

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 569 422**

21 Número de solicitud: 201400778

51 Int. Cl.:

A61K 35/54

(2015.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

07.10.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.05.2016

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

19.01.2017

Fecha de concesión:

24.04.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

03.05.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070647

73 Titular/es:

**B.D. N INGENIERIA DE ALIMENTACIÓN, S.L.
(100.0%)**

**C/ Pallars nº 141, 5º - A
08018 Barcelona (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**CUBERO ESQUINAS, Núria y
MONFERRER BALLESTER, Alberto**

74 Agente/Representante:

LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen

54 Título: **Método de obtención de un producto cicatrizante y producto cicatrizante obtenido**

57 Resumen:

Método de obtención de un producto cicatrizante y producto cicatrizante obtenido.

El producto cicatrizante está constituido por un hidrolizado de membranas testáceas de huevo, que comprende: del orden del 70% +/- 5% de proteínas de peso molecular entre los 20 y 35 kDa; y otros productos propios de las membranas testáceas tales como ácido hialurónico, condroitin sulfato y glucosamina. La invención comprende un procedimiento para la preparación del mencionado producto cicatrizante.

ES 2 569 422 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

5 MÉTODO DE OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO CICATRIZANTE Y PRODUCTO CICATRIZANTE OBTENIDO.

Objeto de la invención.

10 La invención presentada consiste en un proceso enzimático de hidrólisis controlada de las membranas internas de la cáscara del huevo (membranas testáceas).

El objeto de la presente invención se refiere a un método de obtención un producto cicatrizante mediante un proceso enzimático de hidrólisis controlada de las
15 membranas testáceas de la cáscara del huevo , así como al producto cicatrizante obtenido, compuesto por un hidrolizado de membranas testáceas de huevo

Esta invención presenta unas características basadas en el ataque de las membranas testáceas (previamente separadas de la fracción mineral por
20 procedimientos mecánicos) con proteasas bacterianas específicas en un medio acuoso mantenido entre 40 y 65 °C, en agitación durante un periodo de 72 - 120 horas. Posteriormente la enzima se inactiva mediante un tratamiento térmico y el producto obtenido se purifica por filtración o centrifugación para conservarse posteriormente mediante alguno de los sistemas industriales habitualmente
25 utilizados como congelación, refrigeración, concentración, secado, liofilización, radiación o uso de altas presiones hidrostáticas. Se desaconseja el uso de la esterilización térmica por su efecto sobre la estructura de las proteínas.

Campo de aplicación de la invención.

30

El producto cicatrizante objeto de la invención es aplicable en medicina o farmacia como estimulante del crecimiento del tejido de granulación que reemplaza al

coágulo de fibrina en la cicatrización de las heridas, permitiendo así acortar el tiempo de cicatrización.

- 5 El producto cicatrizante obtenido tras el proceso de hidrólisis es aplicable en la regeneración del tejido epitelial, ya sea en uso cosmético dermatológico, pero principalmente está enfocado a su uso como cicatrizante o estimulador del crecimiento del tejido de granulación con fines médicos.

Estado de la técnica.

10

Actualmente se conocen multitud de productos, naturales o de síntesis, que se utilizan tanto en dermatología cosmética como clínica para mejorar el estado de las heridas o acelerar su curación.

15

Por lo que respecta concretamente al uso de las membranas testáceas del huevo se encuentran ya referencias a su uso para sanar heridas en el libro *Bencao Gangmu* (Compendio sobre Materia Médica de 1596) que realizó Li Shizhen durante la dinastía Ming, en China.

20

En la medicina tradicional española se conocía ya el efecto terapéutico que comportaba aplicar una membrana fresca de huevo sobre pequeñas heridas, laceraciones o escarificaciones. Las familias que tenían gallinas usaban este remedio frecuentemente.

25

Actualmente, los luchadores de Sumo prefieren utilizar membrana de huevo para tratar pequeñas heridas antes que otros productos, ya que aseguran que la herida mejora más rápidamente y la piel recupera fácilmente su elasticidad, previniendo nuevas rupturas en la misma zona por debilidad o falta de elasticidad en la cicatriz.

30

Algunas patentes reivindican el uso de la membrana de huevo como fuente de materia prima para obtener productos con efecto dermatológico, pero los procedimientos de obtención, las características del hidrolizado obtenido o el fundamento técnico de su efecto no coinciden con los encontrados y propuestos

con nuestra invención. En todo caso, según el estudio realizado, hasta la fecha no existe en el mercado ninguna especialidad médica con efecto cicatrizante basado en un hidrolizado de membrana de huevo.

5 En el estado de la técnica, cabe destacar los siguientes documentos de patente:

- WO 2009/052396 (Etzel LR, Figgins J; Strohbehn RE – BIOVA LLC) y US 2010/0029564 (Ronald E. Strohbehn – BIOVA, LLC) describen un proceso para solubilizar proteínas obtenidas de la membrana de la cáscara de huevo aplicando
10 un proceso de hidrólisis química mediante hidróxido sódico especificando en su primera reivindicación que no utiliza enzimas proteolíticas, lo cual diferencia completamente este sistema del propuesto en la presente invención.

Este sistema tiene el inconveniente de realizar una hidrólisis no selectiva y obtener
15 aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular (entre 0,4 - 3 kDa) que son menos bioactivos que los obtenidos mediante una hidrólisis enzimática controlada.

- EP 0 601 698 (SHISEIDO Research Center) reivindica un producto de aplicación tópica en cosmética en el cual uno de sus componentes es el resultado de hidrolizar
20 la membrana de la cáscara de huevo mediante ácido, álcali, solvente orgánico, oxidasas o reductasas. La finalidad del hidrolizado de membrana en este producto es potenciar el efecto de los tocoferoles añadidos en el preparado para retardar la oxidación cutánea y la formación de peróxidos. En ningún caso reivindica la utilización de proteasas selectivas ni tiene unas características específicas para su
25 uso como potenciador de la capacidad cicatrizante.

- US 2004/0180025 y US 2008/063677 (Frank Daniel Long – NEW LIFE RESOURCES LLC) describen productos cosméticos, terapéuticos y nutracéuticos resultantes de la combinación de derivados de la membrana de huevo combinados
30 con derivados de origen marino. Esta combinación de productos sirve para preparar, entre otros, una composición terapéutica para curación de heridas de múltiples orígenes, uno de cuyos componentes se describe como “material activo derivado de la membrana de huevo”, sin especificar el tipo de material ni cómo

tratar la membrana para obtenerlo. Solamente en uno de los ejemplos citados describe la hidrólisis de la membrana por medio de un complejo enzimático obtenido de levaduras. Reivindica que este material tiene un efecto antiinflamatorio y describe un ejemplo donde se aplica sobre una laceración.

5

- US 1971/3558771 (Leslie L. Balassa) utiliza sobre heridas un polvo fino obtenido de la molienda conjunta de la cáscara de huevo completa, membrana y parte calcárea mineral, o únicamente de la parte mineral. La utilización de este producto presenta el inconveniente de dejar en el tejido de granulación cuerpos de inclusión

10

- EP 2 020 455 (Tajima, Takeharu, Kusamoto, et al. – IDEMITSU TECHNOFINE Co. Ltd.) describe el proceso de obtención de una fibra y un entramado a base de un polímero que contiene una determinada cantidad de un hidrolizado químico de membrana de huevo utilizando ácido tiopropiónico. El producto obtenido se aplica como apósito sobre heridas.

15

Existen otras patentes que reivindican otros apósitos, escayolas o algodones para tratamiento de heridas que incluyen membrana o sus derivados en su composición (JP 2007 197393, JP 2009 089858, JP 2003 225298) pero todos estos casos difieren de la presente invención, tanto en el procedimiento de obtención como en la forma de aplicación.

20

- JP 2009 132661 reivindica un hidrolizado para cosmética basado en una hidrólisis en medio orgánico alcalino y paso por una resina de intercambio iónico. La finalidad y el método de obtención son diferentes del presentado en nuestro caso.

25

También existen otros antecedentes de patentes que describen métodos de hidrólisis de la membrana de huevo para la obtención de unos productos orientados a usos cosméticos como blanqueantes de la piel, agentes antioxidantes o antienvejecimiento, y sin características específicas como cicatrizante.

30

- JP 2006 069892 propone una combinación de hidrolizados de colágeno y de membrana para uso cosmético en lociones o cremas como agente anti-arrugas.
- JP 2004 229534 reivindica el uso de hidrolizado de membrana en bebidas deportivas para incrementar la inmunidad, mejorar la piel y promover el crecimiento del pelo.
- JP 2008 007419 utiliza proteasas tras sonicar y hervir la membrana durante 10 minutos. La funcionalidad final del producto es antioxidante o antihipertensivo tras aplicación en productos cosméticos o alimentos y no tiene propiedades cicatrizantes específicas. Esta invención presenta el inconveniente de utilizar una etapa de alta temperatura (100 °C) lo que provoca la desnaturalización de los péptidos obtenidos.
- JP 2007 197393 reivindica el uso de un hidrolizado de membrana comercial para elaborar un dentífrico.
- US 2007 178170 reivindica el uso de un hidrolizado de membrana por medio de enzimas provenientes de levaduras como potente antiinflamatorio.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El producto cicatrizante objeto de la presente invención, y el método de obtención del mismo aportan una serie de ventajas respecto a los antecedentes citados tanto en lo que se refiere a la obtención del producto como al efecto cicatrizante del mismo, estimulando el crecimiento del tejido de granulación, acelerando la maduración de fibroblastos y queratinocitos, aumentando la producción local de colágeno por parte de los fibroblastos y potenciando la angiogénesis vascular así como la reepitelización.

Otro de los objetivos de la invención es evitar que el producto cicatrizante deje en el tejido de granulación cuerpos de inclusión no deseados y constituidos por pequeñas partículas minerales.

Este objetivo de la invención se consigue mediante el método o procedimiento de obtención que se describe en las reivindicaciones adjuntas y que a parte de utilizar la membrana previamente hidrolizada elimina por decantación y filtración toda la
5 parte mineral evitando la presencia de cuerpos de inclusión y partículas no deseados en el tejido de granulación.

Otro de los objetivos de la invención es la obtención del producto cicatrizante sin la utilización de agentes químicos agresivos como álcalis fuertes, ácidos, agentes
10 antioxidantes o reductores obteniéndose contrariamente por medio de un proceso enzimático basado en el uso de una única enzima de origen bacteriano.

El procedimiento de obtención del producto cicatrizante mencionado anteriormente
15 comprende, según la invención las fases siguientes:

- a) hidratación de las membranas en un medio acuoso tamponado a pH 8 - 10;
- 20 b) ataque enzimático utilizando una enzima proteolítica, preferiblemente una subtilisina microbiana específica, entre 40 y 65°C, en agitación durante un periodo de 72 - 120 horas;
- c) inactivación de la enzima mediante un tratamiento térmico de 20 – 40
25 minutos entre 75 y 90°C;
- d) separación del sobrenadante mediante centrifugación o filtrado;
- e) conservación del producto obtenido en refrigeración, congelación o
30 mediante concentración, deshidratación o liofilizado.

Como sustrato se utiliza preferiblemente membrana desecada en polvo que se debe hidratar y suspender previamente en agua para poder ser tratada. En el

proceso descrito se utilizan proporciones de 1 parte de membrana en polvo en 6 partes de agua, pudiendo ser esta relación variable pero aconsejando no bajar de una relación 1:4 ya que la membrana hidratada forma entonces una pasta difícil de procesar. El agua de hidratación y suspensión se ajusta previamente a un pH entre 8 y 10 mediante la adición de un agente alcalinizante como, por ejemplo, citrato trisódico anhidro, fosfato trisódico, tetraborato de sodio u otros agentes reguladores del pH similares a los ya mencionados.

No obstante, también existe la posibilidad de utilizar directamente membrana fresca, directamente separada de la cáscara o simplemente mantenida en refrigeración o congelación, sin necesidad de deshidratarla previamente. En este caso, la proporción recomendada de agua alcalinizada añadida es de 1:3.

A la suspensión de membrana se añade entre 3.000 y 4.000 AU/Kg. de enzima y se mantiene en el reactor, con agitación suave, durante 72/120 horas entre 40 y 65°C. Tras el ataque enzimático se procede a la inactivación de la enzima mediante su desnaturalización entre 75 y 90°C durante 20-40 minutos.

A continuación se purifica el producto de la hidrólisis mediante filtración o centrifugación. Ambos métodos separan pequeños restos de cáscara mineral pulverulenta, que puede acompañar a la membrana utilizada.

El filtrado o el sobrenadante obtenido se debe acondicionar mediante un sistema de conservación y envasar para su posterior distribución comercial. Los sistemas empleados en el desarrollo de la invención han sido congelación, concentración y secado; aunque no se descarta el uso de la liofilización, altas presiones hidrostáticas o irradiación, sin olvidar la simple refrigeración si su uso industrial, por parte del laboratorio farmacológico, va a realizarse en un corto espacio de tiempo.

De acuerdo con la invención el producto cicatrizante obtenido está constituido a base de hidrolizado de membranas testáceas de huevo y comprende una distribución de proteínas de peso molecular preferentemente entre los 20 y 35 kDa;

y otros componentes propios de las membranas testáceas como glucosamina, condroitinsulfato y ácido hialurónico.

El hidrolizado obtenido contiene mayoritariamente proteínas, aproximadamente un 70% $\pm$ 5,0%, con un tamaño de molécula situado mayoritariamente entre los 20 y 35 kDa.

REALIZACIÓN PREFERIDA DE LA INVENCION

Para la realización de la invención se realizó un registro de datos (screening) inicial con diferentes enzimas proteolíticas. En función de los resultados obtenidos, finalmente se seleccionó la subtilisina, enzima proteolítica del tipo "serina endoproteasa" y se utilizó la presentación comercial denominada ALCALASE 2.5L de la empresa NOVOZYMES A/S (Dinamarca), con una actividad nominal de 2.5 Unidades Anson por gramo (2.5 AU/g), aunque otras subtilisinas del mismo tipo, como PROLEATHER FG-F de Amano Enzyme Inc (Japón), pueden ser utilizadas con la misma funcionalidad.

La membrana de la cáscara de huevo utilizada en la producción del hidrolizado se obtuvo tanto de muestras propias obtenidas en nuestras instalaciones como de muestras solicitadas al coordinador del proyecto "*SHELLBRANE - Separating eggshell and its membrane to turn eggshell waste into valuable source materials*" (*Separación de la cáscara del huevo y su membrana para convertir los residuos de cáscara de huevo en una fuente valiosa*), proyecto cofinanciado por el 7º Programa Marco de la U.E. bajo el Acuerdo (*Grant Agreement*) N° 286910.

Las muestras de membrana se molturaron hasta alcanzar un tamaño de partícula menor de 25 Mesh (<0,7 mm.) y se sometieron al tratamiento de hidrólisis según las condiciones descritas anteriormente:

30

- Dosis de enzima 3.500 AU/Kg. membrana seca
- Cantidad de agua añadida 6.000 ml/Kg. membrana seca
- Regulador del pH Citrato trisódico anhidro ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)

- pH 8,5
- Temperatura de tratamiento 60°C
- Tiempo de tratamiento 95 horas
- Temperatura de inactivación 85°C
- 5 • Tiempo de inactivación 30 minutos
- Decantación y Centrifugado Centrifugado

Las muestras obtenidas en las diferentes producciones se analizaron para determinar que su composición es constante y corresponde al estándar deseado; concretamente, se realizaron:

- **Análisis químico:** para verificar que el proceso de hidrólisis se ha realizado según lo esperado se analiza la cantidad de proteína en el sobrenadante.

15 - **Electroforesis** en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (*DS-PAGE Test*), técnica utilizada para separar y caracterizar las distintas proteínas según su peso molecular. La tinción de las bandas de proteínas se realizó con azul de Coomassie; apreciándose un patrón proteico homogéneo y repetitivo entre diferentes lotes de producto realizado.

20

- **Estudio de cicatrización en animal vivo.** El protocolo que se siguió en este procedimiento es un protocolo aprobado por el comité ético de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

25 Los test se realizaron en las instalaciones de la UAB, dónde se generaron las lesiones (6cm x 2cm) en el dorso de los animales (cerdos) después de una anestesia general. El alcance de la lesión incluía la totalidad de la epidermis y de la dermis. A continuación se aplicó una matriz de plasma con el producto cicatrizante en su interior y se protegió la lesión con un vendaje oclusivo y protector.

30

Se hicieron un total de tres lesiones por cada uno de los tratamientos, una lesión control correspondía a una lesión en la que se le aplicaba la matriz de plasma sin producto y dos lesiones tratadas con el producto cicatrizante.

- 5 En los días 5, 9, 14 y 19 posteriores a la generación de las heridas se hicieron las curas pertinentes y se controló la evolución de las heridas.

El día 9 tras la generación de las heridas, se comprobó que las heridas tratadas con producto testado desarrollaban un tejido de granulación mucho más abundante que
10 en la herida de control.

El tejido de granulación es un tejido fibroso que el organismo produce para rellenar el defecto producido por una herida. Contiene numerosos vasos sanguíneos para reparar la herida, aportando los nutrientes necesarios para la reepitelización de la
15 misma. Un exceso de tejido de granulación puede dificultar el cierre de la herida, pero generalmente va asociado a un buen proceso de cicatrización. En el estudio realizado, se observaron diferencias notables entre el tejido de granulación de las muestras tratadas y los controles y el proceso de epitelización total fue más rápido para las muestras tratadas.

20

El día 9, después de la cura de la lesión, se realizó un estudio histopatológico para analizar la evolución de la herida y detectar posibles cambios a nivel microscópico en el proceso de cicatrización. A nivel microscópico, se vieron diferencias significativas en el proceso de reepitelización y de crecimiento de tejido de
25 granulación entre las heridas tratadas y el control.

A los 19 días, las heridas tratadas con el producto presentaban una reepitelización completa, con formación de la cresta epidermal, mientras que el control mostraba una reepitelización más inmadura. Las heridas tratadas también mostraban una
30 menor reacción inflamatoria.

En ningún caso las heridas tratadas presentaron retraso en el proceso de cicatrización con respecto al control.

Estos resultados demuestran que el tratamiento de las heridas con el producto desarrollado consigue una aceleración en el proceso de reepitelización, con cambios en la cantidad y calidad del tejido de granulación y una respuesta
5 inflamatoria inferior que en el control.

Una vez descrita suficientemente la naturaleza de la invención, así como un ejemplo de realización preferente, se hace constar a los efectos oportunos que los elementos descritos podrán ser modificados, siempre y cuando ello no suponga
10 una alteración de las características esenciales de la invención que se reivindican a continuación.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de obtención de un producto cicatrizante, **caracterizado** porque comprende las siguientes fases:

5

a) hidratación de membranas testáceas de huevo en un medio acuoso tamponado a pH 8 - 10;

10

b) ataque enzimático utilizando una enzima proteolítica, preferiblemente una subtilisina microbiana específica, entre 40 y 65°C, en agitación durante un periodo de 72 - 120 horas;

15

c) inactivación de la enzima mediante un tratamiento térmico de 20 - 40 minutos a 75-90°C;

d) separación del sobrenadante mediante centrifugación o filtrado;

e) conservación del producto obtenido en refrigeración, congelación o mediante concentración, deshidratación o liofilizado.

20

2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la hidratación de membranas comprende la hidratación de membrana desecada en polvo, con una proporción de 1 parte de membrana en polvo y de 4 a 6 partes de agua, sin bajar de una relación 1:4.

25

3.- Procedimiento, según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la hidratación de membranas testáceas de huevo comprende la hidratación de membrana fresca sin deshidratar, en una proporción de agua alcalinizada añadida de 1:3.

30

4.- Producto cicatrizante, obtenido con el procedimiento de las reivindicaciones anteriores; **caracterizado** porque está constituido por un hidrolizado de membranas testáceas de huevo, que comprende: del orden del 70% $\pm$ 5,0% de proteínas de

peso molecular entre los 20 y 35 kDa; y ácido hialurónico, condroitin sulfato y glucosamina propios de las membranas testáceas.