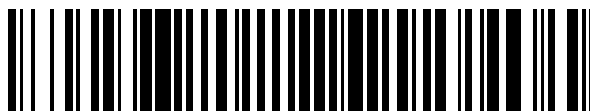


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 486**

51 Int. Cl.:

A61L 15/38 (2006.01)

A61F 13/15 (2006.01)

A61L 15/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2003** **E 06011877 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014** **EP 1693073**

54 Título: **Apósitos que comprenden hidrogeles hidratados y enzimas**

30 Prioridad:

24.04.2002 EP 02252895

18.05.2002 GB 0211504

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

03.10.2014

73 Titular/es:

ARCHIMED LLP (100.0%)
Colworth Science Park Sharnbrook Bedford
Bedfordshire MK44 1LQ, GB

72 Inventor/es:

DAVIS, PAUL JAMES y
AUSTIN, ANDREW JOHN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 502 486 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

Apósitos que comprenden hidrogeles hidratados y enzimas.

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a apósitos cutáneos para aplicación a una parte de un cuerpo humano o de animal para tratamiento de la piel, y se refiere en particular (pero no exclusivamente) a apósitos para tratamiento de piel comprometida, en particular lesiones cutáneas, es decir, cualquier ruptura en la superficie de la piel, causada por lesión o enfermedad, incluyendo úlceras cutáneas, quemaduras, cortes, pinchazos, laceraciones, lesiones con elementos contundentes, lesiones por acné, furúnculos, etc.

Antecedentes a la invención

- 10 Las heridas con frecuencia llegan a infectarse. Los apósitos pueden soportar sustancias antisépticas y la protección física que proporcionan evita la entrada de microbios de infección extra, aunque esta exclusión microbiana pocas veces es absoluta. Las sustancias antisépticas transportadas en la almohadilla del apósito no son normalmente muy eficaces, posiblemente debido a que no se difunden fácilmente a la herida a un ritmo constante. Por otra parte, las sustancias más eficaces, antibióticos, no están disponibles para uso rutinario, debido a los problemas siempre
15 presentes de aparición de resistencia a los fármacos.

- El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una sustancia antimicrobiana conocida con muchas ventajas. Se produce de manera natural en el cuerpo por glóbulos blancos como parte de las actividades de defensa inmunitaria como respuesta a la infección. No hay mecanismos de evasión microbiana conocidos por los que los microbios puedan escapar a sus efectos y presenta una corta duración de la vida, descomponiéndose muy rápidamente hasta agua y
20 oxígeno en los tejidos. No se acumula, por lo tanto, a niveles peligrosos. Cuando se tiene que aplicar por vía tópica (por ej., para tratar el acné), su eficacia mejora por el hecho de que penetra fácilmente en la superficie de la piel para alcanzar sitios de infección subyacentes.

- Como el peróxido de hidrógeno es tan beneficioso, se ha usado durante muchos años como sustancia antimicrobiana para limpiar heridas de todas clases y como un antiséptico general biológicamente compatible. En particular, se han usado pomadas que contienen peróxido de hidrógeno, por ej., para tratamiento de úlceras de las
25 piernas, úlceras por presión, heridas menores e infección. Hay, sin embargo, problemas asociados al uso de peróxido de hidrógeno. La disolución de peróxido de hidrógeno es muy inestable y se oxida fácilmente a agua y oxígeno; además, el peróxido de hidrógeno en concentración alta puede ser dañino para la piel normal y para las células responsables de la curación en la base de la herida. Es muy difícil o incluso imposible usar peróxido de hidrógeno como parte de un apósito predosificado: su inestabilidad haría un producto con una duración de la vida
30 imposiblemente corta, y la dosificación en el punto de aplicación no proporcionaría aún un suministro sostenido durante un periodo provechosamente prolongado. Cuando se usa en el tratamiento de heridas (como se describe en la Farmacopea Británica, por ejemplo) se requieren concentraciones muy altas (típicamente 3%) para conseguir un potente efecto antimicrobiano por un intervalo de tiempo muy corto. Incluso este tipo de pequeña ráfaga puede ser eficaz, debido a la gran eficacia del peróxido de hidrógeno, pero hay la desventaja adicional de que dichas
35 concentraciones altas pueden ser relativamente dañinas para células huéspedes y pueden dificultar el proceso de curación. Por esta razón, el uso de peróxido de hidrógeno tiende a restringirse a la limpieza y esterilización iniciales de las heridas. Incluso así, es una sustancia de defensa natural, producida por las propias células del cuerpo (a concentraciones menores) y se reconoce cada vez más como molécula mensajera intercelular e intracelular, implicada en la señalización y regulación molecular de célula a célula. Indudablemente, el peróxido de hidrógeno es
40 potencialmente una molécula muy beneficiosa, si se puede usar en las concentraciones correctas y en el transcurso apropiado de tiempo.

La patente de EE.UU. 4576817 propone un apósito fibroso bacteriostático que incorpora enzimas secas tales como glucosa oxidasa y lactoperoxidasa para generar por ej., peróxido de hidrógeno e hipoyodito en contacto con suero.

- 45 La patente internacional WO 01/28600 describe un apósito que incluye glucosa oxidasa seca, lactoperoxidasa seca y una sal de yoduro en una matriz polimérica. La glucosa oxidasa cataliza una reacción de oxidación de glucosa presente en fluidos corporales de un sitio herido para generar peróxido de hidrógeno. La acción de la lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y yoduro genera yodo elemental, que es un poderoso agente anti-infectivo.

- 50 La curación eficaz de la herida mejora por diversos factores, incluyendo un entorno húmedo y la eliminación de exudados de la herida por absorción. Se han usado materiales super-absorbentes secos con frecuencia para ganar el beneficio de eliminación de exudado, puesto que estas sustancias absorben y soportan fácilmente fluidos que se exudan de las heridas con gran eficacia. Sin embargo, un material absorbente seco muy eficaz puede conducir a una ausencia de humedad inútil y un apósito construido a partir de dicho material no funcionaría bien con sistemas
55 enzimáticos antimicrobianos, al menos no hasta que el apósito llegara a estar humedecido a fondo por fluido de la herida.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un apósito cutáneo según la reivindicación 1, sellado en el envase, en el que el apósito comprende enzima oxidoreductasa y opcionalmente enzima peroxidasa, en el que la enzima o las enzimas están presentes en estado hidratado. La enzima o las enzimas están así en estado hidratado en el apósito previamente al uso del apósito, es decir, previamente a la aplicación del apósito a la piel.

Proporcionando la enzima o las enzimas en estado hidratado, la enzima está presente en un estado activo, húmedo en el apósito y puede empezar a funcionar inmediatamente cuando se pone en contacto con el sustrato apropiado en el uso del apósito. Esto se tiene que contrastar con apósitos de la técnica anterior en el caso de que las enzimas estén en estado seco y requieran hidratación inicial en el uso, retrasando así el funcionamiento de la enzima y consiguiendo efectos antimicrobianos. El estado hidratado de la enzima también permite que se formule en un hidrogel húmedo u otro material de apósito húmedo de tal manera que el apósito pueda donar humedad a una herida seca.

El apósito se usa colocándose sobre la piel de un ser humano o animal por ej., sobre una herida o sobre una región de la piel que se tiene que tratar para fines cosméticos o terapéuticos, por ej., para tratamiento de acné u otras afecciones de la piel. La enzima oxidoreductasa cataliza una reacción de un sustrato apropiado con oxígeno para producir peróxido de hidrógeno. El sustrato puede estar presente de manera natural en fluidos corporales y/o se puede suministrar por separado y/o se puede incorporar al apósito. Las enzimas oxidoreductasas adecuadas para uso en la invención y los correspondientes sustratos (que están presentes en la sangre y en fluidos de tejidos) incluyen lo siguiente:

Enzima	Sustrato
Glucosa oxidasa	β -D glucosa
Hexosa oxidasa	Hexosa
Colesterol oxidasa	Colesterol
Galactosa oxidasa	D-galactosa
Piranosa oxidasa	Piranosa
Colina oxidasa	Colina
Piruvato oxidasa	Piruvato
Glicolato oxidasa	Glicolato
Aminoácido oxidasa	Aminoácido

La enzima oxidoreductasa preferida en la actualidad es glucosa oxidasa. Esta cataliza la reacción de sustrato de β -D-glucosa para proporcionar peróxido de hidrógeno y ácido glucónico.

Se puede usar una mezcla de enzimas oxidoreductasas.

Si la reacción tiene lugar en o en la proximidad de la piel, el peróxido de hidrógeno así producido puede presentar un efecto antibacteriano localizado.

Alternativamente o adicionalmente, el peróxido de hidrógeno generado de esta manera se puede usar en una disposición en dos fases, experimentando el peróxido de hidrógeno una reacción catalizada por una enzima peroxidasa para producir una serie de especies incluyendo compuestos intermedios de oxígeno reactivos que presentan propiedades antimicrobianas y que pueden ayudar por lo tanto a fomentar la curación de la herida. Para dichas realizaciones, el apósito incluye una enzima peroxidasa, preferiblemente presente en estado hidratado. Como una posibilidad más el peróxido de hidrógeno puede reaccionar directamente de una manera no catalizada con sustancias tales como iones yoduro para generar yodo molecular.

Las enzimas peroxidasa útiles en la invención incluyen lactoperoxidasa, peroxidasa de rábano, yoduro peroxidasa, cloruro peroxidasa y mieloperoxidasa, estando favorecida la lactoperoxidasa en la actualidad.

Se puede usar una mezcla de enzimas peroxidasa.

Las especies activas producidas por la acción de la peroxidasa son difíciles de definir, y dependerán en cierta extensión de la peroxidasa particular en cuestión. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano actúa de manera muy

diferente a la lactoperoxidasa. La química detallada se complica por el hecho de que los productos son tan reactivos que dan lugar rápidamente a otros productos asociados que son también muy reactivos. Se cree que se producen radicales hidroxilo, oxígeno singlete y superóxido, como en las reacciones de "ráfaga oxidativa" identificadas en leucocitos neutrófilos y macrófagos del cuerpo humano, y en la conocida reacción "Fenton", basada en los efectos catalíticos de los iones férricos.

El apósito incluye una fuente de agua de manera que la enzima o las enzimas estén presentes en estado hidratado. El apósito puede estar en la forma, por ej., de un apósito de algodón húmedo o puede incluir un material de mecha estructurado con ingredientes húmedos. Preferiblemente, sin embargo, el apósito incluye uno o más geles a base de agua o acuosos, también referidos como hidrogeles hidratados. Dichos geles se pueden formar de una serie de materiales y pueden contener una serie de reactivos, como se discutirá a continuación.

Un hidrogel hidratado proporciona una fuente de agua para hidratar la enzima o las enzimas, activando la reacción rápida y la consiguiente liberación de sustancias antimicrobianas. El gel también puede actuar para absorber agua y otros materiales exudados de un sitio de la herida, permitiendo que el apósito realice una valiosa y útil función eliminando dichos materiales de un sitio de la herida. El hidrogel hidratado también proporciona una fuente de humedad, que puede funcionar manteniendo la enzima o las enzimas en el apósito en estado hidratado, y que puede actuar en el uso manteniendo un sitio herido húmedo, ayudando a la curación.

El hidrogel o cada hidrogel hidratado comprende de manera conveniente material polimérico hidrófilo. Los materiales poliméricos hidrófilos adecuados incluyen poliácridatos y metacrilatos, por ej., como se suministra por Primer Water Ltd en forma de hidrogeles del propietario, incluyendo poli(ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico) (los poliAMPS) o sales de los mismos (por ej., como se describe en la patente internacional WO 01/96422), polisacáridos por ej., gomas de polisacárido en particular goma xantana (por ej., disponible con la Marca Registrada Keltrol), diversos azúcares, poli(ácidos carboxílicos) (por ej., disponibles con la Marca Registrada Gantrez AN-169 BF de ISP Europa), poli(metil vinil éter co-anhídrido maleico) (por ej., disponible con la Marca Registrada Gantrez AN 139, que tiene un peso molecular en el intervalo 20.000 a 40.000), polivinilpirrolidona (por ej., en forma de calidades comercialmente disponibles conocidas como PVP K-30 y PVP K-90), poli(óxido de etileno) (por ej., disponible con la Marca Registrada Polyox WSR-301), alcohol polivinílico (por ej., disponible con la Marca Registrada Elvanol), polímero poliacrílico reticulado (por ej., disponible con la Marca Registrada Carboxpol EZ-1), celulosas y celulosas modificadas incluyendo hidroxipropilcelulosa (por ej., disponible con la Marca Registrada Klucel EEF), carboximetilcelulosa sódica (por ej., disponible con la Marca Registrada Cellulose Gum 7LF) e hidroxietilcelulosa (por ej., disponible con la Marca Registrada Natrosol 250 LR).

Se pueden usar mezclas de materiales poliméricos hidrófilos en un gel.

En un hidrogel hidratado de material polimérico hidrófilo, el material polimérico hidrófilo está presente deseablemente en una concentración de al menos 1%, preferiblemente al menos 2%, más preferiblemente al menos 5%, posiblemente al menos 10%, en peso basado en el peso total del gel.

Usando un gel que comprende una concentración relativamente alta (al menos 2% en peso) de material polimérico hidrófilo, el gel puede funcionar de manera eficaz en particular para absorber agua en el uso del apósito, por ej., de exudados de suero mientras está en contacto con una herida. Debido a que el gel es un sistema acuoso, el uso del apósito no tiene el efecto de inducir una sequedad total de la herida que no sería deseable. Esto es debido a que la presión de vapor de agua se mantiene en el entorno cerrado que rodea a la piel en el uso del apósito. El gel funciona así como una entidad absorbente para la eliminación de humedad, por ej., exudado de la herida, que también proporciona un nivel de humedad de fondo útil.

La capacidad de absorción de agua de un hidrogel hidratado, incluyendo un gel de alta concentración, permite que el apósito ayude a la curación de la herida por eliminación de cantidades sustanciales de exudados, hinchándose a medida que lo hace. Usando un gel pre-hidratado, cuidadosamente formulado, se evita que la herida alcance un estado de sequedad inútil. La pre-hidratación también asegura la rápida formación de una interfase líquida entre el apósito y la herida, evitando así la adhesión, que de otro modo interferiría con el fácil levantamiento del apósito cuando se tiene que reemplazar. Una buena interfase líquida entre la herida y el apósito es también importante para permitir que los productos antimicrobianos de las enzimas entren en la herida por todas las superficies disponibles.

El gel o cada gel puede contener diversos reactivos, incluyendo uno o más de lo siguiente:

una o más enzimas oxidorreductasa;

una o más enzimas peroxidasa;

sustrato para la enzima oxidorreductasa (que se tiene que discutir a continuación);

una fuente de iones yoduro (que se tiene que discutir a continuación);

glicerol (que actúa como un humectante e hidratante), típicamente en una cantidad hasta 20% en peso del peso del

gel.

En particular, la enzima o las enzimas pueden estar presentes en uno o más hidrogeles hidratados.

Por ejemplo, una de las enzimas, enzima oxidoreductasa o enzima peroxidasa, puede estar presente en un gel, por ej., un gel de material polimérico hidrófilo en alta concentración, acuoso. Como una posibilidad más ambas enzimas pueden estar presentes en un gel, por ej., dicho gel de alta concentración. Una opción más es para que esté presente cada enzima en un gel respectivo, por ej., un gel hidrófilo en alta concentración, acuoso.

Como una posibilidad más, el apósito puede incluir un solo hidrogel hidratado (por ej., de poli AMPS), que no contenga enzimas pero que contenga posiblemente sustrato para la enzima oxidoreductasa (por ej., una fuente de glucosa para glucosa oxidasa), conteniendo adicionalmente o alternativamente un suministro de iones yoduro (por ej., en forma de una o más sales de yoduro) y conteniendo opcionalmente también glicerol.

El gel o cada gel puede estar reticulado. Por ejemplo, el gel puede comprender un gel de alginato, por ej., formado de ácido alginico reticulado de una manera conocida, por ej., mediante el uso de cloruro de calcio. Los geles reticulados forman una matriz biopolimérica de oclusión que puede retener la enzima dentro del gel si el grado de reticulación es suficientemente estrecho, evitando así la liberación de la enzima en la base de la herida en el uso del apósito. El gel puede estar en forma de perlas microencapsuladas, perlas, placas o filamentos extruidos etc.

El hidrogel hidratado, en particular un gel reticulado, puede ser moldeado alrededor de una estructura de refuerzo mecánica, tal como una lámina de gasa de algodón o una malla flexible inerte, por ej., para proporcionar una capa o placa de hidrogel reforzada estructuralmente.

El hidrogel hidratado puede estar alternativamente en forma de un gel no reticulado con comportamiento pseudo-plástico, por ej., de gomas adecuadas tales como goma xantana (por ej., disponible con la Marca Registrada Keltrol), en este caso preferiblemente sin una estructura de refuerzo mecánica. Dichas gomas son líquidas cuando se someten a tensión de cizallamiento (por ej., cuando se están vertiendo o presionando por una tobera) pero se endurecen cuando están estáticas. Así el gel puede estar en forma de un componente que se puede verter, que facilita la producción de geles en el apósito. Dicho gel con comportamiento pseudo-plástico también se puede usar junto con un gel reforzado mecánicamente, preformado, como se discutió anteriormente.

El gel absorbedor de agua puede utilizar una concentración aumentada de sustancia hidrófila, que puede ser el material polimérico formador de gel real, por ej., polisacárido, el mismo o una sustancia adicional añadida a la mezcla para el único fin de absorber agua. Un ejemplo de este tipo de mezcla funcional es el formado por una combinación de alginato reticulado a aproximadamente 2% en peso y goma xantana a aproximadamente 5-10% en peso, basado en el peso total del gel. Una versión favorecida en particular es la de hidrogel polimérico unido mediante enlaces covalentes tal como poliAMPS, que es enormemente absorbedor de agua, pudiendo absorber volúmenes muy grandes de agua o disoluciones acuosas.

La enzima o las enzimas pueden estar presentes en un gel en una serie de formas posibles, incluyendo en disolución como moléculas libres. Para mejorar la eficacia de retención de las enzimas en el gel, las enzimas pueden estar químicamente conjugadas entre sí, químicamente conjugadas a otras moléculas, (por ej., polietilimina) o incorporadas en un soporte sólido tal como perlas.

Se pueden usar juntos geles de diferentes tipos, por ej., alginato reticulado y con comportamiento pseudo-plástico, en un solo apósito. Se han obtenido buenos resultados con un gel con comportamiento pseudo-plástico lo más próximo a la piel, en uso, y un gel reforzado estructuralmente, reticulado, lejos de la piel.

La enzima o las enzimas se pueden inmovilizar de manera que se pueda evitar que sean liberadas a una herida, en el caso de que tuvieran el potencial de provocar respuestas alérgicas indeseables (procediendo en general de fuentes no humanas, por ej., procediendo la glucosa oxidasa más comercialmente disponible del hongo *Aspergillus niger* y extrayéndose típicamente con lactoperoxidasa de leche bovina) y también sería susceptible de degradación por el efecto de las proteasas presentes en una herida.

Una enzima se puede inmovilizar de una manera conocida, por ej., ligándose de manera irreversible a un soporte sólido tal como una partícula, perla o fibra, por ej., de celulosa, sílice, polímero, etc., usando métodos de acoplamiento conocidos para los expertos en la materia. Incorporar una enzima en un gel de alginato reticulado como se discutió anteriormente, por ej., en forma de perlas microencapsuladas, placas o filamentos extruidos, también presenta el efecto de inmovilizar las enzimas. Las técnicas de encapsulación conocidas usando poliamida también son apropiadas.

En realizaciones usando enzima oxidoreductasa y enzima peroxidasa, las dos enzimas se pueden poner en hidrogeles hidratados separados, con la enzima oxidoreductasa situada en un primer gel hidratado y la peroxidasa situada en un segundo gel hidratado. El primer y segundo geles hidratados pueden estar situados en diferentes regiones del apósito como se requiera. El apósito presenta deseablemente una construcción estratificada, dispuesta

en capas, por ej., comprendiendo una capa superior (externa) de un gel y una capa inferior (interna) de otro gel.

Por ejemplo, el primer gel (con enzima oxidoreductasa) se puede situar en la proximidad de partes más externas del apósito, es decir, lejos de la piel en uso, en el caso de que los niveles de oxígeno sean los más elevados, estando situado el segundo gel (con enzima peroxidasa) en la proximidad de las partes internas del apósito, es decir, adyacente a la piel en uso, de manera que las especies antimicrobianas (al menos algunas de las que tienen una vida muy corta debido a su extrema reactividad) producidas de ese modo están cerca de la piel y no se gastan antes de alcanzar el sitio de acción deseado. En este caso el apósito presenta así una construcción estratificada, dispuesta en capas, que comprende una capa superior (externa) del primer gel y una capa inferior (interna) del segundo gel. Sin embargo, los experimentos sugieren que la posición relativa de las dos enzimas no es crítica.

Algunos tipos de apósito incluyen deseablemente una capa de material de barrera en la interfase con la piel en uso, por ej., adyacente al segundo gel (con enzima peroxidasa) en la disposición anterior, para evitar la entrada indeseable al apósito de la catalasa desde la piel, por ej., de fluido de la herida o de los microbios que residen en el área. La entrada de catalasa al apósito es indeseable ya que esta enzima competiría con la peroxidasa para reacción con peróxido de hidrógeno, reduciendo así la eficacia. El material de barrera adecuado incluye, por ej., una lámina o membrana semipermeable con un límite de peso molecular relativamente bajo que es permeable a las especies antimicrobianas producidas por la peroxidasa peroxidativa pero impermeable a la catalasa. Los materiales adecuados son conocidos para los expertos en la materia e incluyen película de acetato de celulosa tal como la usada para fabricar membranas para diálisis con un límite de peso molecular de aproximadamente 15 kD.

Como se mencionó anteriormente, el apósito incluye deseablemente una fuente de sustrato para la enzima oxidoreductasa, por ej., glucosa para glucosa oxidasa. Preferiblemente, la glucosa está en forma de material de calidad farmacéutica, puro. También se puede suministrar glucosa en forma de miel que proporciona de manera natural otros beneficios tales como factores de curación y antimicrobianos. El sustrato se separa deseablemente físicamente de la enzima oxidoreductasa previamente a uso del apósito, para evitar reacción prematura, aunque debido a que se requiere oxígeno para la reacción entonces siempre que el suministro de oxígeno esté limitado sólo puede tener lugar algo de reacción. Esto se discutirá a continuación. El sustrato puede estar contenido dentro de un recinto de un material de membrana semipermeable, por ej., material tal como los usados como membranas para diálisis por ej., acetato de celulosa (que es también conocido con frecuencia como "visking tubing"), o dentro de una placa o almohadilla de gel, por ej., de agarosa. Dicha placa o almohadilla de gel se moldea deseablemente alrededor de una estructura de refuerzo mecánica, tal como una lámina de gasa de algodón, etc., como se discutió anteriormente. El sustrato puede estar de manera conveniente en forma de un gel con comportamiento pseudo-plástico, por ej., de una goma adecuada tal como goma xantana como se discutió anteriormente, preferiblemente sin una estructura de refuerzo mecánica, para producción que se puede verter. El sustrato puede estar presente alternativamente en un gel hidratado, por ej., de material polimérico hidrófilo como se discutió anteriormente. El sustrato, por ej., glucosa está presente típicamente en una cantidad hasta aproximadamente 25% en peso del peso del apósito.

Es útil equilibrar las cantidades relativas de enzima y sustrato de manera que haya un exceso de peróxido de hidrógeno que, aunque menos potente que los productos de acción de la lactoperoxidasa, puedan actuar a una mayor distancia que las especies más reactivas. También se cree que el peróxido de hidrógeno puede estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos en la herida que se recupera (angiogénesis o crecimiento neovascular), estimular la proliferación de nuevas células formadoras de tejido y activar enzimas (proteasas) responsables de ayudar a volver a conformar el nuevo tejido que se desarrolla.

El sustrato, por ej., la glucosa, puede estar presente en diversas formas incluyendo disuelto dentro de una estructura de hidrogel hidratado, presente como un sólido que se disuelve lentamente, o encapsulado dentro de otra estructura para liberación retardada.

En la realización de un apósito de construcción dispuesta en capas, como se mencionó anteriormente, la fuente de sustrato puede estar situada (en el uso del apósito) en medio entre la capa superior de primer gel que contiene enzima oxidoreductasa y la capa inferior de segundo gel que contiene enzima peroxidasa. En este caso, la enzima oxidoreductasa también puede estar incluida opcionalmente en el segundo gel para oxidar el sustrato que es susceptible de difundirse hacia el segundo gel. Dicha oxidación depende de la presencia de oxígeno, que está en suministro restringido en esta posición, siendo la reacción de oxidación proporcional al oxígeno disponible.

En otra disposición alternativa la enzima peroxidasa y el sustrato están presentes los dos en el segundo gel hidratado. En este caso, el primer gel hidratado (con enzima oxidoreductasa) está situado deseablemente antes y/o debajo del segundo gel en una disposición en capas.

Otra opción más es tener una estructura en 4 capas, con una capa superior (lejos de la piel) de primer gel hidratado recubriendo una capa de sustrato que recubre a una capa adicional de primer gel hidratado, recubriendo a su vez una segunda capa de gel hidratado en el fondo (adyacente a la piel en uso).

Proporcionar un exceso de sustrato, para que el apósito pueda funcionar en el uso para generar especies

antimicrobianas durante un periodo de tiempo prolongado, típicamente al menos 2 días, en el caso de que el gel o los geles hidratados que contienen sustrato se formulen para retardar el flujo de sustrato a las enzimas, por ej., por unión de hidrógeno extensa para impedir la difusión por o desde el hidrogel en que se suministraron de manera original.

- 5 La eficacia antimicrobiana del sistema se puede mejorar además por la inclusión de iones yoduro, que se pueden oxidar a yodo elemental (que es un potente agente antimicrobiano conocido, por ej., como se discutió en la patente internacional WO 01/28600) por la acción de peróxido de hidrógeno, con o sin efecto catalítico. Así, el apósito incluye deseablemente un suministro de iones yoduro, por ej., yoduro de potasio o yoduro de sodio. Como el yodo es también relativamente tóxico para las células huésped en la herida (por ej., células epiteliales, queratinocitos, glóbulos blancos) puede no ser ventajoso generar yodo de manera continua en una alta concentración durante todo el tiempo en que la formulación está en uso en contacto con la piel. Así, en una realización preferida, el suministro de iones yoduro, por ej., sal de yoduro, se proporciona en una forma de liberación relativamente rápida, en el gel de sustrato o en una membrana o gasa adicional u otra capa adecuada. De esta manera, el peróxido de hidrógeno producido inicialmente, en una primera fase de actividad, se consume sustancialmente en una reacción generadora de yodo, exponiendo la piel (por ej., herida) a un aumento repentino de yodo, la duración de la cual se puede controlar por la cantidad, velocidad de liberación y posición del suministro de yoduro. Dicho aumento repentino de yodo puede ser muy útil para librarse rápidamente una herida de una carga microbiana, y su relativamente corta duración permite la curación minimizando el daño a las células que crecen y su actividad reparadora. Una vez que se ha consumido el yoduro, el sistema vuelve automáticamente, en una fase posterior de actividad, a la producción de peróxido de hidrógeno y especies de oxígeno reactivas relacionadas (ROS, por sus siglas en inglés), que mantiene la esterilidad y destruye las bacterias invasoras cerca de la piel, por ej., superficie de la herida. En otras realizaciones, sin embargo, se puede desear para la fuente de iones yoduro que sea tal como para proporcionar, en uso, un flujo sostenido de yodo (y/o ácido hipoyodoso) para la liberación en una herida, además (y en proporción) de peróxido de hidrógeno. El suministro de yoduro puede estar alternativamente situado con la fuente de sustrato para la enzima oxidorreductasa, como se discutió anteriormente, por ej., en un gel hidratado. El yoduro puede estar presente en diversas formas, incluyendo disuelto dentro de una estructura de gel hidratado, presente como un sólido que se disuelve lentamente o encapsulado dentro de otra estructura para liberación lenta. La sal de yoduro puede estar presente, por ej., en una cantidad hasta aproximadamente 2% en peso. Sin embargo, incluso en ausencia de yoduro, se forman aún compuestos intermedios activos antimicrobianos, como se discutió anteriormente.
- 30 En realizaciones en que la enzima o las enzimas no están presentes en uno o más geles hidratados, la enzima o las enzimas están unidas de manera conveniente de manera irreversible a un portador o soporte inerte. El soporte comprende convenientemente una gasa por ej., de material tejido tal como algodón u alguna otra forma apropiada de celulosa, etc. El soporte se puede activar de una manera conocida a fin de que se pueda hacer reaccionar con proteína (enzima) para formar enlaces imina estables, a fin de que se retenga la enzima en el soporte. La enzima unida se puede recubrir opcionalmente con un agente conservante, por ej., alcohol polivinílico (PVA) por ej., a 5%, sacarosa por ej., a 10%, gelatina por ej., a 2% y/o glicerol, para ayudar a mantener la actividad enzimática. El apósito se diseña de manera que la enzima o las enzimas estén presentes en el apósito en estado hidratado.

40 Los geles reticulados mediante enlaces covalentes tales como poliAMPS se pueden fabricar fácilmente para excluir moléculas de enzima al tiempo que son permeables a peróxido de hidrógeno y yodo. En geles de esta naturaleza la enzima o las enzimas se pueden incorporar dosificándolas sobre la superficie superior de un hidrogel que contiene sustrato como una disolución acuosa, y dejando que el líquido se remoje en el gel. Aunque el agua penetra en el gel, las moléculas de enzima son retenidas en la superficie superior. Si la disolución enzimática contiene PVA (por ej., 6% p/v), la mezcla enzima/PVA forma una membrana hidratada delgada ya que el agua se derrama en el gel. Además, la matriz de PVA estabiliza la enzima con que se asocia.

- 45 Se ha encontrado que los apósitos según la invención actúan como transportadores eficaces de oxígeno desde la atmósfera del ambiente a un sitio de la herida, que presenta beneficios para la curación de la herida. En particular, la tasa de oxígeno transportado por un apósito según la invención es mayor que el de un apósito similar sin enzima oxidorreductasa. La razón para esto, y los beneficios resultantes, se describen a continuación.

50 Cuando se aplica un apósito convencional a la superficie de una herida, el suministro de oxígeno de la atmósfera se inhibe en general y la herida llega a estar relativamente privada de oxígeno (hipóxica o incluso anóxica). La hipoxia o, peor, la anoxia son condiciones encontradas con frecuencia que se sabe que son muy malas para la curación de la herida, debido a que las células responsables de la curación (queratinocitos y células epiteliales) y los leucocitos que combaten la infección y controlan el procedimiento, requieren todos oxígeno si tienen que desarrollarse. Los leucocitos fagocíticos requieren abundante oxígeno si tienen que hacer funcionar su bioquímica "estallido respiratorio", con que destruyen las bacterias. El colágeno es esencial para reconstruir los tejidos dañados, y para crear nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), que requieren fibras de colágeno en que construir paredes capilares. La síntesis de colágeno sólo puede tener lugar cuando las enzimas hidroxilasa pueden hidroxilar lisina y prolina, para proporcionar hidroxil-lisina e hidroxil-prolina, ambas esenciales para construir bloques de colágeno. Las enzimas hidroxilasa requieren un abundante suministro de oxígeno para su funcionamiento eficaz. Por estas razones, se reconoce extensamente que las heridas deben estar bien oxigenadas si tienen que curar con eficacia, y

con frecuencia se reivindica que el suministro de oxígeno puede ser el factor limitante de la velocidad en la curación de la herida. Se cree que un fracaso en la curación está ocasionado con frecuencia por carencia del oxígeno adecuado. Por otra parte, una alta tensión de oxígeno en una herida inhibe el crecimiento de bacterias anaerobias patógenas, que también son responsables de la producción de mal olor.

- 5 Por estas razones, ciertos apósitos secundarios, tales como Tegaderm de 3M Healthcare Ltd u OpSite de Smith & Nephew (Tegaderm y OpSite son Marcas Registradas), se fabrican de película de poliuretano delgada recubierta en un lado con una capa adhesiva. Estos se comercializan como que son relativamente permeables a oxígeno (y vapor de agua), debido a su particular estructura molecular y sección transversal delgada. Esto es un efecto puramente pasivo, y la eficacia de permeación de oxígeno está inversamente relacionada con el espesor de la película.
- 10 Los hidrogeles no son muy permeables a oxígeno, debido a que están constituidos principalmente por agua, y el oxígeno no es muy soluble en agua. Esta permeabilidad a oxígeno también estará inversamente relacionada al espesor del apósito. Hasta la aparición de esta invención, la única manera de aumentar el nivel de oxígeno en una herida era administrar oxígeno al paciente, aumentando la cantidad en la sangre (por ej., causando que el paciente respire aire enriquecido en oxígeno o poniendo al paciente en un entorno de oxígeno hiperbárico tal como el disponible en una cámara de compresión), o aplicando oxígeno gaseoso a la misma herida.

- 15 Como se indicó anteriormente, los apósitos según la invención presentan la capacidad de manera eficaz para transportar oxígeno desde la atmósfera ambiente fuera de la herida, en la base de la herida, especialmente en los casos en que el apósito incluye una capa de enzima oxidorreductasa, por ej., glucosa oxidasa, en la superficie externa, en contacto con la atmósfera ambiente. El oxígeno de la atmósfera ambiente se convierte en peróxido de hidrógeno (catalizado por la enzima oxidorreductasa). El peróxido de hidrógeno es mucho más soluble en agua que el oxígeno molecular, así que el transporte de peróxido de hidrógeno por el apósito (típicamente por uno o más hidrogeles hidratados) es en general mucho más eficaz y rápido que el de oxígeno molecular. El peróxido de hidrógeno se difunde así rápidamente por el apósito. Cuando el peróxido de hidrógeno encuentra catalasa (que está presente de manera natural en una herida, o que puede estar incluida como un componente del apósito), se descompone a oxígeno y agua. De esta manera, el oxígeno es transportado por el apósito en forma de peróxido de hidrógeno mucho más eficazmente que el transporte de oxígeno molecular. Los experimentos han mostrado que la velocidad de transporte de oxígeno puede ser más del doble en los apósitos según la invención cuando se compara con apósitos similares sin enzima oxidorreductasa. Los niveles de oxígeno aumentados resultantes potencian el proceso de curación, como se describió anteriormente.
- 20 El apósito incluye de manera conveniente, o se usa con, una cubierta o capa externa para adherir el apósito a la piel de un ser humano o sujeto animal (de una manera conocida). Al menos parte de la cubierta debería ser de material permeable al oxígeno para permitir que el oxígeno de aire ambiental pase por la cubierta y entre en el cuerpo del apósito en uso, en el caso de que se requiera como cosustrato de la reacción catalizada por oxidorreductasa. El material permeable al oxígeno puede estar en forma de una "ventana" endurecida en una cubierta relativamente impermeable al oxígeno de otro modo, por ej., de material posiblemente más robusto.

Opcionalmente la cubierta incluye una ventana (o ventana adicional) en o por la que se pueden ver medios indicadores por ej., una lámina indicadora o estructura similar que indica (por ej., por cambio de color) cuándo la química del apósito está activa. Se puede proporcionar opcionalmente un indicador adicional, que indica (por ej., por cambio de color) cuándo se ha agotado la química del apósito.

- 30 Una opción útil adicional es proporcionar enzima catalasa inmovilizada en la superficie interna de la cubierta (por ej., asegurada a adhesivo de la misma). Esto funcionará rápidamente para descomponer el peróxido de hidrógeno en exceso que pueda escapar de un área de la herida. Esta característica evitará potencialmente la acumulación dañina de peróxido de hidrógeno en áreas de piel no dañada, normal.

- 35 El apósito es suministrado como un sistema multiparte, con diferentes elementos envasados por separado, para montaje y uso por un usuario final según las instrucciones suministradas. En particular, en las realizaciones que incluyen una fuente de sustrato, por ej., glucosa, esto se puede suministrar envasado por separado de otros componentes, en particular la enzima oxidorreductasa, para evitar reacción de oxidación prematura. Alternativamente, el apósito se puede plegar. Una realización típica de esta clase comprende una disposición lineal de placas o paneles unidos incluyendo una placa del primer gel hidratado, una placa del segundo gel hidratado y una placa de sustrato, con placas adyacentes unidas por una respectiva porción de bisagra. El material barrera hidrófobo, por ej., una cera, se impregna deseablemente en las porciones de bisagra para evitar difusión lateral. Se han obtenido buenos resultados con una realización que comprende, secuencialmente, una placa de sustrato, una placa de segundo hidrogel hidratado (que contiene enzima peroxidasa) y una placa de primer hidrogel hidratado (que contiene enzima oxidorreductasa), con placas adyacentes unidas por una respectiva porción de bisagra que se puede plegar. Para preparar dicho apósito para uso se pliegan las dos placas externas, para llevar la placa de sustrato de manera que se recubra la placa de segundo gel y se lleve la placa de primer gel de manera que se recubra la placa de sustrato, formándose así una disposición de capas como se describió anteriormente. La disposición de capas resultante se pone sobre la piel por ej., sobre una herida, con la placa de segundo gel en

contacto con la piel, y se puede mantener en su lugar por ej., mediante el uso de una cubierta adhesiva.

Uno o más componentes del apósito pueden estar contenidos dentro de un recinto tal como un sobrecito o bolsa de material de barrera que es permeable a oxígeno, agua y peróxido de hidrógeno pero que evita migración no deseada de materiales. Dicho recinto tiene el efecto, entre otros, de evitar posiblemente sustancias interferentes tales como catalasa, iones hierro etc. que se acumulan en el apósito de un sitio de la herida. El recinto también puede evitar migración no deseada de enzima(s) a una herida. El material de barrera adecuado incluye por ej., una lámina o membrana semipermeable por ej., de acetato de celulosa o éster de celulosa, tal como una que es permeable sólo a moléculas de peso molecular menor que, digamos, 350 Da (posiblemente con un límite de peso molecular nominal de 500 Da pero con un límite real menor que 350 Da). Las membranas adecuadas incluyen membrana de acetato de celulosa código Z368024 suministrada por Sigma, membrana de éster de celulosa Spectrum SpectraPor código 131054 suministrada por NBS Biologicals y, favorecido en la actualidad en particular para un apósito anti-acné, poliuretano, por ej., película de Tegaderm de 3M. (Spectrum, SpectraPor y Tegaderm son Marcas Registradas).

Los componentes absorbedores de agua del apósito se pueden aplicar fácilmente a la herida o sitio de infección, especialmente cuando se formulan en una forma que se puede trabajar o que puede fluir. Hay muchas formulaciones posibles que consiguen este efecto, y éstas se pueden determinar fácilmente por simple experimentación. Dichas formulaciones se pueden aplicar con particular facilidad y conveniencia de tubos compresibles o tubos de tipo jeringa (con un pistón) con una tobera de aproximadamente 3 mm de diámetro. Puede ser especialmente útil suministrar los componentes en un simple montaje de dos o más tubos, como se requiera por la formulación particular en uso, de manera que la mezcla deseada de geles puede ser expulsada en un sitio particular en una sola acción. Dichas disposiciones de tubos múltiples son conocidas y usadas con frecuencia en la industria para otras aplicaciones. Esta disposición satisface perfectamente y de manera conveniente la necesidad de mantener los geles aparte entre sí hasta el momento de uso. También se ha encontrado que se puede aplicar uno o más de los componentes de un contenedor presurizado, de manera que se aplica el gel como una espuma, pulverización o incluso un aerosol. Dentro de las directrices proporcionadas en la presente memoria, la formulación que proporciona las propiedades físicas particulares (viscosidad, etc.) requeridas para este modo de suministro se puede determinar fácilmente por simple experimentación. Se pueden usar geles de plástico que se pueden trabajar de tubos o geles de suministro presurizado junto con placas estructuradas para proporcionar un montaje apropiado de los ingredientes básicos.

Los apósitos de construcción de capas que comprenden geles con comportamiento pseudo-plástico pueden ser producidos fácilmente, por ej., por un usuario final, vertiendo o dejando caer los geles uno en la parte de arriba del otro en orden apropiado para producir un montaje de capas deseado de los geles. Así los diferentes geles de componente del apósito se pueden suministrar en contenedores separados por ej., tubos o frascos o posiblemente un recipiente multi-compartimento. Los diferentes geles pueden ser de color codificado con látex coloreado de manera apropiada para facilidad de identificación. Los geles pueden ser aplicados directamente a la piel de un usuario. Una cubierta o capa externa puede no ser requerida con dichas realizaciones.

Los apósitos según la invención (o componentes de los mismos) se suministran convenientemente en envases impermeables al agua, sellados, estériles, por ej., sacos de hoja de aluminio laminada.

Los apósitos según la invención se pueden fabricar en una serie de diferentes tamaños y formas para tratamiento de áreas de la piel por ej., heridas de diferentes tamaños y formas. Las cantidades apropiadas de enzimas, y sustratos y yoduro si están presentes, para un apósito particular se pueden determinar fácilmente mediante experimento.

La invención se describirá además, como ilustración en los siguientes Ejemplos y con referencia a los dibujos adjuntos, en que:

Las Figuras 1 a 6 son ilustraciones de sección esquemáticas de 6 diferentes realizaciones de apósitos según la invención.

Descripción detallada de las realizaciones.

Con referencia a los dibujos, las Figuras 1 a 4 ilustran de manera esquemática diversas realizaciones diferentes de apósitos según la invención. En todos estos dibujos, un elemento cruzado representa un sobrecito de membrana semi-permeable por ej., acetato de celulosa o placa de gel que contiene una disolución acuosa de glucosa y yoduro de potasio; un elemento con líneas rayadas en negrita que se extiende desde arriba a la izquierda a abajo a la derecha representa una placa de hidrogel hidratado que contiene glucosa oxidasa incluida en el gel y un elemento con líneas rayadas en negrita que se extiende desde arriba a la derecha a abajo a la izquierda representa una placa de hidrogel hidratado que contiene lactoperoxidasa incluida en el gel.

Los círculos rellenos representan perlas microencapsuladas de gel de alginato (típicamente aproximadamente 2 mm de diámetro) que contienen glucosa oxidasa incluida. Alternativamente se podían formar otros geles (por ej., agarosa) o polímeros para formar las perlas microencapsuladas. La glucosa se puede difundir en estas perlas microencapsuladas y se puede difundir peróxido de hidrógeno fuera.

Los círculos vacíos representan perlas microencapsuladas de gel de alginato (típicamente aproximadamente 2 mm de diámetro) que contienen lactoperoxidasa incluida. Alternativamente se podían usar otros geles (por ej., agarosa) o polímeros para formar las perlas microencapsuladas. El peróxido de hidrógeno se puede difundir a estas perlas microencapsuladas y se pueden difundir especies de oxígeno reactivo fuera.

- 5 Los círculos sombreados representan perlas microencapsuladas de gel de alginato (típicamente aproximadamente 2 mm de diámetro) que contienen glucosa incluida y yoduro de potasio. Alternativamente, se podían usar otros geles (por ej., agarosa) o polímeros para formar las perlas microencapsuladas. La glucosa se puede difundir fuera de estas perlas microencapsuladas.

10 La Figura 1 ilustra una realización preferida de apósito según la invención. El apósito es de construcción dispuesta en capas y comprende una capa externa o cubierta 10 en forma de una tira auto-adhesiva permeable al oxígeno, adecuada para adherirse a la piel 12 de un individuo, a fin de que cubra una herida 14. La cubierta 10 encierra una capa superior que comprende una primera almohadilla 16 húmeda con glucosa oxidasa inmovilizada, una capa intermedia que comprende una disolución de glucosa y yoduro de potasio en un sobrecito o placa 18 de gel semi-permeable y una capa inferior que comprende una segunda almohadilla 20 húmeda con lactoperoxidasa inmovilizada. Debajo de la almohadilla 20 hay una lámina 22 de gasa, para contacto con la herida 14. Las almohadillas y el sobrecito pueden ser en general como se describe a continuación.

El apósito se suministra inicialmente como un sistema multiparte, con los componentes individuales envasados por separado en envases estériles, sellados, respectivos. Cuando se requieren para uso, los componentes del apósito se retiran de los envases y se aplican a una herida de manera apropiada y para producir el apósito final como se muestra.

La Figura 2 ilustra otra realización preferida de apósito, en general similar a la Figura 1, identificándose componentes similares mediante números de referencia similares. En esta realización, la capa superior comprende una primera almohadilla 24 húmeda con perlas de alginato de calcio que contienen glucosa oxidasa incluida. La capa intermedia comprende una almohadilla 26 con perlas de gel que contienen glucosa y yoduro de potasio. La capa inferior comprende una segunda almohadilla 28 húmeda con perlas de alginato de calcio que contienen lactoperoxidasa incluida.

La Figura 3 ilustra una realización similar en general adicional, pero que comprende una capa superior en forma de una almohadilla 30 con perlas de gel que contienen glucosa y yoduro de potasio, y una capa inferior que comprende una almohadilla 32 húmeda (o placa de gel) con perlas de alginato de calcio que contienen glucosa oxidasa incluida y perlas de alginato de calcio que contienen lactoperoxidasa incluida.

La Figura 4 es una variante de la Figura 3 en que la capa superior comprende un sobrecito o placa 34 de gel semi-permeable que contiene glucosa y yoduro de potasio.

Ejemplos

Construcción de perlas microencapsuladas de glucosa oxidasa y lactoperoxidasa.

35 La enzima, lactoperoxidasa (LPO) (de Sigma, cat nº L2005) o glucosa oxidasa (GOX) (de Boehringer Mannheim, Cat Nº 105147) se disuelve en agua pura a la velocidad de 1 microgramo por ml (LPO) o 10 microgramos por ml (GOX). Se prepara una disolución de ácido algínico (Manucol DM (Manucol DM es una Marca Registrada) de C P Kelco) (1 gramo por 100 ml de agua) a temperatura elevada y se enfría. Se mezcla disolución enzimática con el ácido algínico enfriado a la velocidad apropiada. La disolución de ácido algínico/enzima resultante se bombea después por una bomba peristáltica a un tubo que conduce a una tobera de salida formada de manera conveniente mediante una pipeta pasteur de vidrio de laboratorio clásica, colocada en un baño de endurecimiento de disolución de cloruro de calcio (10% p/v). El flujo de la bomba y la altura de la tobera de salida se endurecen a fin de que la corriente que sale de ácido algínico/disolución enzimática forme gotitas discretas a medida que entra en la disolución de cloruro de calcio. Cada gotita empieza rápidamente a solidificar a medida que el calcio empieza a reticular las moléculas de ácido algínico y, 10 minutos después del suministro de la última gotita, se completa el proceso de endurecimiento. Se retiran todas las perlas microencapsuladas recién formadas de la disolución de cloruro de calcio vertiendo el total por un tamiz de tamaño de malla adecuado. Se retira el cloruro de calcio residual enjuagando con agua pura. Las perlas microencapsuladas se almacenan en agua o en contenedores impermeables al agua, o en una disolución tampón fisiológica tal como disolución salina tamponada de fosfato. Alternativamente, se pueden poner en glicerol o disoluciones de glicerol en agua para disminuir el contenido en agua ocluida. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que se usen, no deben permitir que se sequen o endurezcan en ausencia de agua o glicerol.

Construcción de perlas microencapsuladas de glucosa.

Se sigue el método descrito anteriormente, excepto que no se añaden enzimas y se incluye glucosa a la velocidad de 12,5 g por 100 ml tanto en agua pura como en el baño de endurecimiento de cloruro de calcio. Las perlas de gel microencapsuladas se lavan con disolución de glucosa sin calcio, permitiendo la eliminación de calcio en exceso sin

agotar la glucosa.

Preparación de una almohadilla que contiene perlas microencapsuladas de enzimas.

5 Se pone fibra de algodón de tamaño especificado de manera apropiada en una superficie adecuada por la que puede fluir agua (por ej., una malla de plástico plana). Se vierte una suspensión de perlas microencapsuladas de enzimas sobre la fibra de algodón, de tal manera que las perlas microencapsuladas llegan a estar incluidas en las irregularidades del género, a medida que fluye fuera el agua en suspensión. Un segundo trozo de fibra se pone después sobre el primero, a fin de intercalar las perlas microencapsuladas de enzimas entre las dos capas de género. Se puede usar adhesivo o puntadas o grapado para asegurar la capa superior a la capa del fondo. Se drena el fluido en exceso, pero no se deja que se seque la almohadilla.

10 El número de perlas microencapsuladas contenidas por almohadilla se debería determinar sobre la base de que cada almohadilla de oxidasa debería soportar aproximadamente 100 mg de GOX, y cada almohadilla de peroxidasa debería soportar aproximadamente 10 mg de LPO.

Preparación de una almohadilla que contiene perlas microencapsuladas de glucosa y yoduro.

15 El método descrito anteriormente se usa con perlas microencapsuladas que contienen glucosa para preparar una almohadilla que contiene glucosa incluida, excepto que se incluye una etapa extra al final del procedimiento, en que la almohadilla se remoja en una disolución de yoduro de potasio (10 mM).

Preparación de un sobrecito que contiene glucosa/yoduro.

20 Se disuelve glucosa en una disolución acuosa 5 mM de yoduro de potasio a la velocidad de 12,5 g por 100 ml. Esta disolución se pone después en una bolsa de diálisis (previamente colocada en agua hirviendo durante 10 min y se enjuaga a fondo) con un área accesible de aproximadamente 40x20 mm, y se sella.

Demostración de la actividad oxidativa de un apósito de material compuesto montado.

25 Se prepara una disolución acuosa al 1% de agarosa, con yoduro de potasio añadido en una concentración de 10 mM y almidón soluble a concentración de 1% p/v. Se funde la disolución y se dispensa en una placa petri para formar una capa continua de aproximadamente 5 mm de espesor, y se dejó endurecer. Una vez endurecido se pone una almohadilla de peroxidasa como se describió anteriormente sobre la superficie, seguido por una almohadilla o sobrecito de glucosa como se describió anteriormente puesta en la parte de arriba de eso, y finalmente se pone una almohadilla de glucosa oxidasa como se describió anteriormente en la parte de arriba de las dos para formar una pila de tres capas. El desarrollo de un color azul dentro del agar de almidón indica la actividad oxidativa del apósito de material compuesto.

30 Uso del apósito de material compuesto montado como un tratamiento de heridas.

Las almohadillas o los sobrecitos preparados para este fin como se describió anteriormente se sellan en sacos apropiados y se someten a irradiación gamma para asegurar esterilidad microbiológica, usando técnicas conocidas y usadas de manera rutinaria en la industria.

35 Primero se cubre la herida mediante una lámina delgada de gasa estéril. A continuación se añaden las tres capas de almohadillas estériles como una pila delgada, con la almohadilla de peroxidasa primero seguido por la almohadilla o sobrecito de glucosa a continuación y la almohadilla de glucosa oxidasa por último. Las almohadillas se cortan a un tamaño que justo cubra la herida abierta. Finalmente, el apósito de material compuesto se soporta preferiblemente en el sitio mediante película adhesiva, tal como "tirita" normal o cinta quirúrgica "Micropore".

Otras realizaciones.

40 Las enzimas se pueden inmovilizar sobre diversos tipos de partícula o fibra, usando métodos de acoplamiento conocidos por los expertos en la materia. Las partículas se pueden fabricar de celulosa, sílice o diversos polímeros inofensivos. Se puede usar alginato en formas distintas de perlas microencapsuladas, tales como placas o filamentos extruidos, aún usando calcio como agente de endurecimiento. Se pueden usar microcápsulas, tales como las fabricadas por técnicas conocidas con poliamida, para encapsular cada uno de los componentes.

45 Se prepararon componentes de apósitos adicionales como sigue.

Preparación de una almohadilla que contiene enzima.

50 Se corta gasa de algodón de tejido, holgada, en una serie de trozos de aproximadamente 100 mm por 100 mm y se pone cada trozo en un respectivo contenedor de fondo plano adecuado. Se prepara ácido alginico al 1% p/v (también denominado "alginato"; por ej., Manucol DM (Manucol DM es una Marca Registrada), de CP Kelco) por disolución del gel en una disolución acuosa calentada, apropiada. Después de enfriamiento, se añade enzima al

alginato, para proporcionar una concentración final de 5 µg/ml de glucosa oxidasa (GOX, de Boehringer Mannheim, cat. n°: 105147) o 10 µg/ml de lactoperoxidasa (LPO, de Sigma, cat. n°: L2005). Se preparan 10 ml de cada disolución de enzima-alginato, y se vierten uniformemente sobre las almohadillas de gasa de algodón individuales. El gel se endurece por adición de exceso de cloruro de calcio (CaCl_2) al 10% p/v y se deja reposar durante 10 minutos.

5 Las almohadillas se lavan después dos veces durante 5 minutos cada una, en agua destilada/desionizada en exceso para retirar el CaCl_2 . Las almohadillas se pueden almacenar después en un entorno húmedo para evitar el secado.

Preparación de almohadilla que contiene glucosa.

Se corta gasa de algodón de tejido, holgada, a aproximadamente 100 mm por 100 mm y se pone en un contenedor de fondo plano adecuado. Se disuelve agarosa al 1% p/v y glucosa al 40% p/v en una disolución acuosa apropiada y se vierte sobre la gasa mientras está aún fundido. Se deja endurecer el gel por enfriamiento. La almohadilla de gel se puede almacenar después en un entorno húmedo para evitar el secado. Para producir una almohadilla que contiene glucosa y yoduro de potasio, se sigue un procedimiento similar, pero después de que se haya disuelto la glucosa y agarosa, se añade yoduro de potasio (KI) a una concentración final de 10 mM. Después se puede verter la disolución, se deja endurecer y se almacena como anteriormente.

15 Demostración de las propiedades antimicrobianas de un apósito de material compuesto montado.

Ejemplo 1

Usando prácticas clásicas, se prepara una placa de crecimiento microbiano de agarosa al 1,5%, pero con la glucosa reemplazada por fructosa como la única fuente de carbono. Las placas están típicamente en la región de 5 mm de espesor. Se extendió *Pseudomonas aeruginosa* por la superficie de la placa en un "césped" uniforme. Una almohadilla que contiene LPO-alginato (preparada como se describió inmediatamente antes) de aproximadamente 20 mm² se puso sobre la superficie de la placa. Colocada directamente sobre esta almohadilla está una almohadilla de 20 mm² que contiene glucosa-agar (preparada como se describió inmediatamente antes) (con o sin KI). Finalmente, se estratificó una almohadilla de 20 mm² que contenía GOX-alginato (preparada como se describió inmediatamente antes) sobre la almohadilla de glucosa-agar. Se puede observar claramente una zona de margen alrededor de la pila de almohadillas después de 24 horas, mostrando la producción y difusión de especies antimicrobianas activas, evitando el crecimiento de las bacterias aplicadas. La eliminación de una cualquiera de las 3 almohadillas (experimentos de control) no da como resultado una zona de margen alrededor de la pila de almohadillas, mostrando que tanto toda la enzima como la glucosa necesitan estar presentes para que la cascada progrese de manera eficaz.

Ejemplo 2

Alternativamente, para mostrar la producción de especies oxidativas reactivas vía el sistema enzimático apilado, se moldea una placa de agar al 1% p/v, que incluye almidón soluble al 1% (por ej., ARCOS cat. n°: 177132500) y KI 10 mM. Se deja endurecer la placa por enfriamiento. Se puede apilar después la almohadilla de LPO-alginato, seguido por la almohadilla de glucosa-agar y finalmente la almohadilla de GOX-alginato como se describió anteriormente en el Ejemplo 1. La producción de las especies oxidativas reactivas se puede visualizar después por el cromógeno coloreado de azul intenso producido por la interacción bien documentada de yodo elemental (la especie oxidativa oxida el yoduro a yodo) y almidón. Esta coloración se puede ver claramente después de 5 minutos, con la intensidad y extensión formada con el tiempo. Después de 30 minutos, la intensidad del color formada llega a ser un azul intenso, indicando formación de producto continuada. Esto muestra que se producen ambas especies oxidativas reactivas y yodo, ambas ayudan a la actividad antimicrobiana del apósito de material compuesto.

Ejemplo 3

Una variación en el Ejemplo 2 es para incluir un bajo nivel de GOX (0,25 µg/ml) en la almohadilla de LPO-alginato, para favorecer una producción inicial de especies oxidativas reactivas. Esto utiliza el oxígeno disponible en el gel, y se inicia por la glucosa que se difunde en la almohadilla de LPO-alginato. Esta reacción está limitada, debido a la disponibilidad de oxígeno y cesará cuando se agote el oxígeno. Para mostrar la producción de especies oxidativas reactivas vía el sistema enzimático apilado, se moldea una placa de agar al 1% p/v, que incluye almidón soluble al 1% (por ej., ARCOS cat. n°: 177132500) y KI 10 mM. Se deja endurecer la placa por enfriamiento. La almohadilla combinada de LPO y GOX-alginato, seguido por la almohadilla de glucosa-agar y finalmente la almohadilla de GOX-alginato se pueden apilar después como se describió anteriormente. La producción acelerada de las especies oxidativas reactivas se puede visualizar después por el cromógeno coloreado de azul intenso producido por la interacción bien documentada de yodo elemental (la especie oxidativa oxida el yoduro a yodo) y almidón. Esta coloración se puede ver claramente después de tan poco como 1 minuto, con la intensidad y extensión formadas con el tiempo. La coloración se reducirá perceptiblemente después de 15 minutos si no se usa la almohadilla de GOX-alginato de arriba. Si se usa la almohadilla de GOX-alginato como se describió anteriormente, la coloración continuará fuertemente, como se ve en el Ejemplo 2 anteriormente. Después de 30 minutos, la intensidad del color se ha formado para convertirse en un azul intenso, indicando formación de producto continuada. Esto muestra que se producen ambas especie oxidativa reactiva y yodo, las dos de las cuales ayudan a la actividad antimicrobiana del

apósito de material compuesto.

Se realizó trabajo adicional usando geles de goma xantana de concentración relativamente alta.

Preparación de geles de goma xantana/alginato que contienen enzima.

- 5 Se preparó una serie de disoluciones de goma xantana (Keltrol) a diferentes concentraciones (5%, 10% y 20% en peso) por disolución de las cantidades apropiadas de Keltrol en agua destilada/desionizada a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C). También se preparó una serie de disoluciones de ácido algínico (Manucol DM (Manucol DM es una Marca Registrada) de CP Kelco) a diferentes concentraciones (2% y 4% en peso) por disolución de las cantidades apropiadas de Manucol DM en agua destilada/desionizada a temperatura elevada apropiada. Se enfriaron las disoluciones de ácido algínico resultantes.
- 10 Se preparó una serie de geles de goma xantana/alginato incluyendo los dos materiales en diferentes proporciones mezclando las disoluciones en cantidades apropiadas hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. Por ejemplo, se prepararon geles con una relación en peso de goma xantana a alginato de 5:1 (por ej., mezclando cantidades iguales de disoluciones al 5% y 1 % o disoluciones al 10% y 2%), 5:2, 10:1, etc., como se requiera.
- 15 Se prepararon geles que contenían enzimas por adición de la cantidad apropiada de enzimas glucosa oxidasa (GOX) o lactoperoxidasa (LPO) a las muestras de gel. Se puede añadir disolución enzimática a una disolución de goma xantana o alginato previamente a mezcla, o un gel de goma xantana/alginato después de mezcla. Se realizaron experimentos usando LPO de Sigma, (catálogo número L2005) disuelto en agua pura a la velocidad de 1 microgramo por mililitro y GOX de Boehringer Mannheim (catálogo número 105147) disuelto en agua pura a la velocidad de 10 microgramos por mililitro.
- 20 Construcción de almohadillas de gel de goma xantana/alginato reticulado soportado por gasa de algodón.
- 25 Se preparó una mezcla de gel de goma xantana al 10% ácido algínico al 2% mezclando volúmenes iguales de disolución stock de goma xantana al 20% y disolución de ácido algínico al 4%, preparada como se describió anteriormente. Se añadió LPO y GOX para separar muestras de esta mezcla de gel para producir un gel que contiene LPO y un gel que contiene GOX. Se pueden variar los niveles de enzima según el nivel de actividad requerido. En este caso los niveles de enzima usados fueron 100 µg/ml para LPO y 50 µg/ml para GOX.
- 30 Se alisaron aproximadamente 5 ml del gel que contenía LPO sobre una tira de gasa de algodón de aproximadamente 40 mm x 50 mm. Se puso una segunda capa de gasa de tamaño similar se puso en la parte de arriba del gel de LPO con ligera presión para asegurar una distribución uniforme del gel. Se dispensaron después aproximadamente 5 ml del gel que contenía GOX sobre la cara superior de la segunda capa de gasa de algodón, con una tercera capa de gasa de tamaño similar aplicada en la parte de arriba del gel que contiene GOX, de nuevo con ligera presión para asegurar una distribución uniforme del gel que contiene GOX. Esto produjo una almohadilla o placa de construcción de sándwich que comprendía tres láminas de gasa de algodón separadas, respectivamente, por una capa de gel que contiene LPO y una capa de gel que contiene GOX.
- 35 Se pusieron las almohadillas resultantes en un baño de disolución de cloruro de calcio (10% p/v) durante 10 minutos. Se retiraron las almohadillas del baño y después se lavó para retirar cloruro de calcio residual mediante dos lavados de 10 minutos en agua destilada/desionizada. Se retiró el agua en exceso por secado de las almohadillas durante varios minutos en tejido absorbente.

Demostración de la actividad de la almohadilla de gel de goma xantana/alginato reticulado.

Ejemplo 4

- 40 Se usó la reacción de complejo almidón/yodo para visualizar la producción enzimática de especies oxidativas reactivas (ROS) desde dentro de la almohadilla de gel de goma xantana/alginato reticulado, preparada como se describió previamente. En presencia de ROS, se oxida yoduro para producir yodo elemental, que se compleja con almidón para producir un cromógeno azul intenso.
- 45 Se realizaron experimentos usando una placa de agar al 1% p/v incluyendo almidón soluble al 1% (ARCOS catálogo número 177132500) y yoduro de potasio 10 mM. Se puso una porción de la almohadilla de goma xantana/alginato reticulado como se describió anteriormente (aproximadamente 20 mm x 10 mm x 4 mm) sobre la placa de almidón/yoduro, con la capa de GOX más elevada. En la parte de arriba de esto se puso una almohadilla de gel que comprendía glucosa al 40% en agar al 1% para iniciar la reacción. Después de aproximadamente 30 minutos, la almohadilla inferior se había vuelto amarilla, indicando claramente la producción de yodo elemental (estando presente yoduro debido a la difusión de la placa en el gel). Después de aproximadamente 1 hora, la mancha azul fue visible debajo de la almohadilla, indicando la presencia de ROS dentro de la placa de almidón/yoduro. 24 horas después de inicio, un gran área de la placa se había vuelto azul, indicando producción continuada de ROS.
- 50

Ejemplo 5

Se realizaron dos experimentos similares usando una distribución en general como se describió anteriormente en el Ejemplo 4 pero con la almohadilla de glucosa debajo de la almohadilla de goma xantana/alginato reticulado. Se realizaron dos experimentos, con las almohadillas de gel de goma xantana/ alginato en diferentes orientaciones, en un caso con la capa GOX más elevada y con la otra con la capa LPO más elevada.

- 5 Con la almohadilla situada con la capa GOX más inferior, cerca de la almohadilla de glucosa, después de aproximadamente 1 hora se podía ver la mancha azul bajo la almohadilla. Con los otros experimentos, con la capa LPO más inferior, cerca de la almohadilla de glucosa, después de aproximadamente 2 horas se podía ver la mancha azul bajo la almohadilla. Esto muestra que incluso con una distribución usando una almohadilla con enzimas en secuencia no óptima, aún se puede producir ROS en suficiente cantidad para producir un efecto oxidativo en la placa
- 10 indicadora.

En ambos experimentos, se observó coloración amarilla en ambos geles, en las capas de LPO, que muestra la presencia de producción de yodo. Después de 24 horas, en los dos casos mucho de la placa de almidón/yoduro se había vuelto azul, que muestra de nuevo la producción de ROS.

Demostración de la absorbencia de humedad de un gel de goma xantana.

- 15 Se preparó una preparación al 10% en peso de Keltrol en agua como se describió anteriormente. Se añadieron 1,06 g del gel al 10% a 10,22 g de agua destilada/desionizada, mantenido a 21°C y sellado para minimizar los efectos de evaporación. Se separó el agua por decantación y se midió por peso para valorar el grado de absorbencia.

Después de 15 minutos, quedaron 8,34 g de agua; después de 45 minutos, quedaron 7,56 g; después de 2 horas quedaron 6,51 g; después de 18 horas, quedaron 2,1g.

- 20 Este experimento muestra que el gel de Keltrol al 10% puede absorber al menos 8 veces su peso en agua.

Demostración de la absorbencia de humedad de una mezcla de gel de goma xantana/ alginato reticulado.

- Se preparó una mezcla de Keltrol al 5% en peso y 1% en peso de ácido algínico como se describió anteriormente. Se moldearon dos capas de gel entre dos capas de gasa de algodón para producir una almohadilla que se reticuló usando una disolución al 10% de cloruro de calcio y se lavó dos veces durante 10 minutos en agua, como se describió anteriormente. Se secó con papel secante la almohadilla usando papel tisú absorbente.
- 25

Se pesó un trozo de la almohadilla 10 mm x 10 mm x 3 mm para establecer el peso inicial (0,28 g). Se añadió 1 ml de agua a la almohadilla. Se retiró la almohadilla y se pesó después de diversos tiempos para valorar el aumento de peso (debido a absorción de agua). Después de una 1 hora el peso de la almohadilla fue 0,37 g; después de 2 horas 0,44 g; después de 3 horas 0,49 g y después de 6 horas 0,5 g.

- 30 Este experimento muestra que el gel de goma xantana/alginato reticulado puede absorber agua. Comparado con el Ejemplo anterior usando Keltrol al 10%, el uso de un menor porcentaje de Keltrol y alginato reticulado da como resultado menos absorbencia de agua.

- Se usaron geles de goma xantana/alginato reticulados preparados como se describió anteriormente en la producción de un apósito según la invención, como se muestra de manera esquemática en la Figura 1. Dichos geles se usaron junto con un sobrecito que contenía glucosa/yoduro preparado como se describió anteriormente. En particular, se disolvió glucosa en una disolución acuosa 5 mM de yoduro de potasio a la velocidad de 12,5 g por 100 ml. La disolución se puso en una bolsa de diálisis (previamente puesta en agua hirviendo durante 10 minutos y se enjuagó a fondo) con un área accesible de aproximadamente 40 x 120 mM, y se selló.
- 35

- Se montaron los componentes para formar un apósito de la construcción mostrada en la Figura 1. El apósito es de construcción dispuesta en capas y comprende una capa externa o cubierta 10 en forma de una tirita auto-adhesiva permeable al oxígeno, adecuada para adherirse a la piel 12 de individuos a fin de cubrir una herida. La cubierta 10 encierra una capa superior que comprende una almohadilla de gel de goma xantana/alginato reticulado que contiene glucosa oxidasa, preparada como se describió anteriormente; una capa intermedia que comprende una disolución de glucosa y yoduro de potasio en un sobrecito 18 semipermeable, preparado como se describió anteriormente y una
- 40
- 45 capa inferior que comprende una placa de gel de goma xantana/alginato reticulado que contiene lactoperoxidasa preparado como se describió anteriormente. Debajo de la almohadilla 20 hay una lámina 22 de gasa, para contacto con la herida 14.

- El apósito se suministra inicialmente como un sistema multiparte, con los componentes individuales envasados por separado en envases estériles, sellados, respectivos. Cuando se requiere para uso los componentes del apósito se retiran de los envases y se aplican a una herida de manera apropiada para producir el apósito final como se muestra.
- 50

La Figura 5 ilustra de manera esquemática una realización adicional de apósito según la invención. Esta forma de apósito está favorecida en la actualidad. El apósito presenta dimensiones principales de 100 mm x 100 mm, en

forma de un cuadrado.

El apósito ilustrado comprende una placa 50 de hidrogel hidratado, blanda, constituida por poliAMPS (como se describe en la patente internacional WO 01/96422 suministrada por First Water Ltd). El hidrogel contiene glucosa hasta 23% (que actúa como un sustrato para enzima oxidorreductasa) y sales de yoduro por ej., yoduro de potasio al 1,6% p/v (que son un precursor para yodo). El hidrogel también puede contener glicerol hasta 20% p/v (que actúa como un humectante e hidratante). La placa 50 de hidrogel forma la capa inferior del apósito.

El apósito también comprende una capa superior constituida por una gasa 52 de tejido de celulosa a la que se une de manera irreversible (mediante enlaces covalentes) glucosa oxidasa y lactoperoxidasa. La gasa 52 se prepara como sigue.

- 10 Se corta la gasa a un tamaño y forma adecuados (un cuadrado 100 mm x 100 mm), y se lava en agua para retirar cualquier soluto o material en forma de partículas. Se retira el fluido en exceso. Se remoja después la gasa en una disolución de meta-peryodato de sodio 10 mM durante 60 minutos a 25°C. Después de esta etapa de oxidación, en el caso de que se formen grupos aldehído reactivos, se lava de manera extensa la gasa en agua para retirar el peryodato. Después de la etapa de lavado, se remoja la gasa en una disolución de glucosa oxidasa (Biocatalysts - Código G638P), a 100 µg de polvo por ml de hidrogenocarbonato de sodio 50 mM a pH 9,0. Esto es equivalente a 7.000 U/ml. También se incorpora lactoperoxidasa (DMV International) a 100 µl de polvo por ml de hidrogenocarbonato de sodio 50 mM a pH 9,0. Estas dosis se pueden reducir, puesto que representan una cantidad excesiva de actividad. Se deja que reaccione la gasa con la disolución enzimática durante 4 horas a aproximadamente 20°C, después de lo cual se retira la gasa y se lava de manera extensa en disolución de baja fuerza iónica (agua desionizada) y tampón de fuerza iónica alta (NaH₂CO₃ 50 mM pH 9,0 + NaCl 1 M) para retirar enzima ligada sin mucha rigidez. Después se recubre la gasa en un conservante, por ejemplo PVA al 5%, sacarosa al 10% o gelatina al 2% y se seca a temperatura ambiente (aproximadamente 21°C) o, preferiblemente, a 40°C.

- 25 Se montan las capas inferior y superior entre sí en una atmósfera de nitrógeno (para evitar reacción prematura), y se envasan juntas sellándose en un saco o recinto impermeable al oxígeno, por ej., hecho de sacos de hoja de aluminio laminada como se suministra por Sigma (código Z183407). La interacción de la glucosa en el gel con la glucosa oxidasa inmovilizada está limitada por la velocidad a que la glucosa puede difundir en la capa de enzima inmovilizada. Esta demora es suficiente para permitir que se monten las dos capas juntas en presencia de oxígeno, y después se ponen en un envase sin oxígeno, antes de que pueda tener lugar cualquier reacción sustancial. Una vez que se excluye el oxígeno del producto montado, la reacción se detiene de algún modo, y sólo se puede reanudar cuando se renueva el suministro de oxígeno (por ej., cuando se retira el producto del envase para uso en una herida). Esta privación de oxígeno dentro del envase evita que se use la glucosa arriba en producción prematura de peróxido. Las enzimas, al tiempo que están inicialmente en forma seca en la gasa en el montaje, llegan a estar hidratadas con agua desde la placa 52 de hidrogel y se mantienen en estado hidratado mediante agua de la placa 52 de hidrogel mientras se sella en el saco o recinto previamente a su uso.

- 35 En su uso, se retira el apósito del saco o recinto y se pone en la piel de un paciente sobre un sitio herido, mostrado de manera esquemática en 54, con la capa 50 de hidrogel inferior en contacto con la piel. Una cubierta o capa sobrepuesta 56 permeable al oxígeno y permeable a la humedad (que puede o no formar parte del apósito) se sitúa sobre la capa 52 superior y se adhiere a la piel que rodea al sitio de la herida mediante adhesivo adecuado proporcionado sobre la cara inferior de la capa sobrepuesta 56. De esta manera, el apósito se retiene en su posición sobre la piel, cubriendo el sitio de la herida.

- 45 La glucosa oxidasa en la capa superior (que está en estado hidratado) cataliza la reacción de la glucosa en la capa inferior con el oxígeno que pasa por la capa sobrepuesta 56 de los alrededores, produciendo peróxido de hidrógeno como se discutió anteriormente. El peróxido de hidrógeno mismo tiene efectos antimicrobianos beneficiosos, como se discutió anteriormente. El peróxido de hidrógeno también experimenta una reacción adicional catalizada por la lactoperoxidasa para producir una serie de especies con propiedades antimicrobianas, como se discutió anteriormente. Además, las sales de yoduro en la capa inferior reaccionan para producir yodo elemental y posiblemente también ácido hipoyodoso, agentes antimicrobianos potentes adicionales, como se discutió anteriormente. El apósito así tiene un número de mecanismos muy eficaces para producción in-situ de agentes antimicrobianos que pueden ser muy eficaces para favorecer la curación de la herida.

- 50 Además, el hidrogel de la capa inferior es absorbente muy fluido, que permite la absorción de altos volúmenes de exudado de la herida. El fluido exudado de la herida, incluyendo bacterias potencialmente peligrosas etc, se pueden absorber así en el apósito y ser destruidas por las especies antimicrobianas generadas en la misma. El apósito se puede autoesterilizar así. El hidrogel también puede donar fluid, si la herida lo requiere, permitiendo así que el sitio de la herida se mantenga húmedo todo el tiempo ayudando al proceso de curación.

- 55 En una modificación de la realización de la Figura 5 descrita anteriormente, no hay lactoperoxidasa. En este caso, aunque el peróxido de hidrógeno producido por la reacción catalizada por la glucosa oxidasa no experimenta reacción catalizada por lactoperoxidasa, sin embargo cantidades útiles del peróxido de hidrógeno experimentan de manera espontánea reacción no catalizada con iones yoduro para generar yodo molecular y aún se obtienen efectos

antimicrobianos valiosos sin embargo.

La Figura 6 ilustra de manera esquemática aún una realización adicional de apósito según la invención. Esta forma de apósito es en la actualidad la más favorecida. El apósito tiene dimensiones principales de 100 mm x 100 mm, en forma de un cuadrado.

- 5 El apósito anti-bacteriano y anti-fúngico ilustrado comprende una placa 60 de hidrogel que contiene glucosa como la capa inferior del apósito. Moldeada sobre la superficie superior de la placa 60 hay una película 62 de PVA (alcohol polivinílico) que incorpora glucosa oxidasa.

10 La capa 60 inferior de hidrogel se formuló para que incluyera los siguientes reactivos en peso: AMPS de sodio al 20% (sal sódica del ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (Lubrizol, código 2405)), glucosa al 20% (Fisher, calidad analítica), glicerol al 10% (Fisher, calidad analítica), agua desionizada al 50%, diacrilato de polietilenglicol 400 al 0,1% (UCB Chemicals) y fotoiniciador al 0,01% (1-hidroxiciclohexil fenil cetona (Aldrich)). Se dispensó la mezcla en bandejas de moldeo, a una profundidad de 2-3 mm. Después se endureció el hidrogel por irradiación bajo una lámpara de UV, durante hasta 60 segundos y un índice de potencia de aprox. 100 mW/cm². Después se permitió que el hidrogel se enfriara a 30°C o por debajo.

15 La película 62 de PVA que contenía enzima se preparó por disolución de PVA de alto peso molecular (124.000-186.000 pm, Aldrich) en agua calentando la mezcla. Se incorporó el PVA a una concentración final de 6% p/v. Una vez disuelta, se dejó enfriar la disolución a 30°C o por debajo, antes de que se añadiera enzima (glucosa oxidasa (GOX, Biocatalysts G638P)), a una concentración de 100 ug/μl (polvo liofilizado en peso por volumen). Después se añadieron 50-100 μl de la mezcla de PVA/GOX a una superficie de 20 mm² del hidrogel enfriado y se dejó endurecer. Se formó una película delgada después de aproximadamente 30 min. Para evitar la activación enzimática, la adición de la disolución de PVA/GOX a hidrogel de glucosa se puede llevar a cabo en una atmósfera sin oxígeno (por ej., en nitrógeno). Cuando la película 62 se pone en contacto con el hidrogel 60, la mayor parte del agua de la película se extrae al hidrogel, dejando el PVA como una membrana húmeda que contenía la enzima en estado hidratado. Queda suficiente agua en la película para que el PVA esté hidratado y se mantenga flexible.

25 Se envasa el apósito resultante en un saco o recinto impermeable al oxígeno, por ej., hecho de sacos de hoja de aluminio laminada como se suministra por Sigma (código Z183407). La interacción de la glucosa en el gel con la glucosa oxidasa inmovilizada está limitada por la velocidad a que la glucosa puede difundir en la capa de enzima inmovilizada. Esa demora es suficiente para permitir que las dos capas se monten juntas en presencia de oxígeno y después se ponen en un envase sin oxígeno, antes de que pueda tener lugar reacción sustancial. Una vez que el oxígeno se excluye del producto montado, la reacción se detiene de algún modo, y sólo se puede reanudar cuando se renueva el suministro de oxígeno (por ej., cuando se retira el producto del envase para uso en una herida). Esta privación de oxígeno dentro del envase evita que la glucosa se use arriba en producción prematura de peróxido. La enzima se mantiene en estado hidratado mientras se sella en el saco o recinto previamente a su uso.

35 En su uso, el apósito es retirado del saco o recinto y colocado sobre la piel de un paciente sobre un sitio herido, mostrado de manera esquemática en 64, con la capa 60 de hidrogel inferior en contacto con la piel. Una cubierta o capa sobrepuesta 66 permeable al oxígeno y permeable a la humedad (que puede o no formar parte del apósito) se sitúa sobre la película 62 y se adhiere a la piel que rodea al sitio de la herida mediante adhesivo adecuado proporcionado sobre la cara inferior de la capa sobrepuesta 66. De esta manera el apósito es retenido en su posición sobre la piel, cubriendo el sitio de la herida.

40 La glucosa oxidasa en la película 62 (que está en estado hidratado) cataliza la reacción de la glucosa en la capa inferior con el oxígeno que pasa por la capa sobrepuesta 66 del entorno, produciendo peróxido de hidrógeno como se discutió anteriormente. El peróxido de hidrógeno tiene efectos antimicrobianos beneficiosos, como se discutió anteriormente, y el oxígeno liberado cuando se descompone por catalasa endógena ayuda al proceso de curación soportando metabolismo celular, potenciando hidroxilación de aminoácidos e inhibiendo el crecimiento de bacterias anaerobias.

45 Para demostrar la generación de especies oxidativas, se usó una placa indicadora que consiste en almidón al 1% (Aldrich), yoduro de potasio 100 mM (Fisher) y agar al 1% (Sigma). El apósito que comprende hidrogel 60 con película 62 de PVA/GOX se puso sobre la placa indicadora, en el aire, activándose el GOX así por el oxígeno disponible. Se produce peróxido de hidrógeno en suficiente cantidad para poder difundir por el hidrogel y alcanzar la placa indicadora abajo. El poder oxidativo del peróxido de hidrógeno después oxida yoduro a yodo, que se compleja con el almidón para formar un complejo azul oscuro intenso. Por eliminación del apósito de hidrogel activado y poniéndolo sobre nuevas placas indicadoras a intervalos de 24 horas, se puede demostrar la liberación sostenida de peróxido de hidrógeno durante un periodo de al menos 5 días.

55 Además, para demostrar más la estabilidad de la enzima GOX en la película de PVA, se retiró la película de un hidrogel después de 4 días de uso y se puso sobre 20 mm² de hidrogel de glucosa fresco y se puso sobre una placa indicadora. Después de 24 horas, el complejo de almidón/yoduro azul intenso fue claramente visible, que indica que la actividad enzimática aún estaba presente en la película de PVA.

- Para demostrar la actividad de GOX localizada en un hidrogel sin glucosa, se produjo una película de PVA/GOX como se describió anteriormente. Se puso el hidrogel sobre un lecho de gasa de algodón saturada con PBS (disolución salina tamponada de fosfato), y se dejó que se hinchara lentamente durante 24 horas. Se cortó en porciones el hidrogel en dos, por el plano horizontal, y se bañó en una disolución de almidón al 1% + yoduro de potasio 100 mM + glucosa al 1% p/v + EDTA 5 mM + 50 µg/ml de lactoperoxidasa. Muy rápidamente, se puede localizar la presencia de GOX, por la detección de peróxido de hidrógeno. La actividad de GOX está localizada claramente para la película de PVA y la superficie de contacto del hidrogel en el caso de que estuviera fundida la película de PVA. Debajo de esto, no hubo generación de color, mostrándose así que GOX no es móvil en el hidrogel de AMPS, incluso en un estado hinchado.
- 5
- 10 La placa 60 de hidrogel es muy absorbente de fluido, y así presenta las propiedades y beneficios descritos anteriormente en relación con la realización de la Figura 5.

REIVINDICACIONES

1. Un apósito cutáneo de construcción dispuesta en capas, que comprende una capa que incluye enzima oxidorreductasa en estado hidratado, y una capa que comprende una fuente de sustrato para la enzima oxidorreductasa, en el que el apósito está en forma de un sistema multiparte en el que las capas se envasan por separado, para el montaje del apósito por un usuario final.
2. Un apósito según la reivindicación 1, que comprende una capa inferior en forma de un gel hidratado y una capa superior en forma de un soporte inerte que soporta enzima oxidorreductasa.
3. Un apósito según la reivindicación 2, en el que el hidrogel contiene la fuente de sustrato para la enzima oxidorreductasa.
4. Un apósito según cualquier reivindicación precedente, en el que la enzima oxidorreductasa comprende glucosa oxidasa.
5. Un apósito según cualquier reivindicación precedente, en el que el apósito comprende además enzima peroxidasa presente en estado hidratado.
6. Un apósito según la reivindicación 5, en el que la enzima peroxidasa comprende lactoperoxidasa.
7. Un apósito según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el apósito incluye uno o más hidrogeles hidratados.
8. Un apósito según la reivindicación 7, en el que el gel comprende un material polimérico hidrófilo.
9. Un apósito según la reivindicación 7 u 8, en el que la enzima o las enzimas están presentes en uno o más hidrogeles hidratados.
10. Un apósito según la reivindicación 9, en el que el hidrogel hidratado es reticulado para formar una matriz de biopolímero incluida.
11. Un apósito según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la enzima o las enzimas están situadas sobre un soporte inerte.
12. Un apósito según la reivindicación 11, en el que el soporte inerte comprende una gasa de tejido de algodón o celulosa a que se une de manera irreversible la enzima o las enzimas.
13. Un apósito según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye una capa de material de barrera en la interfase con la piel en uso.
14. Un apósito según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato está situado en un hidrogel hidratado.
15. Un apósito según la reivindicación 14, en el que el hidrogel hidratado está reticulado.
16. Un apósito según la reivindicación 15, en el que el hidrogel hidratado reticulado se fabrica para excluir moléculas de enzima al tiempo que es permeable a peróxido de hidrógeno y yodo.
17. Un apósito según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que incluye un solo hidrogel hidratado que no contiene enzima.
18. Un apósito según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye además un suministro de yoduro.
19. Un apósito según la reivindicación 18, en el que el suministro de yoduro se sitúa en un hidrogel hidratado.
20. Un apósito según la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en el que el suministro de yoduro se sitúa con la fuente de sustrato para la enzima oxidorreductasa.
21. Un apósito según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye una cubierta o capa externa para adherir el apósito a la piel de un ser humano o sujeto animal.
22. Un apósito según la reivindicación 21, en el que la cubierta incluye una ventana en o a través de la que se puede observar medio indicador que indica cuándo está activa la química del apósito.
23. Un apósito según la reivindicación 21 ó 22, en el que se proporciona enzima catalasa inmovilizada sobre la superficie interna de la cubierta.

Fig.1.

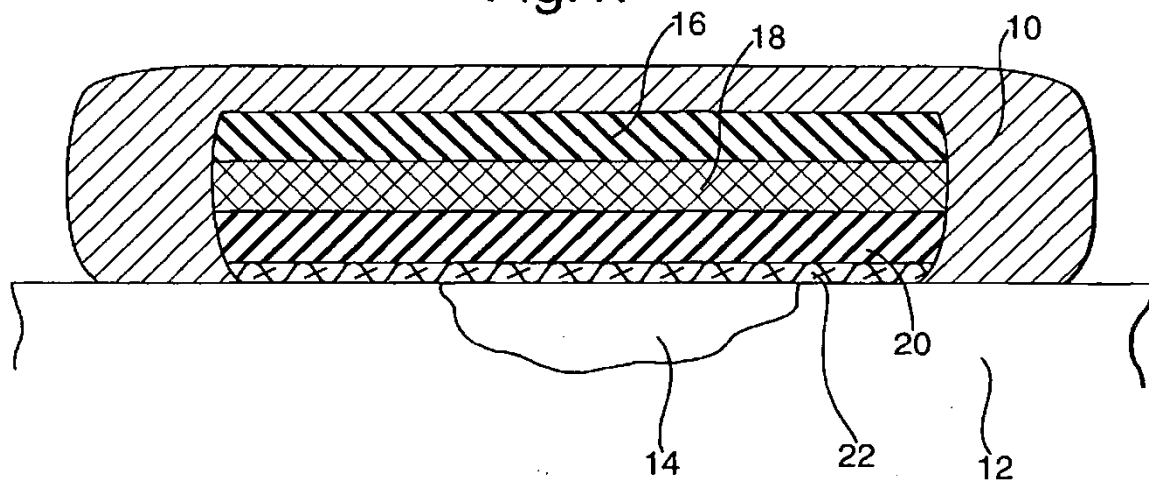
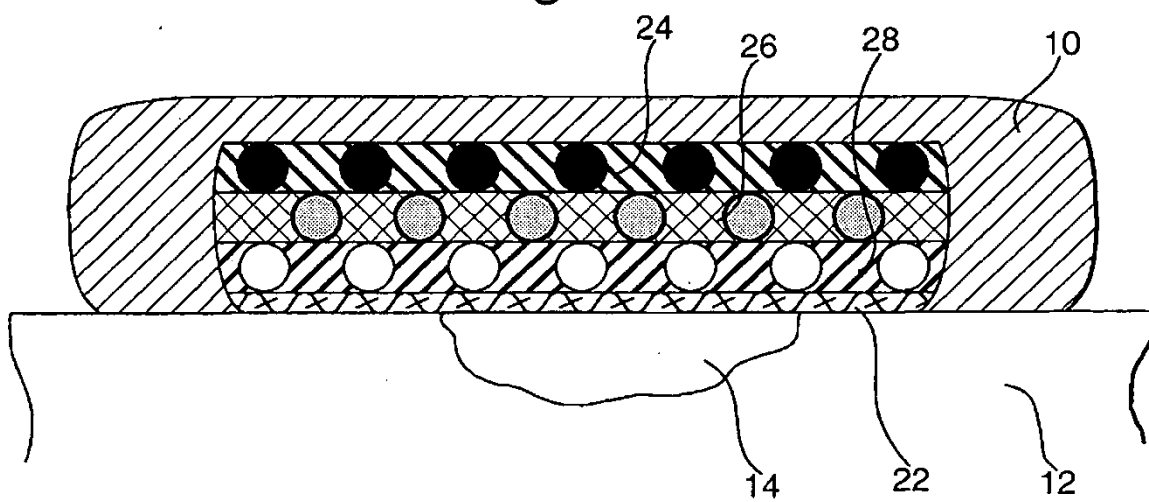


Fig.2.



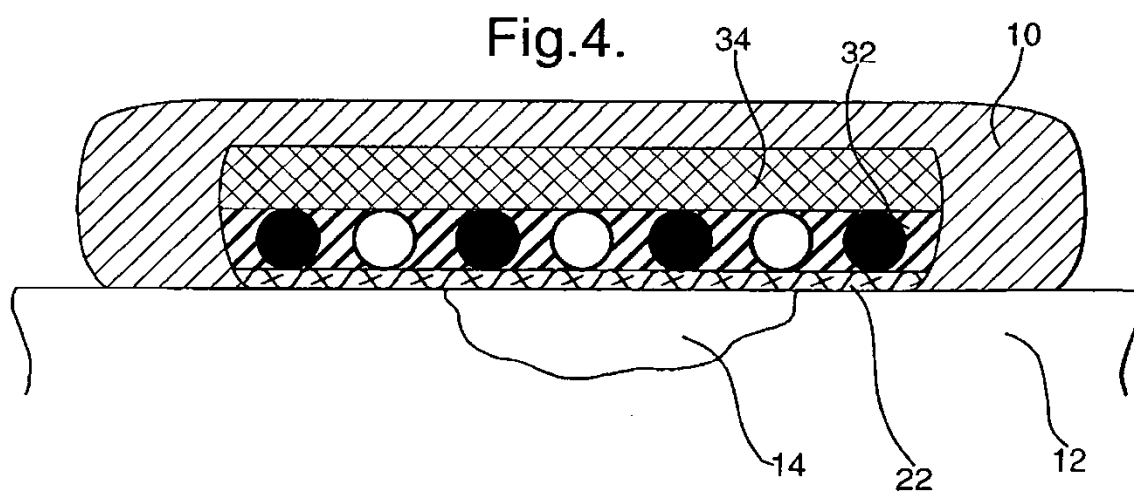
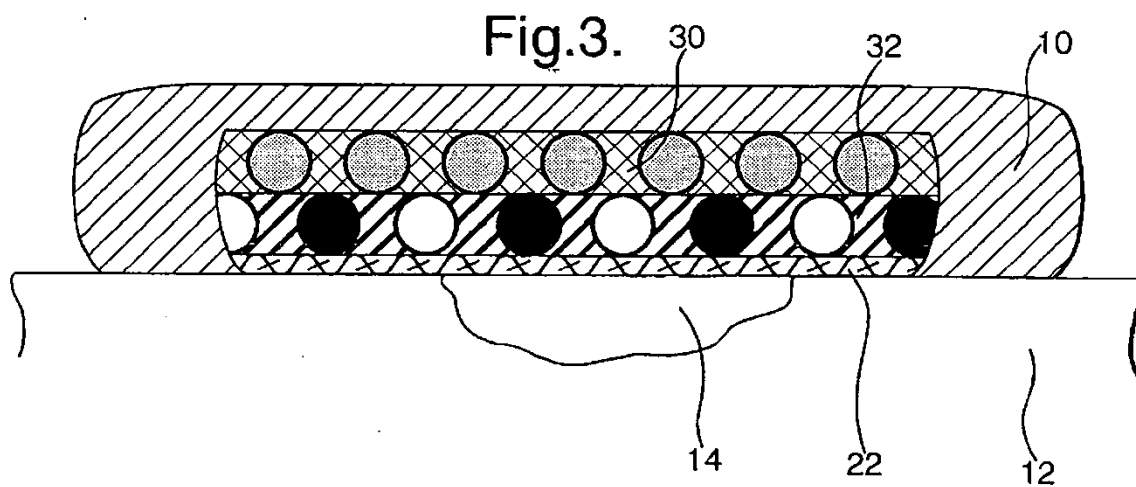


Fig.5.

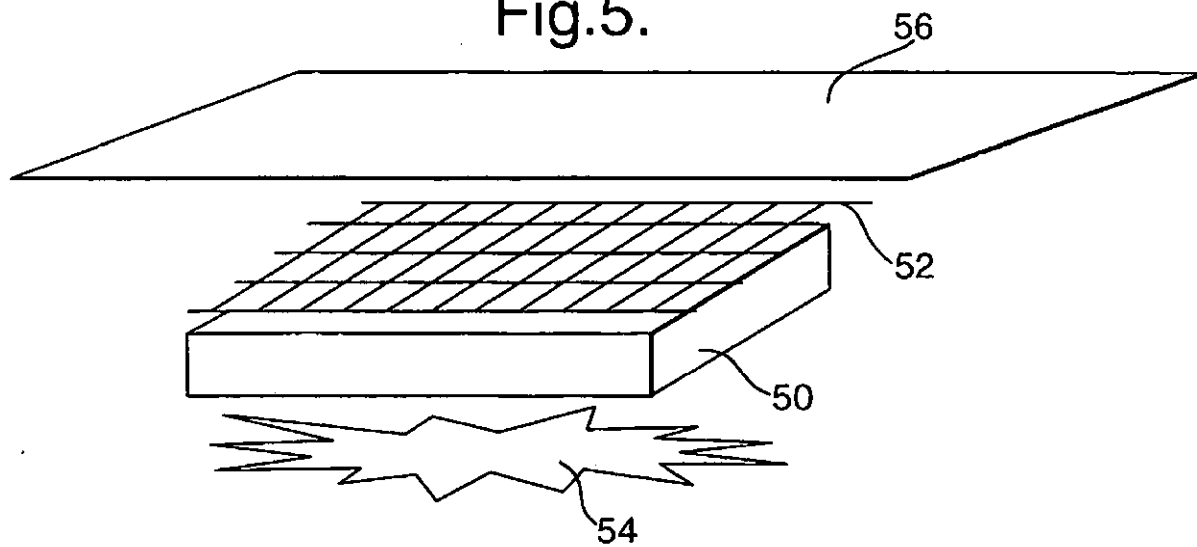


Fig.6.

