclicos que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, grupos alqueno que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono, grupos hidrido, grupos alcoxi que comprenden uno o más grupos alquilo que tienen un total de de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, grupos hidroxilo, grupos alquilamina, grupos alquilmercapto, grupos acrilato, grupos metacrilato, grupos halo, grupos acetoxi y grupos epoxi. En una realización más preferida, tanto R^1 como R^4 comprenden un resto seleccionado de entre el grupo que consiste en grupos vinilo y grupos epoxi. Lo más preferentemente, R^1 y R^4 comprenden el mismo resto seleccionado de entre el grupo que consiste en grupos vinilo y grupos epoxi; y

En una realización preferida, R^2 y R^3 están seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en hidrógeno, grupos cicloalquilo, grupos vinilo, grupos hidrido, grupos trifluoroalquilo, grupos fenilo, grupos alquilo, grupos alcoxi, grupos alquilmercapto y grupos alquilamina; con la condición de que, cuando uno de R^2 o R^3 es un grupo vinilo, el otro de R^2 o R^3 es un grupo que no sea un grupo hidrido; y, cuando uno de R^2 o R^3 es un grupo hidrido, el otro de R^2 o R^3 es un grupo que no sea un grupo vinilo. En una realización incluso más preferida, R^2 y R^3 son preferentemente grupos relativamente inertes. Lo más preferentemente, al menos uno de R^2 y R^3 es un grupo alquilo, más preferentemente un grupo metilo.

Los productos de silicona comercialmente disponibles incluyen, pero no se limitan necesariamente a, polímeros y copolímeros de polisiloxi vinil funcionales, alcoxi funcionales (preferentemente epoxi funcionales), alquilamino funcionales, hidroxilo funcionales y alquilmercapto funcionales, que están disponibles, por ejemplo, de Gelest, Inc., Tullytown, PA, o pueden hacerse usando procedimientos conocidos, tal como los que se describen en Thomas, D. R., "Cross-linking of Polydimethylsiloxanes", en Siloxane Polymers, Clarson, S. J. y Semlyen, J. A. (Editores), PTR Prentice Hall, New Jersey, páginas 567-615 (1993). Los productos vinil funcionales comercialmente disponibles lo más preferidos en general están disponibles en unos pesos moleculares que varían de aproximadamente 363 a aproximadamente 5.500, con unos pesos moleculares preferidos que son de aproximadamente 500 a aproximadamente 3500.

Un agente de reticulación preferido es el copolímero de epoxiciclohexilo que se analiza con más detalle a continuación. Más preferida es la silicona terminada en epoxipropoxipropilo que se analiza con más detalle a continuación. Los agentes de reticulación lo más preferidos son siliconas terminadas en vinilo. Estos agentes de reticulación pueden obtenerse, por ejemplo de Gelest, Inc., Tullytown, Pa., o prepararse usando procedimientos conocidos.

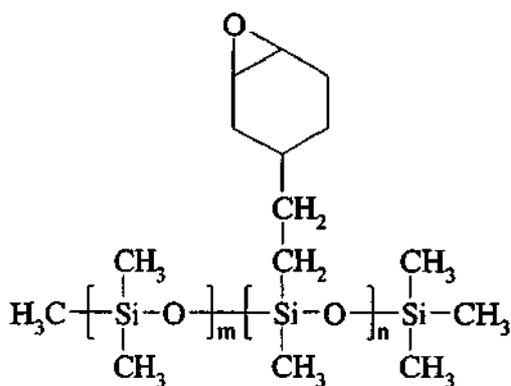
El copolímero de (epoxiciclohexiletil)metilsiloxano-dimetilsiloxano en general está disponible en unos pesos moleculares que varían de 500 a 50.000, con unos pesos moleculares preferidos que son de aproximadamente 650 a aproximadamente 3500. El copolímero de (epoxiciclohexiletil)metilsiloxano-dimetilsiloxano tiene la siguiente estructura general:



5

10

en la que m y n suman un total de de aproximadamente 5 a aproximadamente 50; R² y R³ pueden ser cualquiera de los grupos que se enumeran como grupos terminales R¹ y R⁴ en la fórmula general para los agentes de reticulación de silicona dados al comienzo de esta sección, y R¹ y R⁴-R⁷ pueden ser cualquiera de los sustituyentes que se enumeran como los sustituyentes de Si R² y R³ en la fórmula general para los agentes de reticulación de silicona dados al comienzo de esta sección. Preferentemente, R¹ y R⁴-R⁷ están seleccionados de entre el grupo que consiste en grupos alquilo que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. R¹ es preferentemente un grupo metilo; R⁴-R⁷ son preferentemente grupos metilo. Un copolímero de (epoxiciclohexiletil)metilsiloxano-dimetilsiloxano preferido, que está comercialmente disponible de Gelest, tiene la siguiente estructura general:



15

20

Los agentes de reticulación a base de silicona preferidos reaccionan con grupos reactivos en las moléculas de proteína para producir productos secundarios biocompatibles, preferentemente hidrógeno, agua, dióxido de carbono, y / o cualquier otro producto secundario biocompatible que se metaboliza o se excreta fácilmente, se retira la red, o al menos no es tóxico para el cuerpo humano. Los agentes de reticulación a base de silicona adecuados tienen o bien dos o más de las mismas funcionalidades reactivas, o bien dos o más funcionalidades reactivas diferentes. Los agentes de reticulación a base de silicona preferidos tienen dos o más del mismo grupo funcional.

Formación de red

25

Los tioles y otros restos químicos contenidos en residuos aminoácido tienen utilidad como sitios lábiles para reacciones de reticulación para formar redes de proteína, preferentemente redes que tienen las propiedades de una película elastomérica. Las redes preferidas se fabrican usando proteínas de HMWK.

30

Una vez que se han determinado el agente o agentes de reticulación deseados, proteínas, preferentemente proteínas de HMWK, se disuelven en un disolvente adecuado. Para la mayor parte de las reacciones, un disolvente preferido es un disolvente acuoso. En el caso de los agentes de reticulación a base de silicona, un disolvente preferido es un disolvente anhidro que comprende una base. Preferentemente, aproximadamente 2 g de polvo de HMWK se mezclan en el disolvente que contiene una base adecuada, y la mezcla se agita y se calienta hasta una temperatura efectiva para disolver la queratina, habitualmente no más de 60 °C. El pH de la solución se mantiene a aproximadamente 9 a 11 usando una base adecuada. Las bases adecuadas incluyen, pero no se limitan

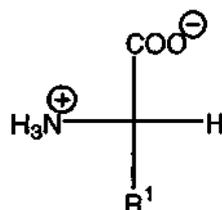
5 necesariamente a, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio, preferentemente hidróxido de amonio. Al menos aproximadamente un 5 % en peso, preferentemente aproximadamente un 10 % en peso, en relación con la queratina, de un agente de reticulación multifuncional se añade a la mezcla, formando una solución de precursor de red. Dependiendo del agente de reticulación, puede añadirse un catalizador o promotor. La solución de precursor de red se distribuye a lo largo de un molde o superficie apropiado, preferentemente hasta un espesor de de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mm, y se cura mediante la exposición a una energía adecuada, tal como una lámpara de calor, un autoclave, microondas o una lámpara UV. En una realización preferida para fabricar películas que comprenden un agente de reticulación a base de silicona, las soluciones se irradian durante un periodo de de aproximadamente 1 horas a aproximadamente 8 horas, preferentemente de aproximadamente 2 horas bajo una lámpara UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) y a continuación se secan bajo una lámpara de calor efectiva para producir una temperatura de al menos aproximadamente $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un periodo de de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 300 minutos, preferentemente de aproximadamente 4 horas.

10 Como alternativa, la queratina se disuelve en agua y la silicona se disuelve en una solución separada de disolvente orgánico miscible en agua. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen etanol, metanol, alcohol isopropílico, acetona, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido. Las dos soluciones se mezclan a continuación y una película se cuele a partir de la mezcla resultante.

15 Reacciones de reticulación

La reticulación de las proteínas y la formación de red tienen lugar, en general, cuando un agente de reticulación a base de silicona que es al menos difuncional, o tiene al menos dos grupos reactivos, se usa para reticular entre grupos colgantes reactivos en dos moléculas de queratina diferentes. Los reactivos a base de silicona crean un puente entre moléculas de queratina, o una reticulación interproteína, y de este modo producen una red tridimensional.

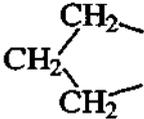
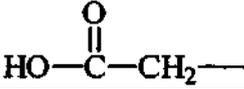
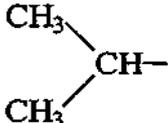
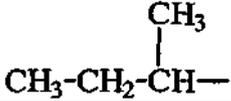
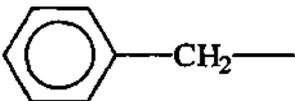
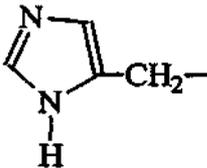
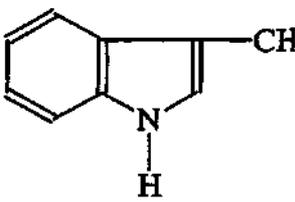
Las proteínas comprenden aminoácidos, que en general tienen la fórmula:



25 La tabla 1 resume los residuos aminoácido hallados en el pelo humano, por ejemplo, y muestra los grupos "R¹" asociados con cada residuo.

Tabla 1. Cantidades promedio clasificadas de aminoácidos en el pelo humano					
Aminoácido	Grupo R ¹	Naturaleza	pKa	Punto Isoeléctrico (pH)	Composición en Porcentaje en el Pelo
Cisteína	H-S-CH ₂ -	No polar	8,4	5,02	17,3
Ácido glutámico	$\text{HO}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$	Polar	4,5	3,22	13,9
Arginina	$\text{NH}_2-\overset{\text{NH}}{\parallel}{\text{C}}-\underset{\text{H}}{\text{N}}-(\text{CH}_2)$	Polar	12,5	11,15	9,85
Serina	HO-CH ₂ -	Polar	Ninguno	5,68	9
Treonina	$\text{CH}_3-\overset{\text{OH}}{\text{CH}}-$	Polar	Ninguno	5,64	7,75
Leucina	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH}-\text{CH}_2- \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Hidrófoba	Ninguno	5,98	7,35

(continuación)

Tabla 1. Cantidades promedio clasificadas de aminoácidos en el pelo humano					
Aminoácido	Grupo R ¹	Naturaleza	pKa	Punto Isoeléctrico (pH)	Composición en Porcentaje en el Pelo
Prolina		Hidrófoba	Ninguno	6,3	6,95
Ácido aspártico		Polar	4,5	2,77	5,8
Valina		Hidrófoba	Ninguno	5,96	5,7
Isoleucina		Hidrófoba	Ninguno	5,94	4,75
Glicina	H-	No polar	Ninguno	5,65	4,15
Fenilalanina		Hidrófoba	Ninguno	5,48	3
Alanina	CH ₃ -	Hidrófoba	Ninguno	6	2,8
Tirosina		Hidrófoba	Ninguno	5,66	2,6
Lisina	NH ₂ -(CH ₂) ₄ -	Polar	10,4	9,59	2,5
Histidina		Aromática	6,2	7,47	0,9
Metionina	CH ₃ -S-CH ₂ -CH	Hidrófoba	Ninguno	5,74	0,85
Triptófano		Hidrófobo	Ninguno	5,89	0,85

El aminoácido más abundante en el pelo humano es la cisteína, la cual se encuentra en forma de grupos cistina con puentes disulfuro. Tal como se ha analizado en lo que antecede, este grupo puede convertirse en otros restos que contienen azufre, lo más en particular tiol. Teóricamente, los tioles pueden hacerse reaccionar con los extremos reactivos de un agente de reticulación usando un número de técnicas químicas, tal como las que se describen en S. Patai (Ed.), *The Chemistry of the Thiol Group*, Partes 1 y 2, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1974). Otros escenarios de reacción, tal como los que se dirigen hacia la síntesis de polímeros, también son útiles para convertir grupos tiol y otros grupos colgantes en una mezcla de residuos funcionales deseables, incluyendo los que se describen en Rempp, P. y Merrill, E. W., *Polymer Synthesis*, Huethig & Wepf Verlag Basel, Heidelberg, Alemania (1986); Young, R. J. y Lovell, P. A., *Introduction to Polymers*, Chapman & Hall, Londres (1991); Odian, G., *Principles of Polymerization*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1991).

Además de la cisteína, los siguientes aminoácidos tienen grupos colgantes que comprenden nitrógeno u oxígeno que pueden ser útiles como grupos colgantes reactivos; arginina, serina, ácido glutámico, treonina, ácido aspártico,

lisina, asparagina, glutamina, tirosina, triptófano e histidina. Cuando la proteína es α -queratina, residuos aminoácido preferidos que comprenden grupos colgantes reactivos para la reticulación son cisteína, arginina, serina, y ácido glutámico, lo más preferentemente cisteína y arginina.

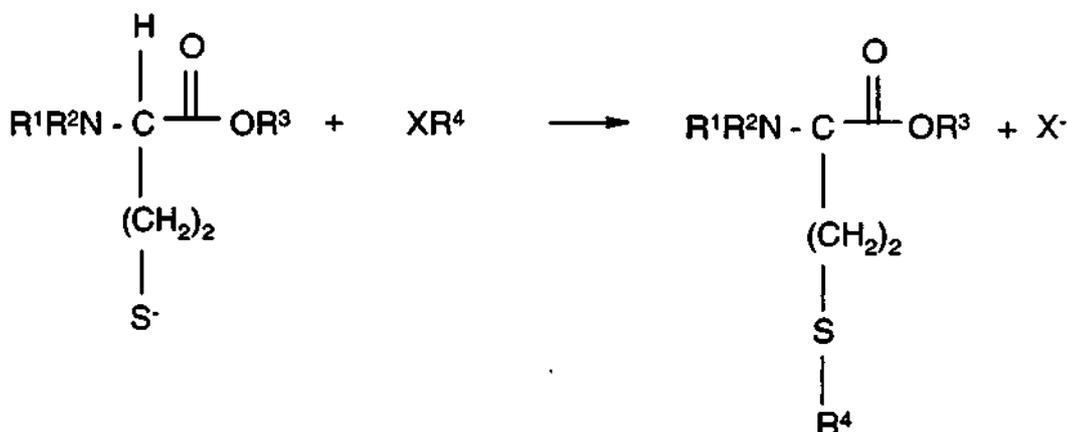
5 Los agentes de reticulación a base de silicona comprenden al menos dos funcionalidades reactivas. Por conveniencia, a veces se hace referencia a los agentes de reticulación que se describen en el presente documento como "di-" funcional. No obstante, a menos que se reivindique expresamente o se indique expresamente que un agente de reticulación es solo difuncional, ha de entenderse que los agentes de reticulación que se describen en el presente documento también pueden ser multifuncionales, por ejemplo, di-, tri-, tetra-, etc.

10 Sin limitar la invención a una teoría o mecanismo de acción particular, a menos que se reivindique expresamente, las siguientes son reacciones químicas de reticulación implicadas en la producción de las redes de proteína reticuladas heterogéneas:

Producción de tioéter

Una modificación reductiva preferida es la formación de un anión de tiolato, seguida por una sustitución nucleófila empleando un grupo saliente apropiado, dando un tioéter, preferentemente un tioéter alcoxi funcional (o un tioéster).

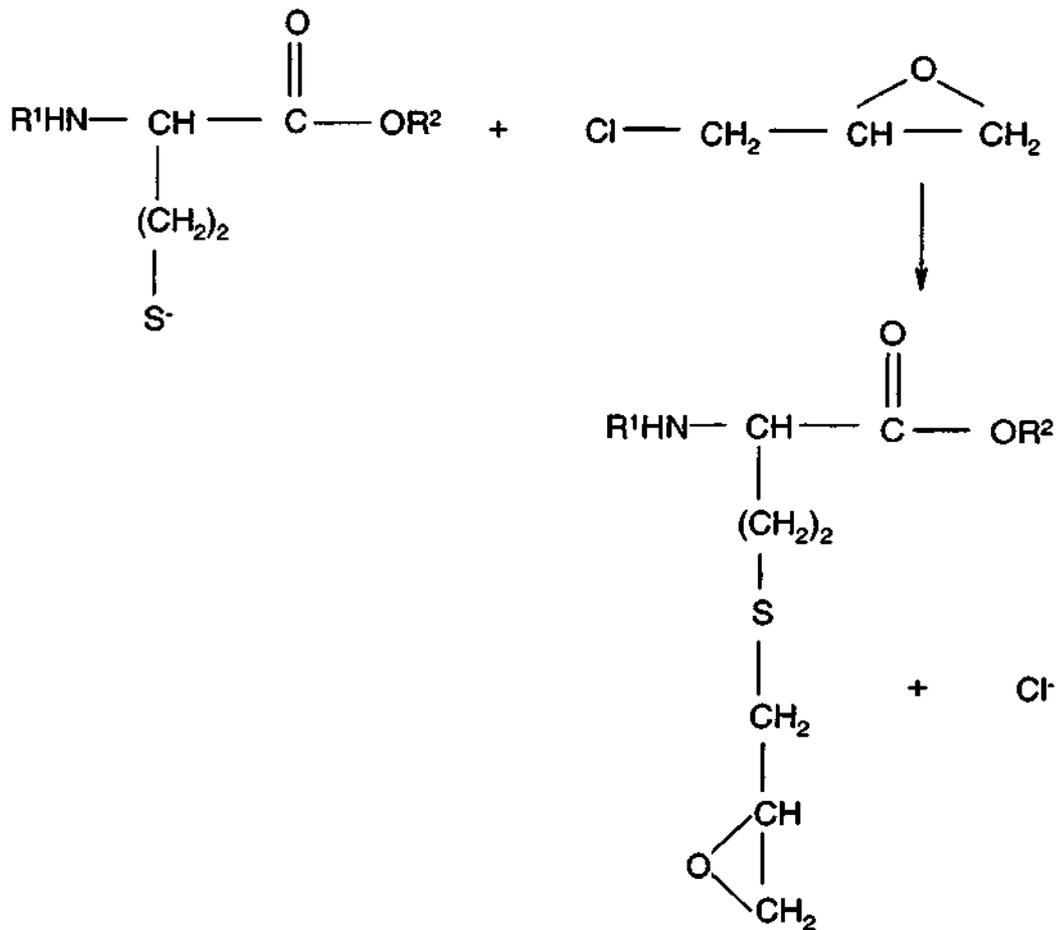
15 Un tioéter alcoxi funcional preferido es un tioéter epoxi funcional. La reacción general se muestra a continuación:



20 en las que R^1 y R^2 comprenden entidades seleccionadas de entre el grupo que consiste en hidrógeno y el resto de la porción N-terminal de la molécula de proteína; R^3 comprende el resto de la porción carboxi-terminal de la molécula de proteína; y, R^4 es un grupo adaptado para formar un tioéter, preferentemente un tioéter alcoxi funcional. Los grupos R^4 adecuados comprenden un "extremo de sustitución", que se enlaza con el azufre y un "extremo reactivo" que reacciona con el agente de reticulación. Los extremos de sustitución adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, grupos alquilo no sustituidos y halosustituidos y grupos alquileo que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono, incluyendo híbridos de resonancia, tal como grupos alilo y grupos arilo no sustituidos y halosustituidos. Los extremos reactivos adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, grupos acilo, y polialquiléteres que contienen de aproximadamente 1 a 50 grupos de repetición, grupos silano y grupos silicona. Los extremos reactivos preferidos incluyen, pero no se limitan necesariamente a, grupos carboxilo, grupos hidroxilo y grupos alcóxido. Un extremo reactivo lo más preferido es un grupo epóxido. En la fórmula precedente, X puede ser cualquier grupo saliente apropiado. Los grupos salientes adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, grupos haluro, grupos tosilato, grupos acetato, grupos hidroxilo, grupos alcoxi y grupos amina. Los grupos X preferidos son haluros, lo más preferentemente cloro. En una realización lo más preferida, XR^4 es epíclorhidrina.

35 El anión de tiolato puede generarse a partir de tiol, o de forma más directa a partir de la materia prima de proteína soluble en agua, preferentemente una materia prima de queratina, mediante reacción con un nucleófilo reactivo. Los nucleófilos adecuados incluyen sales de sulfuro funcionales de alquilo y arilo, sulfonatos, isocianatos, tiocianatos, haluros, sulfhidrato, hidróxido, alcóxidos, azidas y acetatos, preferentemente sales de sulfuro de alquilo y arilo, sulfhidrato, hidróxido, alcóxidos, azidas y acetatos. Un nucleófilo lo más preferido es el sulfuro de sodio.

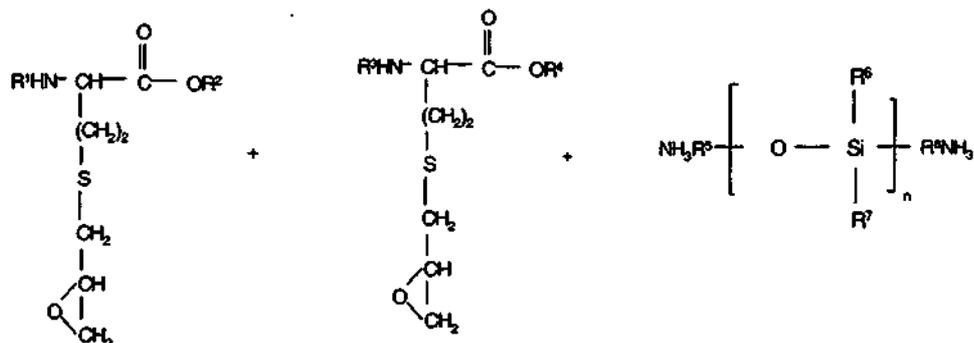
La reacción en la que RX es epíclorhidrina se muestra a continuación:

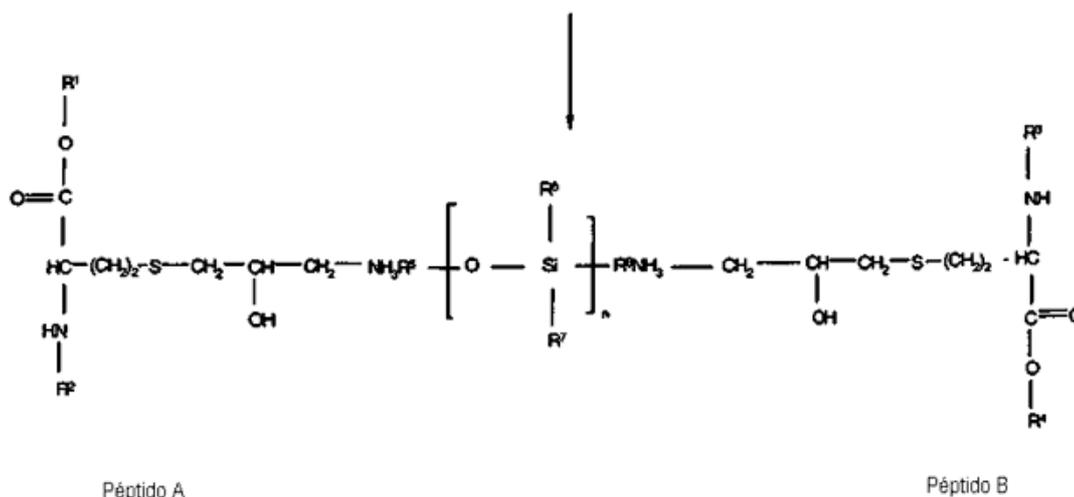


en las que R¹ y R² son el resto de la molécula de proteína soluble en agua de la cual la cisteína es una parte.

5 Con el fin de formar las proteínas solubles en agua funcionalizadas con epóxido precedentes, preferentemente queratínas solubles en agua, en primer lugar se produce un material fuente de queratina soluble en agua, preferentemente según se ha descrito en lo que antecede. Las queratínas solubles en agua a continuación se exponen a una solución de "RX", preferentemente epíclorhidrina, en solución acuosa a un pH de de aproximadamente 9 a aproximadamente 11. El RX se encuentra habitualmente a una concentración de hasta aproximadamente un 20 por ciento en moles en relación con la queratina, preferentemente de aproximadamente un 5 a un 10 por ciento en moles en relación con la queratina, lo más preferentemente de aproximadamente un 10 % en moles. El pH es mayor que aproximadamente 7, preferentemente mayor que aproximadamente 9. La temperatura es de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 °C, preferentemente de aproximadamente 60 °C. La reacción continúa durante un periodo de tiempo de de aproximadamente 1 a aproximadamente 72 horas, lo más preferentemente de aproximadamente 24 horas. El resultado son grupos tiol epoxidizados.

15 En una realización más preferida, las queratínas epoxidizadas se curan para dar un elastómero usando agentes de reticulación a base de silicona multifuncionales, tal como siliconas amino funcionales, que están disponibles de Gelest, Inc. (Tullytown, PA). La reacción es según sigue:



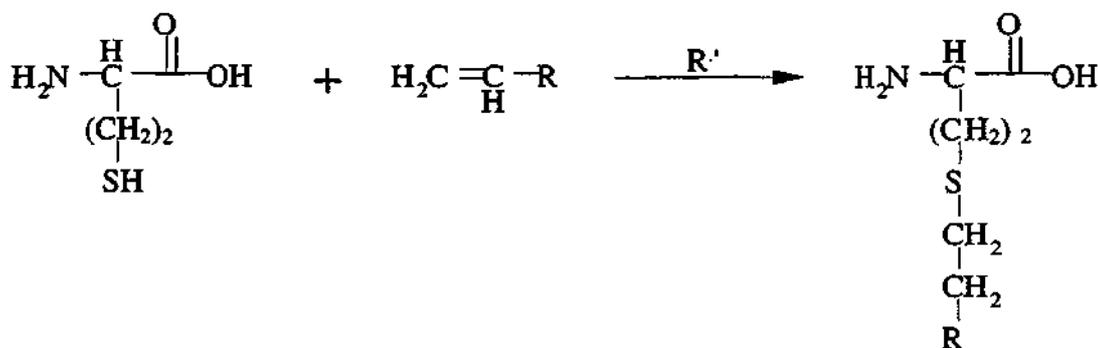


en las que R¹ y R² son el resto de la proteína soluble en agua "A" que porta una cisteína funcionalizada con epoxi; R³ y R⁴ son el resto de la molécula de proteína soluble en agua B que porta una cisteína funcionalizada con epoxi; R⁵ y R⁸ son preferentemente grupos alquilo que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, lo más preferentemente grupos n-propileno; y R⁶ y R⁷ están seleccionados independientemente de entre los grupos que se han descrito en lo que antecede en la fórmula general para los agentes de reticulación de silicona, específicamente R² y R³ de los mismos. Lo más preferentemente, R⁶ y R⁷ son grupos relativamente inertes, tal como grupos metilo. A pesar de que es teóricamente posible que la molécula de proteína soluble en agua A y B sea la misma molécula, se prefiere que las proteínas A y B sean moléculas diferentes en la totalidad de las realizaciones que se describen en el presente documento, preferentemente diferentes moléculas de α-queratina solubles en agua.

Con el fin de realizar esta reacción, las queratinas se disuelven en agua y la silicona se disuelve en un disolvente orgánico miscible en agua separado. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen etanol, metanol, alcohol isopropílico, acetona, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido. Las dos soluciones se mezclan, junto con un catalizador apropiado si es necesario, y la mezcla se cuele para dar una película. El secado de la película puede lograrse mediante secado con aire, o acelerarse mediante la aplicación de calor o vacío. El curado se logra mediante la exposición a una fuente de energía, preferentemente calor, irradiación, o una combinación de las mismas.

Adición de Radical Libre a Grupos colgantes Reactivos

Las reacciones de adición tal como adición de radical libre a un hidrocarburo insaturado representan otro camino potencial para la transformación del grupo tiol. Una diversidad de siliconas vinil funcionales, por ejemplo, pueden usarse para modificar el tiol en presencia de un catalizador apropiado. Los catalizadores de radical libre pueden iniciarse por calor o energía electromagnética. El escenario de reacción se muestra a continuación:



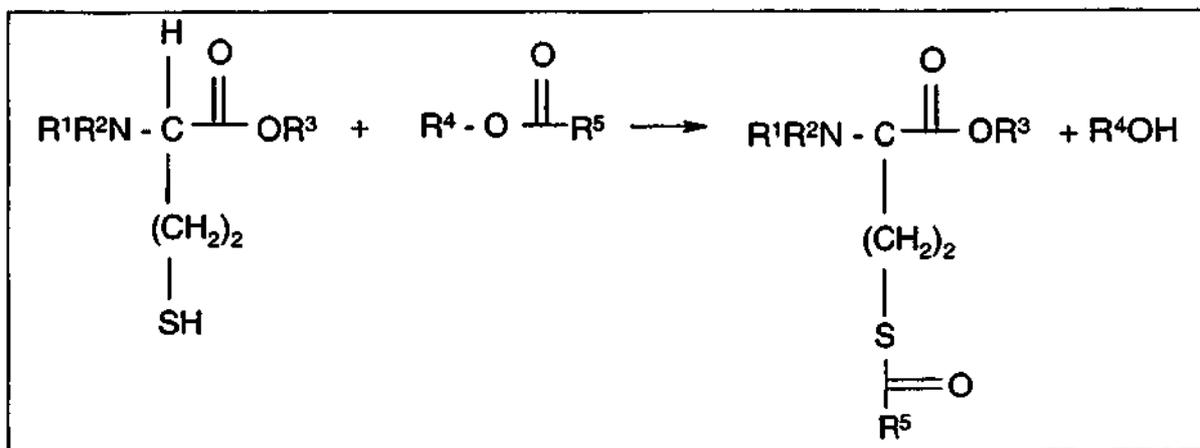
Quando el tiol está unido a una molécula de queratina, y si el grupo R del derivado de alilo es una silicona, se forma un copolímero de queratina-silicona. Si la silicona es al menos difuncional (por ejemplo, polidimetilsiloxano terminado en vinilo), resulta una red o estructura elastomérica.

Con el fin de realizar esta reacción, una cantidad adecuada de polvo de queratina se disuelve en un disolvente anhidro, que comprende preferentemente una base adecuada. Un fluido de silicona terminado en vinilo se añade después de la disolución completa, junto con una cantidad adecuada de un iniciador de radical libre, preferentemente sal de sodio de ácido antraquinona-2-sulfónico monohidratada. (Aldrich, Milwaukee, WI). Otros iniciadores de radical libre adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, fotoiniciadores de radical libre incluyendo, pero sin limitarse necesariamente a, éteres de benzoína, bencil cetales, α-dialcoxiacetofenonas, α-

5 hidroxialquilfenonas, α -aminoalquilfenonas, óxidos de acilfosfina, benzofenona / aminas, tioxantonas / aminas, titanocenas, y determinados silanos. La cantidad del fluido de silicona vinil funcional que se añade es de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 20 por ciento en peso en relación con la cantidad de queratina que se ha usado, preferentemente de aproximadamente un 10 por ciento en peso. La solución viscosa se cuele sobre un molde adecuado. Para fines de laboratorio, un molde adecuado es una placa de Petri revestida con Teflón™. La solución viscosa se cura durante un tiempo efectivo para producir una película elastomérica que tiene unas propiedades deseadas. El curado se logra mediante la exposición a una fuente de energía, preferentemente calor, irradiación, o una combinación de las mismas. En una realización preferida, el fluido viscoso se irradia durante un periodo de de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas, preferentemente de aproximadamente 2 horas
 10 bajo una lámpara UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) y a continuación se seca bajo una lámpara de calor efectiva para producir una temperatura de al menos aproximadamente 60°C durante un periodo de de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 300 minutos, preferentemente de aproximadamente 4 horas.

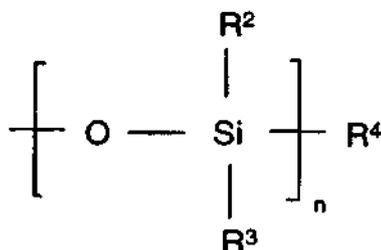
Conversión de tiol por condensación

15 Las reacciones de condensación tal como transesterificación, por ejemplo, pueden usarse para generar tioésteres de un agente de reticulación a base de silicona. Un ejemplo de una reacción de transesterificación se muestra en el esquema 3.



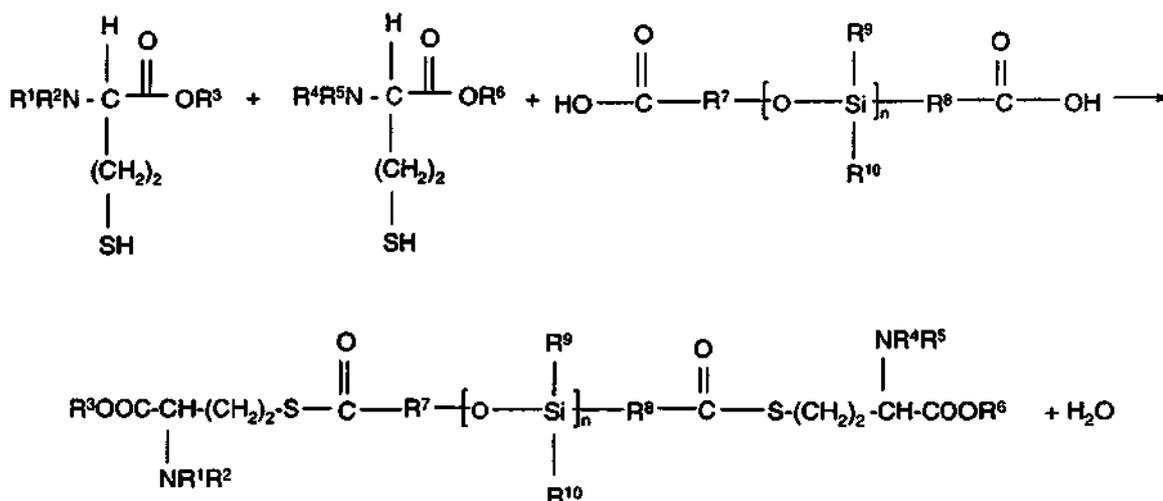
20 en las que R^1 y R^2 comprenden entidades seleccionadas de entre el grupo que consiste en hidrógeno y el resto de la porción N-terminal de la molécula de proteína; R^3 comprende el resto de la porción carboxi-terminal de la molécula de proteína; R^4 es un grupo saliente apropiado; y, R^5 comprende una entidad a base de silicona. Los grupos R^4 adecuados incluyen, pero no se limitan necesariamente a, hidrógeno, grupos alquilo que tienen de aproximadamente 1 a 6 átomos de carbono, y grupos arilo, incluyendo grupos bencilo. R^5 también puede comprender grupos silicona.

Cuando R^5 es un grupo silicona, ese grupo preferentemente tiene la siguiente estructura general:



25 en la que n , R^2 , R^3 y R^4 son los mismos que los grupos correspondientes que se han descrito en lo que antecede en la fórmula general para los agentes de reticulación de silicona.

Cuando R^5 comprende una entidad a base de silicona, lo siguiente es una reacción a modo de ejemplo:

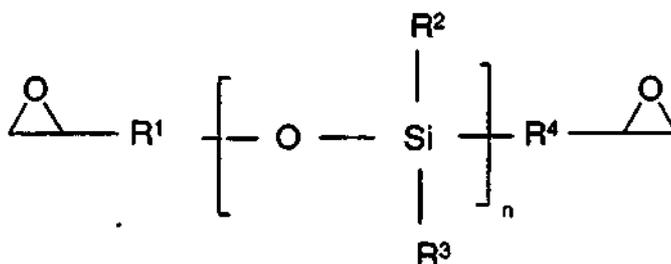


5 en las que n es de aproximadamente 1 a aproximadamente 50; R¹, R² y R³ son el resto de una primera molécula de proteína soluble en agua; R⁴, R⁵ y R⁶ son el resto de una segunda molécula de proteína soluble en agua; R⁷ y R⁸ preferentemente están seleccionados de entre el grupo que consiste en grupos alquilo que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, grupos alcoxi que comprenden uno o más grupos alquilo que tienen un total de de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, grupos sililo que tienen los mismos sustituyentes colgantes que el resto de la cadena de polímero (R⁹ y R¹⁰), y combinaciones de los mismos; y R⁹ y R¹⁰ están seleccionados independientemente de entre los grupos que se han descrito en lo que antecede en la fórmula general para agentes de reticulación de silicona adecuados, específicamente R² y R³ de los mismos. Lo más preferentemente, R² y R³ son grupos relativamente inertes, tal como grupos metilo.

10 Con el fin de realizar esta reacción, las queratinas se disuelven en agua y la silicona se disuelve en un disolvente orgánico miscible en agua separado. Los disolventes orgánicos adecuados incluyen etanol, metanol, alcohol isopropílico, acetona, tetrahidrofurano y dimetilsulfóxido. Las dos soluciones se mezclan, junto con un catalizador apropiado si es necesario, y la mezcla se cuele para dar una película. El secado de la película puede lograrse mediante secado con aire, o acelerarse mediante la aplicación de calor o vacío. El curado se logra mediante la exposición a una fuente de energía, preferentemente calor, irradiación, o una combinación de las mismas.

Adición de Grupos amina

15 Las reacciones de adición entre grupos amina reactivos y compuestos de oxirano tienen lugar fácilmente sin la ayuda de un catalizador. Los compuestos de oxirano preferidos son diepóxidos que tienen la siguiente estructura general:

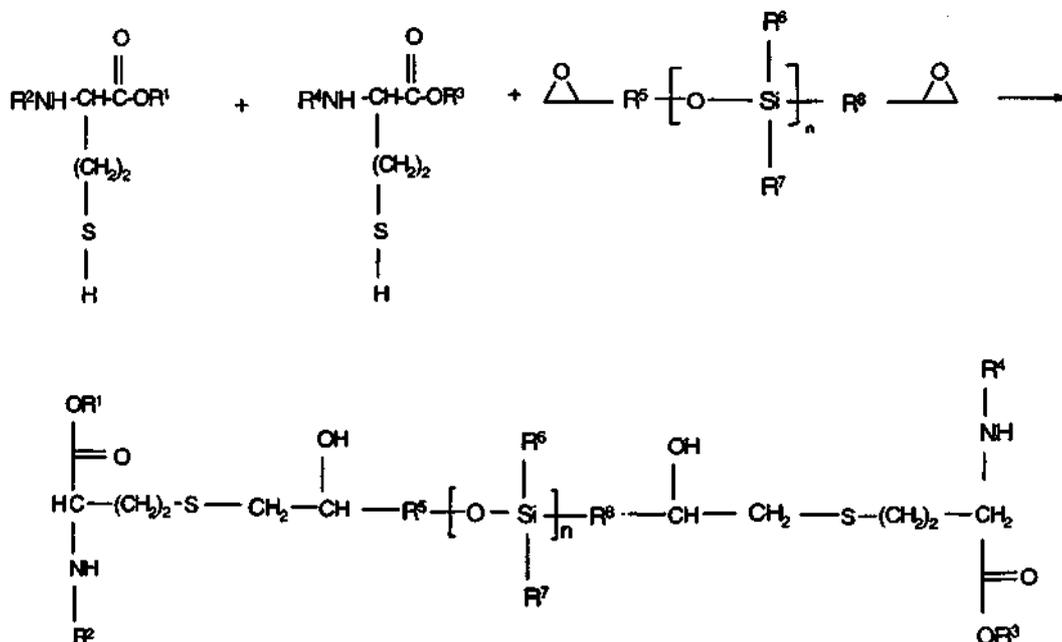


25 en la que n es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50; R² y R³ están seleccionados independientemente de entre los grupos que se han descrito en lo que antecede en la fórmula general para agentes de reticulación de silicona adecuados, específicamente R² y R³ de los mismos. Lo más preferentemente, R² y R³ son grupos relativamente inertes, tal como grupos metilo; y, R¹ y R⁴ son sustancialmente cualesquiera restos que no interfieran con las características deseadas de la película. Preferentemente, R¹ y R⁴ están seleccionados de entre el grupo que consiste en grupos alquilo que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono, grupos alcoxi que comprenden uno o más grupos alquilo que tienen un total de de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, y grupos silano que comprenden opcionalmente uno o más sustituyentes alquilo que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, lo más preferentemente grupos metilo, y combinaciones de los mismos.

30 Los oxiranos más preferidos tienen la siguiente estructura general:

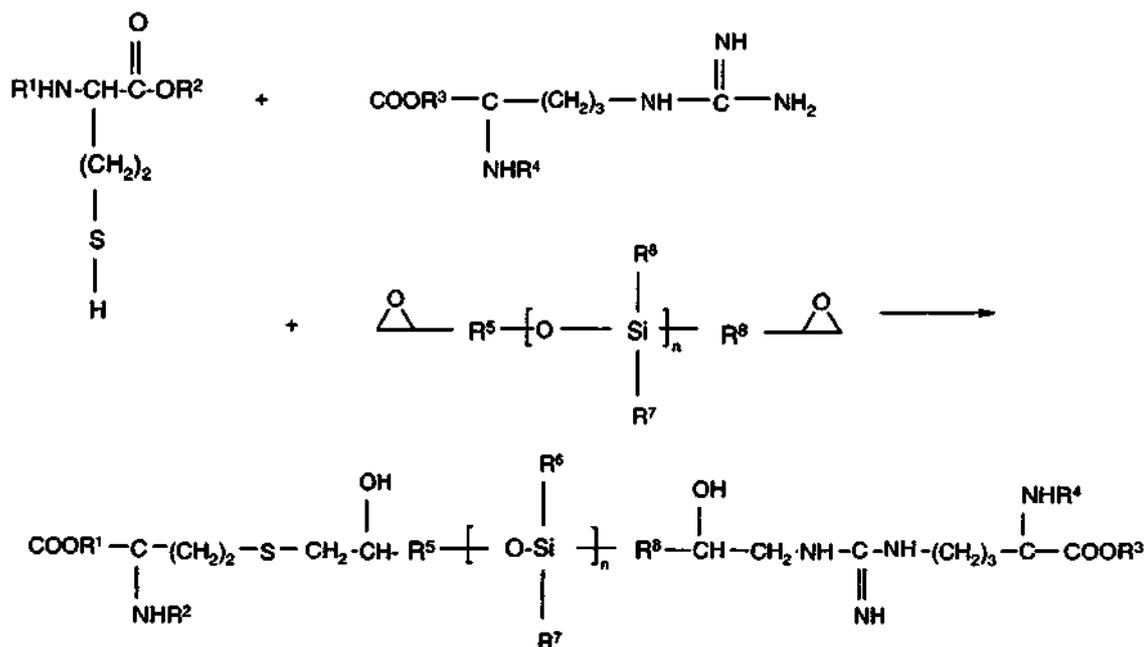
100 °C, preferentemente de aproximadamente 30 °C, preferentemente durante un periodo de tiempo de de aproximadamente 0 a aproximadamente 72 horas, lo más preferentemente de aproximadamente 24 horas.

Una reacción similar tiene lugar cuando un diepóxido reacciona con residuos cisteína:



- 5 en las que R¹ y R² son el resto de una primera molécula de proteína y R³ y R⁴ son el resto de una segunda molécula de proteína, preferentemente diferentes moléculas de α-queratina. R⁵ y R⁸ son los restos correspondientes que acaban de describirse con respecto a la reacción con arginina.

10 Los expertos en la materia reconocerán que muchos de los agentes de reticulación que se describen en el presente documento reaccionarán con una diversidad de residuos aminoácido que tienen grupos colgantes que comprenden un átomo de nitrógeno, átomo de azufre, o átomo de oxígeno reactivo. Por lo tanto, un extremo de un diepóxido puede reaccionar con un residuo cisteína mientras que el otro extremo del diepóxido reacciona con un residuo arginina, según sigue:



- 15 en las que R¹ y R² representan el resto de una molécula de proteína; R³ y R⁴ representan el resto de una molécula de proteína separada, preferentemente diferentes moléculas de α-queratina; R⁵ y R⁸ pueden ser cualquier resto que no interfiera con las características deseadas de la película. Preferentemente, R⁵ y R⁸ están seleccionados de entre

5 el grupo que consiste en grupos propoxipropilo y grupos alquilo que tienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 átomos de carbono; y R⁶ y R⁷ están seleccionados independientemente de entre los grupos que se han descrito en lo que antecede con respecto a los agentes de reticulación de silicona, específicamente R² y R³ de los mismos. Lo más preferentemente, R⁶ y R⁷ son grupos relativamente inertes, tal como grupos metilo.

La identidad de residuos aminoácido enlazados por el agente de reticulación no es tan importante como el requisito de que tenga lugar una cantidad suficiente de reticulación entre moléculas de proteína para producir una película que tenga unas propiedades deseadas. En una realización preferida, la reticulación produce una película elastomérica.

10 **Propiedades de red**

15 Tal como se aprecia en lo que antecede, una red a base de queratina tridimensional puede formarse usando una diversidad de químicas. Preferentemente, la "tasa de disolución" de una red de este tipo puede controlarse mediante el control de la densidad de reticulación de la película y el nivel y el tipo de funcionalidad, en particular la funcionalidad adyacente al sitio de reticulación. Por ejemplo, el uso de un agente de reticulación que tiene una de las siguientes características reduce la tasa de disolución de la red resultante: un agente de reticulación que forma enlaces S-C, en contraposición a más enlaces hidrolizables, tal como enlaces éster; un agente de reticulación que introduce un impedimento estérico sustancial en el sitio de reticulación; un agente de reticulación que es hidrófobo. La "tasa de disolución" de la red o película resultante se mide mediante la determinación de cuánto tiempo resiste la película la hidrólisis tras la exposición a un tampón acuoso que tiene un pH de aproximadamente 7. Una "tasa de disolución" deseable dependerá de la aplicación en la que va a usarse la película.

20 La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes Ejemplos, los cuales son solo ilustrativos:

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan solo para fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

25 **Ejemplo 1**

500 g del pelo humano seco y limpio se colocaron en un matraz de 12 l con 8,35 l de H₂O₂ al 1 % en p/v y se llevaron a una ebullición suave. La reacción se calentó sin agitación a reflujo durante 180 minutos. El pelo se filtró, se lavó con agua desionizada y se dejó secar al aire.

30 100 g de pelo oxidado se colocaron en un matraz de 2 l con 1 l de solución de ácido tioglicólico 1 M ajustada a pH 9 con hidróxido de amonio. La reacción se calentó hasta 60 °C bajo una atmósfera de nitrógeno con agitación durante 24 horas.

35 La mezcla de sólidos y extracto líquido se vertió en botellas bajo una atmósfera de argón. Las botellas se precintaron y se centrifugaron para afectar a la separación de los sólidos. El líquido se canuló al interior de un exceso de 8 veces de etanol frío, bajo nitrógeno, y se formó un precipitado. El precipitado se filtró, se lavó con etanol y se secó a vacío. Los sólidos secos se molieron hasta dar un polvo usando un mortero y una mano de mortero.

40 3 g del polvo de queratina se disolvieron en 15 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) con 1 ml de hidróxido de amonio al 30 %. Después de la disolución completa, se añadieron 0,3 g de un fluido de silicona terminado en vinilo (catálogo N° DMS-V03; Gelest, Inc., Tullytown, PA) y 0,1 g de sal de sodio de ácido antraquinona-2-sulfónico monohidratada (Aldrich, Milwaukee, WI). La solución viscosa se coló sobre una placa de Petri revestida con Teflón™ y se curó durante 2 horas bajo una lámpara UV ($\lambda = 365$ nm). La película se secó adicionalmente bajo una lámpara de calor durante 4 horas. Este proceso dio como resultado en una película elastomérica de buena calidad.

Ejemplo 2

45 175 g de pelo seco limpio se colocaron en un reactor de vidrio de 4 l con 3,5 l de mercaptoetanol 1 M ajustado a pH 10,2 con hidróxido de potasio. La solución se agitó bajo nitrógeno durante 21 horas, después de lo cual, los sólidos se separaron por filtración. El pelo reducido se extrajo a continuación con 2,3 de solución de urea acuosa 7 M a temperatura ambiente, bajo nitrógeno, durante 24 horas.

50 La reacción se centrifugó y el líquido se filtró, a continuación se neutralizó a pH 7 mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado. La solución de queratina neutralizada se añadió gota a gota a un exceso de 10 veces de etanol para afectar a la precipitación. El precipitado se filtró, se lavó con etanol y se secó a vacío. El sólido seco se molió hasta dar un polvo usando un mortero y una mano de mortero.

5 g del polvo de queratina molido se disolvieron en 60 g de solución de hidróxido de amonio al 30 % con la ayuda de agitación, sonicación y ligero calentamiento. Después de la disolución completa, se permitió que el hidróxido de amonio se evaporara con la asistencia de una purga de nitrógeno dinámica. A la mitad de esta solución se añadieron 0,05 g de sal de sodio de ácido antraquinona-2-sulfónico monohidratada y una solución de 0,5 g de silicona

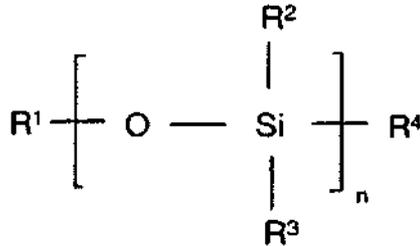
ES 2 460 926 T3

terminada en vinilo (catálogo N° DMS-V03; Gelest, Inc., Tullytown, PA) en 2 g de alcohol isopropílico. Después de aproximadamente 30 minutos de agitación, la solución espesa se coló sobre una placa de Petri revestida con Teflón y se curó bajo una lámpara UV durante aproximadamente 3 horas. La película se secó a continuación bajo una lámpara de calor durante aproximadamente 1 hora. La película se colocó en agua desionizada durante 24 horas y no se disolvió.

5

REIVINDICACIONES

1. Película proteínica para su uso en la cicatrización, en la que dicha película proteínica puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende poner en contacto proteínas de queratina de un elevado peso molecular de al menos 50 kDa con un agente de reticulación de silicona derivatizado en unas condiciones efectivas para formar enlaces covalentes entre grupos funcionales reactivos en el agente de reticulación de silicona y grupos colgantes tiol de la proteína de queratina y secar el producto de reacción para producir una película, en la que el agente de reticulación de silicona tiene la siguiente estructura general:



- 10 en la que n es de 1 a 50; y, al menos dos de R¹, R², R³ y R⁴ comprenden funcionalidades reactivas que comprenden grupos vinilo; y en la que R¹, R², R³ y R⁴ están seleccionados de entre el grupo que consiste en hidrógeno; grupos heteroalquilo y alquilo cíclicos, lineales y ramificados que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, comprendiendo dichos grupos tanto grupos no sustituidos como grupos sustituidos con al menos una funcionalidad reactiva, en la que dichos grupos heteroalquilo comprenden grupos acetoxi, grupos silano que comprenden opcionalmente uno o más sustituyentes alquilo que tienen un total de de 1 a 6 átomos de carbono, o combinaciones de los mismos.
- 15 2. Película proteínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que R¹ y R⁴ comprenden grupos vinilo.
3. Película proteínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1-2, en la que al menos uno de R² y R³ es un grupo alquilo.
4. Película proteínica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que al menos uno de R² y R³ es un grupo metilo.
- 20 5. Película proteínica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1-4, en la que el agente de reticulación de silicona es polidimetilsiloxano terminado en vinilo.
6. Película proteínica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que las proteínas de queratina se obtienen a partir de pelo humano.
- 25 7. Película proteínica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que las proteínas de queratina se obtienen a partir de pelo animal.
8. Película proteínica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7, en la que el pelo está reducido.
9. Película proteínica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 6 y 7, en la que el pelo está oxidado.