

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 908**

51 Int. Cl.:

A61L 26/00 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

A61L 15/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2014 PCT/FI2014/050131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.08.2014 WO2014128354**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2014 E 14708926 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2958599**

54 Título: **Polisacárido nanofibrilar para su utilización en el control y la prevención de la contracción y la formación de cicatrices**

30 Prioridad:

22.02.2013 FI 20135172

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

02.06.2017

73 Titular/es:

**UPM-KYMMENE CORPORATION (100.0%)
Alvar Aallon katu 1
00100 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**LAUKKANEN, ANTTI;
KANKURI, ESKO y
NUUTILA, KRISTO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 614 908 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

Polisacárido nanofibrilar para su utilización en el control y la prevención de la contracción y la formación de cicatrices.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere de manera general al tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos, y a procedimientos útiles en el tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Más particularmente, la presente invención se refiere a agentes y composiciones que comprenden un polisacárido nanofibrilar útil en el control y la prevención de la formación de cicatrices ("scarring") y la contracción, típicamente asociadas a la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. La presente invención se refiere, además, a un polisacárido nanofibrilar incorporado en un hidrogel para su utilización en el control y la prevención de la formación de cicatrices y la contracción asociadas a la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos.

10

15

Antecedentes de la invención

El tratamiento de las heridas, particularmente las heridas más graves, a menudo presenta grandes dificultades. Generalmente, la contracción se considera un componente natural y esencial para la cicatrización de las heridas. Sin embargo, en muchos casos se puede observar una contracción excesiva e incontrolada de la herida, así como una fibrosis inducida por la contracción que puede llevar a la desfiguración y la pérdida de funcionalidad. La fibrosis o contracción del tejido fibroso también puede ocurrir durante la reparación de un tendón. Esto conduce al acortamiento de los tendones y/o a la reducción de la resistencia a la tracción.

20

25

La reconstitución de la integridad estructural del tejido en los animales vertebrados superiores posterior a un traumatismo quirúrgico o accidental, por ejemplo, comprende un patrón ampliamente conocido de reparación o cierre de las heridas. Entre los ejemplos de heridas cutáneas se incluyen quemaduras, úlceras neuropáticas, úlceras de decúbito, úlceras por estasis venosa y úlceras diabéticas. Las heridas cutáneas abiertas se cicatrizan de forma rutinaria por un proceso de reparación que incluye seis componentes principales: (1) inflamación; (2) proliferación de fibroblastos; (3) proliferación de vasos sanguíneos; (4) síntesis de tejido conjuntivo; (5) epitelización; y (6) contracción de la herida. La cicatrización de las heridas se ve alterada cuando estos componentes no funcionan correctamente, ya sea individualmente o en su conjunto. Numerosos factores pueden afectar a la cicatrización de las heridas, entre ellos la malnutrición, una infección, los agentes farmacológicos (por ejemplo, la actinomicina y los esteroides), la diabetes y la edad avanzada.

30

35

El proceso de reparación se inicia con el reclutamiento de una serie de células especializadas en el tejido afectado e implica una deposición de matriz extracelular y membrana basal, angiogénesis, actividad de proteasa selectiva y reepitelización. Un componente importante del proceso de cicatrización en mamíferos adultos es la estimulación de los fibroblastos para generar la matriz extracelular. Esta matriz extracelular constituye un componente principal del tejido conjuntivo que se desarrolla para reparar la zona de la herida. Sin embargo, el proceso de reparación no es perfecto, y el tejido conjuntivo a menudo tiene una naturaleza fibrosa y da lugar con frecuencia a una cicatriz de tejido conjuntivo (un proceso conocido como fibrosis). Las cicatrices se componen de un tejido conjuntivo que es mayoritariamente una matriz de colágeno de los tipos 1 y 3, y fibronectina. La cicatriz puede consistir en fibras de colágeno en una organización anómala (como se observa en las cicatrices de la piel) o puede ser una acumulación anormal de tejido conjuntivo (como se observa en las cicatrices del sistema nervioso central). La mayoría de las cicatrices consisten en colágeno anormalmente organizado y también exceso de colágeno.

40

45

Una cicatriz cutánea o dérmica se puede definir como la alteración macroscópica de la estructura y la función normales de la piel, que se produce como consecuencia de la reparación de heridas.

50

En el ser humano, las cicatrices de la piel pueden estar hundidas por debajo de la superficie o elevadas por encima de la superficie cutánea. Las cicatrices hipertróficas son una forma más grave de aparición normal de cicatrices, se elevan por encima de la superficie normal de la piel y contienen un exceso de colágeno dispuesto en un patrón anómalo. Un queloide es otra forma de cicatriz patológica, que no sólo está elevada por encima de la superficie cutánea, sino que además se extiende más allá de los límites de la lesión original. En un queloide, hay un exceso de tejido conjuntivo organizado de una manera anómala, principalmente en remolinos de tejido colágeno. Entre los ejemplos de estas situaciones se incluyen cicatrices de la piel en las que la cicatrización excesiva puede ser perjudicial para la función del tejido, y particularmente cuando se produce una contracción de la cicatriz (por ejemplo, en las quemaduras y las heridas de la piel que disminuyen la flexibilidad de una articulación). En la piel, las cicatrices hipertróficas o queloides pueden provocar un deterioro funcional y estético, y existe la necesidad de prevenir su aparición. La formación de cicatrices debida a la utilización de injertos de piel, tanto en los sitios donantes como receptores, y de la aplicación de piel artificial, también puede ser problemática y debe minimizarse o evitarse.

55

60

En la técnica se han propuesto diversos agentes, apósitos para heridas, piel de cerdo liofilizada, materiales compuestos y métodos como aplicaciones en el campo del tratamiento de heridas. Son de uso general los apósitos

65

para heridas y las gasas con pomada como terapia para una lesión de la piel que afecta a una capa superior de la dermis, tal como una quemadura dérmica superficial. Cuando la lesión de la piel alcanza una capa inferior de la dermis, tal como una quemadura dérmica profunda, una quemadura dérmica o un decúbito por lo menos de segundo grado, la autorreconstrucción del tejido cutáneo por proliferación de células epidérmicas suele presentar problemas. Habitualmente, estas lesiones se tratan mediante el desbridamiento del tejido muerto o del tejido de granulación anormal, la reconstrucción del tejido de granulación normal cubriendo la lesión con piel alógena, piel xenógena, piel artificial de silicona, productos sustitutivos de la piel, apósitos para heridas o similares, y la reconstrucción de la piel mediante un injerto de piel. En general, los injertos de piel se han utilizado para cubrir la superficie de lesiones superficiales de muchos tipos.

Un injerto de grosor parcial (STSG) contiene epidermis y una cantidad variable de dermis. Un injerto de grosor total (FTSG) incluye toda la dermis y la epidermis. El injerto puede ser un autoinjerto, que se obtiene de otra parte del mismo individuo, un isoinjerto, que se obtiene de un donante genéticamente idéntico, un aloinjerto, que se obtiene de otro individuo de la misma especie, o un xenoinjerto, que se obtiene de un individuo de una especie diferente. En el tratamiento de las quemaduras profundas que requieren escisión, actualmente el tratamiento estándar es el injerto autólogo de piel de grosor parcial (STSG). La cantidad de dermis incluida en el injerto determina la probabilidad de supervivencia y el nivel de contracción.

Sin embargo, el tratamiento con injertos de piel, tales como los STSG, no está exento de problemas. En condiciones ideales, con un lecho de la herida sano y sin infecciones, un STSG se adherirá o "arrajará" bien; sin embargo, en muchos casos las condiciones quedan lejos de las ideales. Por ejemplo, el lecho de la herida puede sangrar, estar infectado, puede contener excreciones de la herida, la epitelización puede estar debilitada debido a la fuerza de cizalladura, o el grosor del STSG no es el adecuado, todo lo cual puede afectar significativamente al proceso de "arraigo" y cicatrización.

Un injerto de piel empieza a encogerse inmediatamente después de su recolección. A consecuencia de la contracción primaria, el injerto de piel puede perder aproximadamente del 40% a aproximadamente el 10% de su superficie inicial. Tras la transferencia a un sitio receptor, el injerto de piel se encoge a medida que cicatriza; este fenómeno se denomina contracción secundaria. Los FTSG tienden a mantener el mismo tamaño tras una contracción primaria significativa, pero los STSG se contraen siempre que las circunstancias lo permitan. Los STSG tienen más probabilidad de sufrir una contracción secundaria, y particularmente los STSG más delgados tienden a encogerse considerablemente y a experimentar una pigmentación anómala. La dermis tiene un efecto inhibitorio de la contracción y, cuanto mayor es la proporción de dermis en el injerto, mayor es la inhibición y menos se contrae el injerto. Por consiguiente, las proporciones altas de contracción suelen asociarse particularmente a los STSG delgados.

Con los STSG, los apéndices dérmicos, tales como los folículos pilosos, permanecen mayoritariamente intactos en el sitio donante, lo que permite la activación de las células madre y la regeneración de la epidermis a partir de estos nichos. De este modo, los sitios donantes de injertos cicatrizan habitualmente en aproximadamente tres semanas y permiten la nueva recolección del mismo sitio, lo que resulta esencial en el tratamiento de grandes quemaduras. Para cubrir grandes superficies de heridas, los STSG pueden ser en malla a fin de permitir la expansión del injerto, habitualmente en una relación comprendida entre 1:1,5 y 1:6. Los intersticios del injerto en malla cicatrizan por migración epitelial a partir de los bordes del injerto.

La contracción del injerto y de la herida siempre aparece principalmente al principio, y el proceso puede continuar durante muchos meses tras la cicatrización de la herida. La subsiguiente contracción de la cicatriz fibrótica puede conducir a la restricción de los movimientos del paciente y a un mal resultado estético. En consecuencia, todas las quemaduras cicatrizadas, así como las quemaduras tratadas con injerto de piel, requieren una terapia intensiva de la cicatriz tras la fase aguda para intentar evitar los problemas de formación de cicatrices y contracción.

La contracción y la fibrosis también pueden ser consecuencia de un rechazo, que se da particularmente cuando se aplican injertos de piel alógenos o xenógenos.

Análogamente, la contracción también aparece en el contexto del tratamiento y la cicatrización de las membranas mucosas. Son zonas particularmente problemáticas las membranas mucosas, las zonas de la piel con el epitelio muy delgado, como los párpados, y las quemaduras extensas.

En la actualidad, todavía no existe ningún tratamiento disponible realmente eficaz, ni ningún método plausible, para el control y/o la prevención de la contracción. Además, el grado de fibrosis y contracción es impredecible y, en los casos más complejos, puede ser necesario reoperar y/o liberar o eliminar quirúrgicamente el tejido fibrótico, así como llevar a cabo un nuevo trasplante por STSG.

Si bien las consideraciones anteriores se aplican principalmente a la contracción y el desarrollo de fibrosis en el ser humano, cabe entender que la contracción y la fibrosis pueden ser igualmente problemáticas en otros animales, particularmente en el sector veterinario, en el tratamiento de animales, como los animales domésticos (por ejemplo, caballos, ganado vacuno, perros, gatos). Las heridas abdominales son un ejemplo de una de las principales razones

que obligan a sacrificar a caballos de carreras.

Algunos agentes farmacológicos, como el fumarato de beta-aminopropionitrilo (beta-APN o BAPN-F), se utilizan para inhibir la reticulación del colágeno en la medicina veterinaria. Existen también diversos agentes de poscicatrización que intentan tratar la cicatriz una vez formada.

En la patente US nº 5.558.861 se propone la utilización de un gel de celulosa de producción microbiana, modificado por la unión física o química de una proteína de adhesión de células animales a la celulosa, particularmente útil en forma de lámina como piel artificial o recubrimiento vulnerable.

El documento WO 2007/027849 describe la utilización de nanocelulosa microbiana como sustrato en sistemas de cicatrización de heridas, de forma adecuada en apósitos para heridas. Dicha nanocelulosa microbiana es, particularmente, celulosa multicinta producida por cepas específicas de *Gluconoacetobacter*. El apósito puede comprender, adicionalmente, una o más sustancias activas, tales como péptidos biológicamente activos, proteínas, moléculas pequeñas, lípidos, etc., y también puede presentarse como sutura, lámina, compresa, vendaje, banda, prótesis, fibra, fibra tejida, perla, tira o gasa.

El documento US 2007/0231271 se refiere a una composición tópica en forma de gel, que comprende una pasta de celulosa bacteriana, un derivado de celulosa formador de gel y propilenglicol, para el tratamiento de lesiones epiteliales, tales como quemaduras, abrasiones, cortes, heridas posquirúrgicas y úlceras. Tras la aplicación y el secado de la composición, se forma una barrera mecánica, tal como una película o membrana, para proteger la zona lesionada.

El documento WO 2012107648 se refiere al uso externo de celulosa microfibrilada en forma de gel acuoso, espuma de pomada, etc., para el tratamiento de inflamaciones de la piel, dermatitis atópica, psoriasis y quemaduras cutáneas en general.

La publicación US 2012231038 describe una membrana de hidrogel de celulosa biocompatible para el tratamiento de heridas, especialmente para heridas oculares. Dicha membrana de hidrogel de celulosa comprende celulosa, celulosa microcristalina o celulosa microbiana, y se obtiene activando celulosa, disolviendo la celulosa activada y dejando que la solución obtenida gelifique. Dicha membrana de hidrogel tiene una resistencia a la tracción y una resistencia al desgarro suficientes para aplicaciones de tratamiento de heridas.

En Muzzarelli y otros, "Chitin nanofibrils/chitosan glycolate composites as wound medicaments" (Carbohydrate Polymers, Applied Science Publishers, LTD. Barking GB, vol. 70, nº 3, 11 de septiembre de 2007, páginas 274-284) se dan a conocer geles que comprenden nanofibrillas de quitina y compuestos de glicolato de quitosano, que se someten a ensayo para evaluar la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos.

A pesar de la investigación y el desarrollo continuos, persiste la necesidad de disponer de agentes, composiciones y métodos mejorados para la prevención de la contracción en el contexto del tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Además, se necesitan métodos, agentes y composiciones para prevenir el desarrollo de fibrosis.

Características de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer nuevos agentes y composiciones para su utilización en el control y la prevención de la formación de cicatrices y la contracción en el contexto del tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos.

Un objeto de la presente invención es un procedimiento para el control y la prevención de la formación de cicatrices y la contracción en relación con el tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos.

La presente invención se refiere a un polisacárido nanofibrilar para su utilización en el control y la prevención de la formación de cicatrices y la contracción, asociadas al tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos.

Particularmente, la presente invención se refiere a hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares para su utilización en el control y la prevención de la formación de cicatrices y la contracción, asociadas al tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos.

La presente invención también se refiere a la utilización de polisacáridos nanofibrilares en la prevención y el control de la formación de cicatrices y la contracción en relación con la cicatrización de heridas o la reparación de tejidos, en la que dichos polisacáridos nanofibrilares están incorporados a un hidrogel.

La presente invención también se refiere a un dispositivo de aplicación que comprende el hidrogel de polisacárido nanofibrilar.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para el control y la prevención de la formación de cicatrices y la contracción en relación con la cicatrización de heridas o la reparación de tejidos en un individuo que lo necesita, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto la herida o la membrana mucosa o el tejido con una cantidad eficaz de un hidrogel de polisacárido nanofibrilar.

El hidrogel de polisacárido nanofibrilar tiene particularmente aplicación en el control y la prevención de la formación de cicatrices en relación con el tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Dichas heridas pueden haber sido causadas por cirugía con láser, quemaduras, tratamientos contra el cáncer, radiación, sitios de escisión de biopsia, cicatrices de patógenos, heridas traumáticas, heridas de penetración, cirugía estética, cirugía reconstructiva y similares, así como heridas crónicas y úlceras, etc.

En las reivindicaciones adjuntas se indican las características de la presente invención.

Definiciones

Con el fin de facilitar la comprensión de los principios de la presente invención, a continuación se hace referencia a ciertas formas de realización y se utiliza un lenguaje específico para describirlas. No obstante, debe apreciarse que con ello no se pretende limitar en ningún aspecto el alcance de la presente invención, y que se contemplan alteraciones y modificaciones de los procedimientos y agentes ilustrados, así como otras aplicaciones de los principios de la presente invención, ilustrada en la presente memoria, tal como se le pueden ocurrir normalmente al experto en la materia a la que se refiere la presente invención.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el significado entendido comúnmente por el experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

En la presente memoria, el término “contracción” se utiliza para hacer referencia, en términos generales, a la fase de la cicatrización de las heridas en la que las células situadas en los bordes de una herida o en el tejido de granulación migran o se contraen para cerrar el sitio del traumatismo, incluida la contractura de la cicatriz que tiene lugar a medida que la cicatriz madura.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “herida” se utiliza para referirse, en términos generales, a lesiones de la piel, la membrana mucosa y el tejido subcutáneo, incluidos los tendones, que se inician de diferentes maneras y tienen diferentes características.

Generalmente, las heridas se clasifican en uno de cuatro grados, en función de su profundidad:

- Grado I: heridas limitadas al epitelio;
- Grado II: heridas que se extienden hasta penetrar en la dermis;
- Grado III: heridas que se extienden hasta penetrar en el tejido subcutáneo; y
- Grado IV o heridas de grosor total: heridas en las que los huesos están al descubierto, por ejemplo, un punto de presión óseo tal como el trocánter mayor o el sacro.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “herida crónica” se refiere a una herida que no ha cicatrizado en 30 días. Entre los ejemplos de heridas crónicas se incluyen las úlceras neuropáticas, las úlceras de decúbito, las úlceras por estasis venosa y las úlceras provocadas por la diabetes y sus complicaciones.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “cicatrización de heridas” o “cicatrización” se refiere a un proceso complejo en el que la piel o la membrana mucosa u otro órgano o tejido se reparan por sí mismos tras sufrir una lesión.

El modelo clásico de cicatrización de heridas se divide en tres o cuatro fases que son secuenciales, aunque se solapan: fase (1) hemostática, (2) inflamatoria, (3) proliferativa y (4) de remodelación. En cuestión de minutos tras la lesión, las plaquetas (trombocitos) se agregan en el sitio de la lesión para formar un coágulo de fibrina, que actúa controlando el sangrado activo (hemostasia). En la fase inflamatoria, las bacterias y restos celulares son fagocitados y eliminados, y se liberan factores que provocan la migración y la división de las células que participan en la fase proliferativa. En la fase proliferativa tienen lugar la angiogénesis, la deposición de colágeno, la formación de tejido de granulación, la epitelización y la contracción de la herida. En la angiogénesis, las células endoteliales vasculares forman nuevos vasos sanguíneos. En la fibroplasia y la formación de tejido de granulación, los fibroblastos crecen y forman la matriz extracelular mediante la excreción de colágeno y fibronectina. Al mismo tiempo, tiene lugar la reepitelización de la epidermis, en la que las células epiteliales proliferan y “trepan” hasta el lecho de la herida, proporcionando una cobertura para el nuevo tejido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “polisacárido” pretende incluir largas moléculas de hidratos de carbono lineales o ramificadas de unidades monoméricas repetitivas unidas entre sí por enlaces glucosídicos, e hidratos de carbono complejos compuestos por una cadena de monosacáridos unidos entre sí por enlaces

glucosídicos.

5 El término "polisacárido nanofibrilar" se refiere a una colección de nanofibrillas de polisacáridos o haces de nanofibrillas. El término "nanofibrillas" se refiere a subestructuras existentes aisladas a partir de la materia prima de polisacárido. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "celulosa nanofibrilar" o "NFC" pretende incluir todas las celulosas microfibriladas (MFC) y nanocelulosas. Además, hay otros sinónimos ampliamente utilizados para la NFC, por ejemplo, celulosa de fibrillas, celulosa de nanofibras, celulosa nanofibrilada (CNF), celulosa fibrilada a nanoescala, celulosa microfibrilar o microfibrillas de celulosa.

10 Además, la NFC producida por ciertos microbios también tiene varios sinónimos, por ejemplo, celulosa bacteriana (BC), celulosa microbiana (MC), biocelulosa, "nata de coco" (NDC) o "coco de nata" (CDN).

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 (1a y 1b) presenta imágenes de crio-TEM de hidrogeles de celulosa nanofibrilar.

La figura 2a muestra la viscosidad de dispersiones de NFC al 0,5% en función de la tensión de cizalladura aplicada en comparación con una solución al 0,5% de polímeros solubles en agua de poliacrilamida (5.000 kDa) y CMC (250 kDa). La figura 2b presenta la viscosidad de dispersiones de NFC al 0,5% en función de la velocidad de cizalladura medida en comparación con poliacrilamida y CMC al 0,5%.

20

La figura 3 muestra una presentación esquemática de una dispersión de NFC que contiene células dispersadas en su interior fluyendo dentro de una aguja.

25 La figura 4 muestra la difusión de dextranos de diferentes pesos moleculares a través de un hidrogel de NFC nativa al 1%.

La figura 5 ilustra la diferencia entre heridas tratadas con hidrogel de NFC (izquierda) y de control (derecha) tras 7 días de seguimiento, ejemplo 3. Las heridas recientes de línea basal se muestran en la figura 5B, y en la figura 5A se muestran las mismas heridas al cabo de 7 días.

30

La figura 6 presenta secciones histológicas de las heridas del ejemplo 3.

Figura 7: La figura 7A muestra la morfología macroscópica de las heridas (control a la izquierda e hidrogel a la derecha) en el día 0, y la figura 7B en el día 7 tras producirse la herida (hidrogel a la izquierda y control a la derecha), ejemplo 3.

35

La figura 8 muestra análisis histológicos que ponen de manifiesto una mayor migración de células epiteliales en las heridas tratadas con hidrogel de NFC, ejemplo 3.

40

La figura 9 ilustra el análisis morfológico macroscópico del sitio donante de injerto de piel, que demuestra por lo menos una misma proporción de epitelización con el hidrogel de NFC en comparación con la zona no tratada, ejemplo 3.

45 La figura 10 muestra una herida reciente de línea basal de control con injerto y después de 14 días de seguimiento, así como una sección histológica de la herida, ejemplo 3.

La figura 11 muestra una herida reciente de línea basal tratada con hidrogel de NFC con injerto y después de 14 días de seguimiento, así como una sección histológica de la herida, ejemplo 3.

50

La figura 12 presenta una fotografía de heridas de biopsia en el día 0 tras el tratamiento con NFC, Purilon y de control, ejemplo 4.

La figura 13 presenta una fotografía de heridas de biopsia en el día 14 tras el tratamiento con NFC, Purilon y de control, ejemplo 4. El porcentaje de contracción se calculó y se representó gráficamente para cada prueba. Los resultados se muestran en la figura 14.

55

La figura 14 ilustra gráficamente el porcentaje de contracción calculado para cada muestra del ejemplo 4.

60 Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, se descubrió que los polisacáridos nanofibrilares, particularmente los hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares, tienen propiedades muy beneficiosas para el control y la prevención de la formación de cicatrices y la contracción que se producen típicamente durante el tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos.

65

5 A menudo, una contracción descontrolada y/o demasiado intensa, típicamente asociada con los procesos que tienen lugar en relación con el tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos, es desfavorable y no deseada. Por ejemplo, en relación con las heridas grandes y especialmente en asociación con tratamientos que utilizan injertos de piel, la contracción puede provocar un exceso de granulación, la formación de tejido fibroso o de cicatrices que pueden ser rompedizas, frágiles o pueden limitar el movimiento, con lo que puede ser necesario reoperar y/o liberar o eliminar quirúrgicamente el tejido fibrótico. El hidrogel de polisacárido nanofibrilar previene y controla eficazmente la aparición de cicatrices, así como la contracción de la herida y la contracción de los injertos de piel, tales como un injerto de piel de grosor parcial (STSG), y no tiene ningún efecto adverso sobre la epitelización. Según una forma de realización preferida, particularmente, el hidrogel de polisacárido nanofibrilar evita y controla con eficacia la contracción que se produce en relación con el tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos.

El polisacárido nanofibrilar proporciona al hidrogel una estructura única, muy parecida a la matriz extracelular.

15 Entre los polisacáridos adecuados para su utilización en la presente invención se incluyen celulosas, hemicelulosas, quitinas, quitosanos, alginatos, pectinas, arabinosilanos y cualquier derivado o cualquier combinación de los mismos. Los polisacáridos preferentes son las celulosas, las quitinas, los quitosanos y cualquier derivado o combinación de los mismos.

20 Las celulosas se pueden obtener a partir de cualquier materia prima de celulosa basada en cualquier material vegetal que contenga celulosa, cualquier celulosa microbiana o cualquier fuente de materia prima de celulosa que se pueda utilizar en la producción de pasta de celulosa, pasta refinada y NFC.

25 El material vegetal puede ser cualquier material vegetal derivado de madera o no derivado de madera. Dicha madera se puede seleccionar entre árboles de madera blanda (SW), como la picea, el pino, el abeto, el alerce, el abeto Douglas y la tsuga, árboles de madera dura (HW), como el abedul, el álamo temblón, el álamo, el aliso, el eucalipto y la acacia, y entre mezclas de maderas blandas y duras.

30 Dicho material vegetal no leñoso se puede seleccionar entre residuos agrícolas, hierbas y otros materiales vegetales, tales como paja, hojas, corteza, semillas, cáscaras, flores, verduras y frutos, del algodón, el maíz, el trigo, la avena, el centeno, la cebada, el arroz, el lino, el cáñamo, el cáñamo de Manila, el sisal, el yute, el ramio, el kenaf, el bagazo, el bambú y la caña.

35 La materia prima de celulosa también puede proceder de microorganismos productores de celulosa, tales como materiales obtenidos de procesos de fermentación bacteriana. Los microorganismos se pueden seleccionar entre los géneros *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes*, de forma adecuada son del género *Acetobacter* y de forma particularmente adecuada son de la especie *Acetobacter xylinum* o *Acetobacter pasteurianus*. La celulosa también se puede obtener a partir de algas, por ejemplo, la celulosa que puede encontrarse en las paredes estructurales de las algas verdes, las algas marrones, la mayoría de las algas rojas y la mayoría de las algas doradas.

45 El término "pasta de celulosa" se refiere a fibras de celulosa que se aíslan a partir de cualquier materia prima de celulosa por procesos químicos, mecánicos, termomecánicos, o quimiotermomecánicos de fabricación de pasta. Particularmente la pasta de celulosa, que puede ser pasta de origen vegetal, especialmente de madera (pasta de SW o HW, por ejemplo, pasta de abedul blanqueada), y en la que las moléculas de celulosa están oxidadas, es fácil de desintegrar a NFC.

50 También se pueden utilizar la quitina y el quitosano con una estructura repetitiva de (1,4)-β-N-acetil glucosaminoglicano y derivados desacetilados de los mismos, respectivamente. La quitina se puede obtener del exoesqueleto de los crustáceos e insectos, y de las paredes celulares de los hongos. Convenientemente, la quitina purificada se puede obtener, por ejemplo, de cangrejos y gambas utilizando métodos conocidos en la técnica, en los que pueden eliminarse componentes asociados, tales como componentes de la matriz, proteínas, pigmentos, glucanos y minerales. A continuación puede someterse a desintegración mecánica utilizando, por ejemplo, el equipo y los métodos descritos a continuación en relación con la NFC, en un medio acuoso, para obtener una suspensión que comprende nanofibras de quitina con una relación de aspecto alta y un diámetro típicamente de 10-40 nm.

El quitosano se puede obtener a partir de la quitina mediante métodos de modificación química conocidos.

60 Para obtener NFC con las propiedades y dimensiones deseadas, se lleva a cabo la desintegración mecánica de la pasta de celulosa, las materias primas de celulosa oxidada, la celulosa microbiana, etc., con el equipo adecuado, tal como un refinador, una amoladora, un homogeneizador, un eliminador de coloide, un molino de fricción, un sonicador de ultrasonidos, un fluidizador, tal como un microfluidizador, un macrofluidizador o un homogeneizador de tipo fluidizador. Por consiguiente, NFC se refiere a productos desintegrados mecánicamente. Análogamente, aplicando una desintegración mecánica, se obtienen también otros polisacáridos nanofibrilares.

65 Se han desarrollado varios grados (tipos) diferentes de NFC mediante diversas técnicas de producción. Los grados

tienen diferentes propiedades dependiendo del método de fabricación, el grado de fibrilación y la composición química. Las composiciones químicas de los grados también varían. Dependiendo de la fuente de materia prima, por ejemplo, pasta de HW o pasta de SW, existe una composición de polisacárido diferente en el producto final de NFC. En términos generales, los grados nativos o no modificados tienen diámetros mayores y una distribución de tamaño de las fibrillas más amplia, mientras que los grados modificados tienen diámetros menores y distribuciones de tamaño más estrechas.

Los grados modificados de NFC se pueden mezclar con un grado nativo para mejorar la unión de ciertos compuestos al gel o para modificar otras propiedades, etc.

Se entiende que el término NFC comprende también cualquier celulosa química o físicamente modificada, nanofibras de celulosa o haces de nanofibras. La modificación química puede basarse, por ejemplo, en una reacción de carboximetilación, oxidación (oxidación mediada por TEMPO), esterificación o eterificación de moléculas de celulosa. Los grados aniónicos (incluidos los oxidados) y los grados catiónicos son ejemplos de grados modificados químicamente. La modificación también se puede llevar a cabo por adsorción física de sustancias aniónicas, catiónicas o no iónicas, o cualquier combinación de las mismas, sobre la superficie de la celulosa. La modificación descrita se puede llevar a cabo antes, después o durante la producción de la NFC. Habitualmente, los grados modificados se preparan a partir de pastas blanqueadas. En los grados modificados, todas las hemicelulosas presentes se pueden modificar también junto con el dominio de celulosa.

Adecuadamente, la materia prima de celulosa, tal como pasta de celulosa, se trata previamente con ácido y base antes de la desintegración mecánica. El pretratamiento se lleva a cabo sometiendo la pasta de celulosa a tratamiento con ácido, preferentemente con ácido clorhídrico, para eliminar todos los iones de carga positiva con una carga mayor de +1, seguido de tratamiento con una base inorgánica que contiene iones de carga positiva con una carga +1, preferentemente NaOH, de modo que los iones Na^+ reemplazan a los iones anteriores. La ausencia de iones de carga positiva con una carga mayor de +1 es particularmente ventajosa en las aplicaciones del campo de la biología y la medicina, donde se puede evitar la formación compleja de ADN o proteínas con iones con cargas mayores de +1. Este pretratamiento proporciona al producto final excelentes propiedades gelificantes y una mayor transparencia. En la presente memoria, la NFC obtenida a partir de materia prima de celulosa pretratada se denomina NFC sometida a intercambio iónico y contiene sodio como contraión. Según una forma de realización de la presente invención, se utiliza adecuadamente NFC nativa sometida a intercambio iónico.

También es importante minimizar la contaminación microbiana del producto antes y durante la desintegración mecánica, tal como la fibrilación. Por ejemplo, antes de la fibrilación/desintegración mecánica, es ventajoso recoger asépticamente la pasta de celulosa de la trituradora de pasta inmediatamente después de la etapa de blanqueo, cuando la pasta todavía es estéril.

Los polisacáridos nanofibrilares pueden comprender celulosa de origen vegetal o celulosa microbiana o análogos de celulosa o cualquier combinación de los mismos. De forma particularmente adecuada, dichos polisacáridos nanofibrilares se seleccionan entre NFC nativas derivadas de plantas, NFC aniónicas, NFC nativas sometidas a intercambio iónico, nanofibrillas de quitina, nanofibrillas de quitosano y cualquier combinación de las mismas.

Habitualmente, los polisacáridos nanofibrilares tienen una relación de aspecto alta. Los polisacáridos nanofibrilares pueden comprender nanofibrillas aisladas y/o haces formados por dichas nanofibrillas. Las nanofibrillas más pequeñas son similares a las denominadas fibrillas elementales, que habitualmente tienen un diámetro de 2-12 nm. Las dimensiones de las nanofibrillas o haces de nanofibrillas dependen de la materia prima y del método de desintegración.

Los polisacáridos nanofibrilares se caracterizan por valores de retención de agua muy altos, un grado elevado de accesibilidad química y la capacidad de formar geles estables en agua. Habitualmente, el polisacárido nanofibrilar es una red densa de polisacáridos altamente fibrilados.

El diámetro promedio en número del polisacárido nanofibrilar o los haces de polisacáridos nanofibrilares puede estar comprendido entre 1 y 500 nm, según una forma de realización adecuada entre 2 y 200 nm, según otra forma de realización adecuada entre 2 y 100 nm, y según otra forma de realización adecuada entre 2 y 20 nm.

El diámetro promedio en número de la celulosa nanofibrilar nativa o no modificada está comprendido entre 2 y 500 nm, preferentemente entre 7 y 100 nm, y de la forma más preferente entre 7 y 50 nm. A partir de las imágenes de crio-TEM, también puede observarse la estructura en haces: los grados nativos son a menudo mezclas de fibrillas elementales de 7 nm y haces fibrilares de 20-50 nm, tal como puede observarse en la figura 1, que ilustra imágenes de crio-TEM de hidrogeles de celulosa nanofibrilar, NFC nativa opaca (1a) y NFC transparente aniónica (1b).

Habitualmente, las NFC modificadas son más delgadas y su diámetro promedio en número está comprendido entre 2 y 200 nm, preferentemente entre 2 y 20 nm, más preferentemente entre 2 y 6 nm.

La longitud de la celulosa nanofibrilar es hasta cierto punto difícil de medir con exactitud, pero las estimaciones

aproximadas para la longitud del grado nativo están comprendidas entre 1 y 100 micrómetros, preferentemente entre 1 y 50 micrómetros, y de la forma más preferente entre 5 y 20 micrómetros. Las NFC modificada son algo más cortas; su longitud está comprendida entre 0,3 y 50 micrómetros, preferentemente entre 0,3 y 20 micrómetros, y de la forma más preferente entre 0,5 y 10 micrómetros. Estos valores se estiman a partir de imágenes crio-TEM, SEM o AFM. Las estimaciones más exactas se basan en imágenes crio-TEM.

El grado de fibrilación se puede evaluar a partir del análisis de las fibras, en el que se evalúa el número de las entidades más grandes, solo parcialmente fibriladas. Por ejemplo, en el caso de la celulosa nanofibrilar modificada, el número de estas partículas por mg de muestra seca está comprendido entre 0 y 10.000, preferentemente entre 0 y 5.000, más preferentemente entre 0 y 1.000. Sin embargo, en la NFC no modificada, habitualmente el número de partículas no fibriladas/mg es algo mayor, y está comprendido entre 0 y 20.000, preferentemente entre 0 y 10.000, y de la forma más preferente entre 0 y 5.000. El análisis de las fibras se puede llevar a cabo adecuadamente por el método FiberLab, tal como se describe a continuación.

15 Análisis de fibras - Descripción del método FiberLab

Se pueden utilizar analizadores de fibras comerciales, siendo dispositivos adecuados, por ejemplo, los analizadores de fibras Kajaani FiberLab o FS-300. La preparación y medición de las muestras se lleva a cabo según las instrucciones para la medición típica de la rugosidad de las fibras, con las siguientes excepciones: El contenido de materia seca (DMC) se determina pesando una masa de muestra de, por lo menos, 8 g para determinar el contenido de materia seca, calentando hasta alcanzar un peso constante. La dilución de la muestra se lleva a cabo como sigue: Cantidad de muestra que se diluye en un recipiente de agua de 5 litros:

- 8 gramos, si el DMC es aproximadamente del 2%.
- 16 gramos, si el DMC es aproximadamente del 1%.

Se aplica el mezclador de pasta hasta que desaparecen todos los haces de fibrillas visibles.

Extracción de bloques - esta función está desactivada.

Se toma una muestra de 50 ml del recipiente de 5 litros para la medición. Se calculan las "fibras por miligramo" a partir de las mediciones:

$$\text{FPM} = \text{ADF} / (\text{Mw} * \text{DMC} / 100 * \text{Vp} / \text{Vv}), \text{ donde}$$

FPM = fibras por miligramo [pcs/mg]

ADF = cantidad de fibras detectadas [pcs]

* Este es el número de partículas detectadas

Mw = cantidad de muestra que se diluye en un recipiente de agua de 5 litros [mg]

DMC = contenido de materia seca de la muestra sin diluir [%]

Vp = volumen extraído con pipeta para el analizador [ml]

Vv = volumen del recipiente de dilución [ml].

Las propiedades ópticas de diferentes tipos de hidrogeles de NFC se pueden evaluar mediante mediciones de la turbidez de hidrogeles de NFC diluidos. Habitualmente, los hidrogeles preparados a partir de los materiales de NFC modificados son más transparentes que los grados no modificados, debido a los diámetros menores de las fibrillas. En la NFC modificada, la turbidez está comprendida entre 3 y 150 NTU, preferentemente entre 5 y 90 NTU, de la forma más preferente entre 20 y 60 NTU. La turbidez de la NFC no modificada está comprendida entre 20 y 700 NTU, preferentemente entre 40 y 500 NTU, de la forma más preferente entre 90 y 200 NTU. La turbidez se mide adecuadamente por un método turbidimétrico. A continuación se presenta un método nefelométrico para medir la turbidez de las muestras de NFC y los resultados obtenidos con diferentes grados de NFC.

Mediciones de la turbidez

Se pueden aplicar adecuadamente métodos turbidimétricos basados en nefelometría para obtener mediciones de la turbidez, y a continuación se describe un ejemplo de un método de este tipo para medir la turbidez de muestras de NFC.

Para las mediciones de turbidez se puede utilizar un turbidímetro HACH P2100 con un recipiente de medición de 50 ml que utiliza una trayectoria de luz de 1 cm y una concentración de la muestra del 0,1% calculada con respecto a la materia seca. La calibración del aparato se comprueba y se controla con botellas/muestras patrón de calibración.

Se determina la materia seca de la muestra de NFC y se cargan 0,5 g de la muestra (correspondientes al 0,1%), calculados como materia seca, en el recipiente de medición, que se llena con agua corriente hasta 500 g, y se mezcla vigorosamente por agitación durante aproximadamente 30 s. Inmediatamente la mezcla acuosa se divide en 5 recipientes de medida, que se introducen en el turbidímetro. Se llevan a cabo adecuadamente tres mediciones en cada recipiente. Se calculan el valor medio y la desviación estándar para cada muestra.

El grado de sustitución en el proceso de modificación química puede variar ampliamente. Por ejemplo, la oxidación mediada por TEMPO o N-oxilo se lleva a cabo habitualmente para valores de carga comprendidos entre 300 y 1.500 micromol/g, preferentemente entre 600 y 1.200 micromol/g, de la forma más preferente entre 700 y 1.100 micromol/g. La NFC oxidado puede contener también grupos funcionales aldehído, habitualmente entre 0 y 250 micromoles/g. La modificación por carboximetilación se lleva a cabo típicamente para pasta de celulosa hasta valores de ds comprendidos entre 0,05 y 0,3, preferentemente entre 0,08 y 0,25, de la forma más preferente entre 0,10 y 0,2, antes de la fibrilación. Si la modificación se lleva a cabo por cationización, los valores de ds están típicamente comprendidos entre 0,05 y 0,4, preferentemente entre 0,15 y 0,3.

La rigidez de los hidrogeles de NFC se puede evaluar a partir de mediciones viscoelásticas de los geles. Habitualmente, el módulo de almacenamiento de un hidrogel de celulosa nanofibrilar al 0,5% (en peso) en agua pura a pH 7 y a 25°C está comprendido entre 1 y 50 Pa, preferentemente entre 3 y 20 Pa. A menudo, la NFC modificada da lugar a hidrogeles más rígidos, pero la extensa fibrilación de estos grados también puede dar lugar a un módulo de almacenamiento menor.

Las propiedades reológicas de los hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares también se pueden evaluar controlando la viscosidad en función de la tensión de cizalladura o la velocidad de cizalladura. Los hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares muestran un comportamiento plástico, lo que significa que es necesaria una cierta tensión de cizalladura (fuerza) antes de que el material empiece a fluir fácilmente. Esta tensión de cizalladura crítica suele llamarse límite de fluencia. El límite de fluencia puede determinarse a partir de una curva de flujo en estado estacionario medida con un reómetro de tensión controlada. Si se representa la viscosidad en función de la tensión de cizalladura aplicada, se observa una brusca disminución de la viscosidad tras superarse la tensión de cizalladura crítica. Los valores de viscosidad de cizalladura cero están típicamente comprendidos entre 100 y 100.000 Pa·s, preferentemente entre 5.000 y 50.000 Pa·s, en agua a una concentración del 0,5% en peso. Para la NFC no modificada, el intervalo preferible está comprendido entre 1.000 y 10.000 Pa·s. El límite de fluencia está típicamente comprendido entre 0,1 y 50 Pa, preferentemente entre 2 y 15 Pa, en agua a una concentración del 0,5% en peso. Las propiedades viscoelásticas de los hidrogeles de quitina y quitosano nanofibrilar se parecen a la situación con los hidrogeles de nanofibras de celulosa.

Las mediciones reológicas del hidrogel de NFC se llevan a cabo adecuadamente a temperatura ambiente y a pH 7, con un reómetro rotativo de tensión controlada (AR-G2, TA instruments, Reino Unido) equipado con una geometría de paleta de cuatro palas. Los diámetros de la copa de muestra cilíndrica y la paleta son de 30 mm y 28 mm, respectivamente. La longitud de la paleta es de 42 mm. Las propiedades viscoelásticas del hidrogel se determinan con un barrido de frecuencia y un barrido de tiempo en el modo oscilatorio dinámico del reómetro a una deformación del 0,1% en peso. Todas las muestras se mezclan, adecuadamente con un mezclador Waring, antes de las mediciones (3 veces 10 s).

Composición del hidrogel

En la presente memoria, hidrogel de polisacárido nanofibrilar se refiere a una dispersión acuosa que comprende polisacáridos nanofibrilares. Se forma un gel ya a una consistencia baja en un medio acuoso. El gel es adecuadamente transparente.

El hidrogel de polisacárido nanofibrilar con la viscosidad deseada se puede formar mezclando el polisacárido nanofibrilar en un medio acuoso, tal como agua. Puede utilizarse cualquier aparato adecuado de mezcla o combinación. Sin embargo, la eficacia de la mezcla puede afectar a la estructura fina del gel, es decir, se obtienen geles más homogéneos con aparatos de mezclado más eficientes.

La pureza microbiana del hidrogel de polisacárido nanofibrilar es esencial. Por consiguiente, el hidrogel de polisacárido nanofibrilar puede esterilizarse antes de su utilización, adecuadamente utilizando cualquier método de esterilización adecuado conocido en la técnica.

También resulta ventajoso que el producto no contenga pirógenos ni residuos proteínicos, etc.

La composición puede comprender del 0,01% al 30% en peso, adecuadamente del 0,01% al 20% en peso, de polisacáridos nanofibrilares o cualquier combinación de los mismos. Adecuadamente, dicha composición comprende del 0,05% al 5% en peso, de forma particularmente adecuada del 0,07% al 4% en peso, aún más adecuadamente del 0,1% al 3% en peso de polisacáridos nanofibrilares o cualquier combinación de los mismos.

Por ejemplo, una NFC con un diámetro promedio en número de 2-40 nm proporciona transparencia al hidrogel.

Adecuadamente, el agua que se utiliza en el hidrogel puede ser agua purificada o agua esterilizada, preferentemente agua purificada sin pirógenos.

La rigidez de los hidrogeles de NFC refleja también la facilidad de esparcirse de los hidrogeles. Habitualmente, el

módulo de almacenamiento de un hidrogel de celulosa nanofibrilar al 0,5% (en peso) en agua pura a pH 7 y a 25°C está comprendido entre 1 y 50 Pa, preferentemente entre 1 y 20 Pa. A menudo, la NFC modificada da lugar a hidrogeles más rígidos, pero la extensa fibrilación de estos grados también puede dar lugar a un módulo de almacenamiento menor.

5 Los polisacáridos nanofibrilares pueden comprender NFC de origen vegetal, o NFC microbiana, o nanobrillas de quitina, o nanobrillas de quitosano, o análogos de celulosa, o cualquier combinación de los mismos. De forma particularmente adecuada, dichos polisacáridos nanofibrilares se seleccionan entre NFC nativas derivadas de plantas, NFC aniónicas, NFC nativas sometidas a intercambio iónico, nanofibrillas de quitina, nanofibrillas de quitosano y cualquier combinación de las mismas.

Ingredientes opcionales

15 La composición o el agente pueden comprender opcionalmente uno o más agentes bioactivos. Dicho agente bioactivo se refiere a una molécula o compuesto que ejerce un efecto fisiológico, terapéutico o diagnóstico in vivo. Entre los ejemplos representativos de agentes bioactivos se incluyen proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos, ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos, compuestos antivíricos, compuestos antiinflamatorios, compuestos antibióticos, tales como compuestos antifúngicos y antibacterianos, agentes de diferenciación de células, analgésicos, agentes de contraste para diagnóstico médico por imagen, enzimas, citocinas, anestésicos, antihistamínicos, agentes que actúan sobre el sistema inmunitario, es decir, inmunomoduladores, agentes hemostáticos, hormonas, agentes angiogénicos o antiangiogénicos, neurotransmisores, oligonucleótidos terapéuticos, partículas virales, vectores, factores de crecimiento, retinoides, factores de adhesión celular, glucoproteínas de la matriz extracelular, factores osteogénicos, anticuerpos y antígenos, esteroides y analgésicos. Los agentes bioactivos pueden encontrarse en su forma de base o ácido libre, o en forma de sales, ésteres o cualquier otro derivado farmacológicamente aceptable, formas enantioméricamente puras, tautómeros o como componentes de complejos moleculares. La cantidad de agentes bioactivos en la composición puede variar dependiendo del agente bioactivo en particular, el efecto deseado y el intervalo de tiempo en el que se va a administrar la composición.

30 Entre los ejemplos de las clases de antibióticos que se pueden incluir en la composición se incluyen aminoglucósidos (por ejemplo, estolato/etilsuccinato, gluceptato/lactobionato/estearato de tobramicina, amikacina, gentamicina, kanamicina, netilmicina, tobramicina, estreptomycin, azitromicina, claritromicina, eritromicina, neomicina, eritromicina), beta-lactámicos como penicilinas (por ejemplo, penicilina G, penicilina V, metilicina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, ampicilina, amoxicilina, ticarcilina, carbenicilina, mezlocilina, azlocilina y piperacilina), cefalosporinas (por ejemplo, cefalotina, cefazolina, cefaclor, cefamandol, cefoxitina, cefuroxima, cefonicida, cefmetazol, cefotetán, cefprozil, loracarbef, cefetamet, cefoperazona, cefotaxima, ceftizoxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima, cefixima, cefpodoxima y cefsulodina), fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina), carbapenems (por ejemplo, imipenem), tetraciclinas (por ejemplo, doxiciclina, minociclina, tetraciclina), macrólidos (por ejemplo, eritromicina y claritromicina), monobactams (por ejemplo, aztreonam), quinolonas (por ejemplo, fleroxacina, ácido nalidíxico, norfloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina, enoxacina, lomefloxacina y cinoxacina), glucopéptidos (por ejemplo, vancomicina, teicoplanina), cloranfenicol, clindamicina, trimetoprim, sulfametoxazol, nitrofurantoína, rifampicina y mupirocina, y polimixinas, como PMB, oxazolidionas, imidazoles (por ejemplo, miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol y tioconazol), triazoles (por ejemplo, fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol y albaconazol), tiazoles (por ejemplo, abafungin) y alilaminas (por ejemplo, terbinafina, naftifina y butenafina), equinocandinas (por ejemplo, anidulafungina, caspofungina y micafungina). Otros antibióticos pueden incluir poligodial, ácido benzoico, ciclopirox, tolnaftato, ácido undecilénico, flucitosina o 5-fluorocitosina, griseofulvina y haloproquina.

50 Entre los ejemplos de agentes antimicrobianos que se pueden incluir en la composición se incluyen partículas de plata, particularmente nanopartículas de plata, agentes o compuestos que liberan iones de plata, gluconato de clorhexidina y polihexametileno biguanida.

55 Entre los ejemplos de anestésicos que se pueden incluir en la composición se incluyen procaína, benzocaína, cloroprocaína, cocaína, ciclometacaína, dimetocaína, piperocaína, propoxicaína, procaína, novocaína, proparacaína, tetracaína, lidocaína, articaína, bupivacaína, cincocaína, etidocaína, levobupivacaína, mepivacaína, prilocaína, ropivacaína y trimecaína. En algunas formas de realización, el anestésico es una combinación de lidocaína y prilocaína.

60 Entre los ejemplos de analgésicos que se pueden incluir en la composición se incluyen los opiáceos y análogos de los mismos. Entre los ejemplos de opiáceos se incluyen morfina, codeína, oxicodona, hidrocodona, dihidromorfina, petidina, buprenorfina, tramadol, fentanilo y venlafaxina.

Un ejemplo de agente hemostático que se puede incluir en la composición es la trombina.

65 Entre los ejemplos de compuestos antiinflamatorios que se pueden incluir en la composición se incluyen

5 hidrocortisona, cortisona, dexametasona, fluocinolona, triamcinolona, medrisona, prednisolona, flurandrenolida, prednisona, halcinonida, metilprednisolona, prednisona, halcinonida, metilprednisolona, fludrocortisona, corticosterona, parametasona, betametasona, ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, fenbufeno, flurbiprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, suprofeno, indometacina, piroxicam, ácido acetosalicílico, ácido salicílico, diflunisal, salicilato de metilo, fenilbutazona, sulindac, ácido mefenámico, meclofenamato de sodio y tolmetina.

10 Entre los ejemplos de antihistamínicos que se pueden incluir en la composición se incluyen difenhidramina, dimenhidrinato, perfenazina, triprolidina, pirlamina, clorciclizina, prometazina, carbinoxamina, tripelenamina, bromfeniramina, hidroxizina, ciclizina, meclizina, clorprenalina, terfenadina y clorfeniramina.

15 Entre los ejemplos de factores de crecimiento que se pueden incluir en la composición se incluyen factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"), factores de crecimiento nervioso, tales como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos, incluidos, por ejemplo, aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos, factor de necrosis tumoral, factores de crecimiento transformante (TGF), incluidos, entre otros, TGF-alfa y TGF-beta, incluidos TGF-beta1, TGF-beta2, TGF -beta3, TGF-beta4 o TGF-beta5, factores de crecimiento insulinoideos I y II (IGF-I e IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), neurotrofina 3 (NT-3) y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

20 Entre los ejemplos de inmunomoduladores que se pueden incluir en la composición se incluyen ciclosporina A, guanilhidrazona, azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida y tacrolimus.

25 Opcionalmente, la composición o el agente pueden comprender células. Las células pueden ser de cualquier tipo y entre ellas pueden incluirse células madre, células indiferenciadas, células precursoras, así como células completamente diferenciadas y combinaciones de las mismas. En algunas formas de realización, las células comprenden tipos de células seleccionados entre el grupo que comprende queratocitos, queratinocitos, fibroblastos, células epiteliales y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, las células se seleccionan entre el grupo que comprende células madre, células progenitoras, células precursoras, células del tejido conjuntivo, células epiteliales, células musculares, células neuronales, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, células de músculo liso, células estromales, células mesenquimales, células del sistema inmunitario, células hematopoyéticas, células dendríticas, células del folículo piloso y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, las células del sitio de la herida utilizan la composición, particularmente el hidrogel, como un andamio para crecer y migrar al lecho de la herida. Se pueden añadir agentes bioactivos a la composición para modificar diversas actividades o propiedades de las células, tales como el crecimiento y la proliferación celulares, la adhesión celular, la diferenciación, la migración, el mantenimiento de los estados indiferenciados, la secreción de la matriz extracelular y la secreción de moléculas, incluidos factores de crecimiento, prostaglandinas, citocinas y similares.

40 En algunas formas de realización, la composición puede incluir, opcionalmente, agentes nutricionales, tales como vitaminas, aminoácidos esenciales y no esenciales, grasas esenciales y no esenciales y combinaciones de las mismas, ácido hialurónico, derivados del ácido hialurónico, gel de aloe vera, propilenglicol, [beta]-1,3-glucano y sustancias tampón para mantener el pH de la composición en el intervalo de 4 a 9.

45 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar puede tener, opcionalmente, un material de refuerzo unido al mismo. En algunas formas de realización, el material de refuerzo proporciona una protección y/o soporte adicional. En algunas formas de realización, el material de refuerzo puede servir para impedir la observación visual de la herida a través del hidrogel transparente de celulosa, especialmente en situaciones en las que no es deseable que la herida sea visible (o que el ojo esté expuesto a la luz). En algunas formas de realización, el material de refuerzo no es permanente, puede extraerse libremente y puede volverse a colocar, si es necesario. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el material de refuerzo puede ser retirado por un profesional de la salud para evaluar el progreso de la cicatrización de la herida mediante la inspección de la misma a través de la membrana de hidrogel de celulosa. En algunas formas de realización, el material de refuerzo puede presentarse en forma de una o más capas de celulosa (por ejemplo, microbiana o de origen vegetal), un poliéster, un poliuretano, un polietilenglicol o un derivado de los mismos, un acrílico-vinilpirrolidona, un ácido metacrílico, un isobutileno de silicona, un isopreno o un estireno, o combinaciones de los mismos.

55 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar se puede incorporar, opcionalmente, en un soporte, tal como una gasa o un material no tejido.

60 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar puede incorporarse o embalsarse en un dispositivo de aplicación, tal como una jeringa, un aplicador, una bomba o un tubo que contienen la cantidad deseada del hidrogel, tal como jeringas con un tamaño de 0,5 ml a 200 ml, o incluso más. Dicho dispositivo puede comprender una boquilla o tobera que proporciona un flujo constante del hidrogel con el grosor, la anchura y la geometría deseados. Estos dispositivos "listos para el uso" pueden envasarse, esterilizarse y almacenarse, y utilizarse cuando se desee. Estos dispositivos de aplicación pueden incorporarse en kits listos para el uso.

65 La presente invención da a conocer, además, procedimientos para el control y la prevención de la contracción en relación con el tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas o la reparación de tejidos en un individuo que lo

necesita, que comprende poner en contacto la herida o la membrana mucosa o el tejido con una cantidad eficaz de un hidrogel de polisacárido nanofibrilar según la presente invención.

5 La presente invención da a conocer, además, procedimientos para el control y la prevención del desarrollo de fibrosis en relación con el tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas o la reparación de tejidos en un individuo que lo necesita, que comprende poner en contacto la herida o la membrana mucosa o el tejido con una cantidad eficaz de un hidrogel de polisacárido nanofibrilar según la presente invención.

10 Entre los ejemplos de los tipos de heridas y tejidos para los que se puede utilizar la composición de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, heridas cutáneas, quemaduras, heridas crónicas, heridas de las membranas mucosas y úlceras, así como heridas en tendones. Otros ejemplos de heridas son heridas causadas por cirugía láser, radiación, quemaduras químicas, tratamientos contra el cáncer, sitios de escisión de biopsia, patógenos, heridas por arma de fuego o arma blanca, cirugía estética y cirugía reconstructiva, y similares. Entre las úlceras se incluyen úlceras neuropáticas, úlceras de decúbito, úlceras por estasis venosa y úlceras diabéticas, y similares.

15 Adecuadamente, el hidrogel de polisacárido nanofibrilar se puede utilizar para el tratamiento de sitios donantes (sitios que el médico aprovecha para recolectar piel para el injerto) y sitios receptores en relación con la terapia que comprende injertos de piel, tales como terapia por STSG y FTSG.

20 Dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar puede utilizarse de forma particularmente adecuada en heridas de grado II y grado III, en heridas de grosor parcial (por ejemplo, quemaduras de segundo grado, heridas quirúrgicas o heridas que mantienen intacta la mayor parte de la dermis, que pueden regenerarse a partir de la zona de la herida), así como en heridas más graves, de grado IV. Los injertos pueden ser injertos en malla o puede utilizarse un injerto de piel troceada reclutada o un injerto de lámina epidérmica. El hidrogel de polisacárido nanofibrilar también puede aplicarse en el contexto de la técnica del colgajo.

25 En los injertos de piel, puede utilizarse cualquier técnica y cualquier agente de fijación conocidos para fijar el injerto, y el hidrogel de polisacáridos pueden aplicarse directamente al injerto sin necesidad de utilizar apósitos. Sin embargo, si se desea, pueden utilizarse apósitos de protección.

30 En los pacientes diabéticos se dan dificultades sistémicas, tales como la presencia de neuropatía, disfunción endotelial y mayor susceptibilidad a infecciones, neuropatía porque el paciente no siente dolor y con frecuencia no es consciente de la gravedad de la herida hasta que la infección se extiende a puntos más cercanos, a menudo junto con obstáculos específicos del paciente, todo lo cual dificulta la atención de las úlceras crónicas en pacientes diabéticos. El hidrogel de polisacárido nanofibrilar se puede utilizar para mejorar el tratamiento de las úlceras diabéticas, particularmente en el contexto de la terapia por STSG de úlceras crónicas, en la que se puede mantener una hidratación suficiente, se promueve la epitelización, se controla la contracción y se impide la translocación de bacterias a través de la misma.

35 Otras aplicaciones adecuadas del hidrogel de polisacárido nanofibrilar se dan en los sobreinjertos dérmicos, en los que se aplica un STSG a un lecho o dermis receptores o a un tejido de cicatriz sin piel; en injertos expandidos; en el tratamiento de cicatrices inestables, deprimidas, onduladas o hipertróficas; y en el tratamiento de injertos de piel inestables o hiperpigmentados, nevus grandes pigmentados, lesiones por radiación, vitíligo y eliminación de tatuajes.

40 Las quemaduras provocan lesiones cutáneas particularmente complejas que dañan considerablemente las diversas capas de la piel. Generalmente, las quemaduras se definen, según su profundidad y alcance, entre de primer grado (superficiales) y de tercer grado (destrucción total de la epidermis y la dermis). El protocolo estándar de curación de las quemaduras subraya diversos factores que aceleran el proceso de cicatrización óptima: (a) control de la pérdida de líquidos; (b) bloqueo a una infección de la herida; (c) cierre rápido y eficaz de la herida, óptimamente con injertos de piel o sustitutos de la piel; y (d) alivio significativo del dolor. El hidrogel de polisacárido nanofibrilar de la presente invención proporciona medios para mejorar uno o más de estos factores.

45 Los hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares, adecuadamente los que comprenden NFC derivadas de plantas, habitualmente tienen un límite de fluencia significativamente alto y una viscosidad de cizalladura cero alta a bajas concentraciones. Los hidrogeles muestran un comportamiento pseudoplástico a velocidades de cizalladura más altas, lo que permite una fácil dispensación de hidrogeles viscosos. Cuando los hidrogeles se someten a cizalladura (por ejemplo, en un reómetro o un tubo), la fase dispersa tiende a alejarse de los límites sólidos, lo que da lugar a la creación de una capa de líquido de menor viscosidad en las paredes del recipiente. Este fenómeno comporta que la resistencia al flujo, es decir, la viscosidad, es inferior en los límites que en el grueso de la dispersión. En consecuencia, la dispersión o inyección del hidrogel a la herida con un aplicador, tal como una jeringa o una pipeta, resultan sencillas incluso a concentraciones más elevadas (hasta del 4%), a fin de proporcionar una cantidad uniforme y deseada del hidrogel a la herida, incluso con una configuración o forma más complicada. De este modo, el hidrogel puede aplicarse uniformemente incluso a heridas y lechos de heridas irregulares, pequeños o complicados en cualquier otro sentido. Este fenómeno permite además una fácil dispensación del hidrogel con una mínima perturbación de las partículas (componentes bioactivos, etc.) dispersadas en el mismo.

El hidrogel de polisacárido nanofibrilar tiene una permeabilidad hidráulica y una permeabilidad difusiva excelentes.

5 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar proporciona una buena adherencia al lecho de la herida y una buena barrera física a infecciones, impidiendo la entrada de bacterias en la herida. Dado que habitualmente el hidrogel es transparente, la herida puede ser inspeccionada sin necesidad de retirar el hidrogel. Las proteasas no son capaces de degradar el hidrogel.

10 Además, el hidrogel de polisacárido nanofibrilar se puede retirar fácilmente de la zona de aplicación (herida), por ejemplo con enzimas, aprovechando la degradación enzimática de las moléculas de celulosa. Entre las enzimas apropiadas para ello se encuentran, por ejemplo, las celulasas disponibles en el mercado. Alternativamente, el gel también se puede diluir con un líquido acuoso (solución salina, agua purificada) y a continuación lavarse el hidrogel en el sitio (herida).

15 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar puede tener el potencial de detener la hemorragia de las heridas (hemostasis) y puede incluir agentes que promueven la coagulación, como la trombina.

20 Si se desea, el hidrogel de polisacárido nanofibrilar que se aplica al sitio de la herida puede cubrirse con un apósito secundario, una película o una membrana.

Según algunas formas de realización, el hidrogel de polisacárido nanofibrilar permite la proliferación celular sobre el hidrogel o dentro del mismo para facilitar la cicatrización de la herida. Las células se pueden inocular en el hidrogel antes o durante la aplicación del hidrogel a la herida.

25 Además, dichos hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares se pueden utilizar para cerrar temporalmente la herida con el fin de prevenir la contracción de la herida, la contaminación bacteriana y la pérdida de líquidos. Esto proporciona una alternativa al uso temporal de injertos de piel alogénos o xenógenos.

30 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar también se puede utilizar en la intervención, a la mayor brevedad posible tras producirse la lesión. Se puede proporcionar en forma estéril como cubierta temporal inmediata para todo tipo de lesiones, incluidas quemaduras o heridas físicas, tales como disparos, cortes por navaja, hematomas, contusiones, desgarros, etc.

35 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar permite una excelente penetración y amoldamiento a todos los contornos de la herida y el tejido, y proporciona un entorno húmedo adecuado.

40 Otra ventaja interesante del hidrogel de polisacárido nanofibrilar es su transparencia o translucidez, que permite la observación clínica continua del progreso de la cicatrización. También facilita el proceso de eliminación de desechos necróticos (desbridamiento autolítico), mejora el desarrollo del tejido de granulación, acelera todo el proceso de reepitelización y angiogénesis, y ayuda a mantener limpia la base de la herida. El hidrogel de polisacárido nanofibrilar se puede lavar fácilmente y suavemente de la lesión o herida con agua y reemplazarse con un nuevo hidrogel de polisacárido nanofibrilar, si es necesario.

45 Promueve el proceso de cicatrización óptima y proporciona un control de la pérdida de líquidos, así como una barrera frente a la infección de la herida y un cierre eficaz de la herida sin una contracción no deseada. Dado que las terminaciones nerviosas quedan aisladas, se reduce el dolor que produce la lesión. También encuentra aplicación en el tratamiento de heridas crónicas y úlceras.

50 Los resultados que se presentan en los ejemplos 3 y 4 indican que el hidrogel de polisacárido nanofibrilar controla e inhibe la contracción en un grado sorprendente, tal como puede observarse particularmente en la aplicación de STSG. De este modo, la utilización de dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar, que comprende particularmente NFC nativa derivada de plantas, ayuda a prevenir la contracción y la formación de la fibrosis inducida por la contracción y las restricciones de movimiento cuando se aplica la terapia por STSG en los pacientes. También se observó que el polisacárido nanofibrilar no tiene ningún efecto negativo en la epitelización. No se observó crecimiento bacteriano durante el tratamiento de 2 a 4 semanas con el hidrogel de polisacárido nanofibrilar. El sitio de la herida tras la cicatrización comprende menos formación de cicatrices y contracciones.

60 Fue sorprendente el hecho de que la contracción se pudiera controlar y prevenir de manera muy eficiente a la vez que no se impedía la difusión de las células epiteliales. El hidrogel de polisacárido nanofibrilar también proporciona un entorno ideal para la granulación y la reepitelización, y evita la translocación de bacterias a través del mismo.

65 Se sabe que los miofibroblastos contribuyen a la contracción de la herida y la aparición de cicatrices. Por consiguiente, se puede entender que prevenir la contracción de la herida forma parte del proceso en el que el material de hidrogel impide el cambio de fenotipo de los fibroblastos a miofibroblastos de deposición activa de colágeno y contracción de heridas.

La estructura única del hidrogel viene proporcionada por el polisacárido nanofibrilar, por lo que dicho hidrogel, debido a sus propiedades reológicas, proporciona al mismo tiempo un producto de fácil dispersión, que rellena todos los huecos y cavidades, y una red nanofibrilar para el proceso de cicatrización de la herida.

5 Además, las propiedades particularmente de las NFC derivadas de plantas, tales como los efectos antiinflamatorios, sin pirógenos, sin residuos químicos (en particular, la NFC nativa), proporcionan beneficios adicionales a la presente invención.

10 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar también es particularmente adecuado para el tratamiento del sitio donante, ya que proporciona un mantenimiento adecuado de la hidratación en dicho sitio e impide la contracción y la translocación de bacterias a través del mismo, y ayuda a controlar el dolor, opcionalmente en combinación con un anestésico.

15 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar es fácil de utilizar y aplicar en el sitio deseado, por lo que puede disminuirse el tiempo necesario en quirófano. Hasta ahora no se ha dispuesto de ningún vendaje ni tratamiento ideal del sitio donante, que alivie el dolor y las molestias y proporcione una cicatrización óptima.

20 Además, el hidrogel de polisacárido nanofibrilar se puede utilizar en el tratamiento de lesiones de los tendones, y en particular para el control y la prevención de la contracción durante la reparación de tejidos.

El hidrogel de polisacárido nanofibrilar también se puede utilizar en el tratamiento de heridas de las membranas mucosas.

25 El hidrogel de polisacárido nanofibrilar es inerte, no alergénico, antiinflamatorio, no tóxico, no pirógeno, de fabricación sencilla y económica, y promueve la migración natural de células huésped al sitio de la herida.

El hidrogel de polisacárido nanofibrilar es muy estable, puede almacenarse a cualquier temperatura deseada y se puede esterilizar.

30 Cualquiera de las formas de realización descritas en la presente memoria se puede implementar en el contexto de un método, un kit, un reactivo o una composición.

35 Los siguientes ejemplos son ilustrativos de formas de realización de la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente, y no pretenden limitar la invención en ningún sentido. La presente invención se ilustra también haciendo referencia a las figuras.

Ejemplos

40 Los siguientes materiales de hidrogel se utilizaron en experimentos de cicatrización de heridas:

Hidrogel opaco de NFC nativa no modificada

- 45 - Concentración 1,5% en peso en agua
- Estéril, tratado en autoclave
- Translúcido u opaco, turbidez 139 NTU
- 50 - Carga superficial ligeramente aniónica, -2 mV
- Contraión de sodio
- Diámetro de fibra promedio en número 7 nm de nanofibras + 20-50 nm de haces de fibrillas, longitud de varios micrómetros
- 55 - Número de partículas no fibriladas: 100-200 partículas/mg, método FiberLab
- Composición de hidratos de carbono: 72,8% de glucosa, 25,6% de xilosa, 1,4% de manosa
- 60 - Fibrilado con fluidizador industrial (Microfluidics Ltd.)
- Viscosidad de cizalladura cero de muestra al 0,5% en peso de 8.000 Pa-s y límite de fluencia de 5 Pa.
- 65 - Viscosidad de cizalladura cero de muestra al 1,0% en peso de 30.000 Pa-s y límite de fluencia de 20 Pa.
- Módulo de almacenamiento de muestra al 0,5% en peso $G' = 10$ Pa

Hidrogel transparente de NFC modificada

- 5 - Oxidación mediada por TEMPO antes de la fibrilación, contenido de ácido carboxílico 1.000 micromol/g
- Concentración 0,8% en peso en agua
- Transparente, turbidez 10 NTU
- 10 - Carga superficial muy aniónica, -39 mV
- Diámetro de fibra promedio en número 2-6 nm, longitud 500 nm - 2.000 nm
- Número de partículas no fibriladas 100 partículas/mg, método FiberLab
- 15 - Composición de hidratos de carbono: Materia prima similar a la de grado nativo, pero después de la modificación el producto contiene también estructuras de hidratos de carbono con grupos ácido carboxílico en la posición C6.
- 20 - Fibrilado con fluidizador industrial (Microfluidics Ltd.)
- Viscosidad de cizalladura cero de muestra al 0,5% en peso de 4.000 Pa·s y límite de fluencia de 3 Pa.
- Viscosidad de cizalladura cero de muestra al 0,8% en peso de 35.000 Pa·s y límite de fluencia de 22 Pa.
- 25 - Módulo de almacenamiento de muestra al 0,5% en peso $G' = 5$ Pa

En la figura 1 se muestran imágenes crio-TEM de hidrogeles de celulosa nanofibrilar, NFC opaca nativa (1a) y NFC transparente aniónica (1b).

Hidrogel Purilon, Coloplast, Dinamarca (comparativo)

- 35 - El gel Purilon de Coloplast es un suplemento de uso común en el tratamiento de diversos tipos de heridas para mantener un entorno de la herida húmedo.
- 10% en peso de hidrogel
- Mezcla muy viscosa de agua, carboximetilcelulosa de sodio y alginato de calcio
- 40 - Estéril
- Transparente
- Viscosidad de cizalladura cero de muestra al 10% en peso de 70.000 Pa·s y límite de fluencia de 150 Pa.
- 45

Ejemplo 1

Propiedades de flujo de los hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares

- 50 Las propiedades reológicas de flujo de los hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares dan lugar a diversas características beneficiosas en el control y la prevención de la contracción en el contexto del tratamiento de heridas, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Los hidrogeles tienen una viscosidad alta a bajo cizalladura (o en reposo) para una capacidad de suspensión y una estabilidad mecánica óptimas, pero también muestran un comportamiento pseudoplástico a velocidades de cizalladura más altas, lo que permite una fácil dispensación e inyección de los mismos. La capacidad del polisacárido nanofibrilar para proporcionar estas propiedades reológicas se demostró en una serie de pruebas en la que se midió la viscosidad del hidrogel de polisacárido nanofibrilar (hidrogeles) en un amplio intervalo de tensión de cizalladura (velocidad) en un reómetro rotativo (AR-G2, TA Instruments, Reino Unido).
- 60 Las dispersiones de hidrogel de polisacárido nanofibrilar muestran viscosidades de cizalladura cero mucho más altas (la región de viscosidad constante para tensiones de cizalladura bajas) que otros polímeros comparativos solubles en agua, tal como se puede observar en la figura 2a. En dicha figura se muestra la viscosidad de dispersiones de NFC al 0,5% en función de la tensión de cizalladura aplicada en comparación con una solución al 0,5% de polímeros solubles en agua de poli(acrilamida (5.000 kDa) y CMC (carboximetilcelulosa, 250 kDa). NFC-L se refiere a NFC labilizada, aquí NFC aniónica (celulosa nanofibrilada) oxidada por oxidación mediada por radicales 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO), y NFC-N se refiere a NFC nativa no modificada sometida a un tratamiento de
- 65

intercambio iónico, siendo ambas NFC derivadas de plantas.

5 La viscosidad de cizalladura cero del hidrogel de NFC aumenta mucho por el menor diámetro de las nanofibrillas, inducido por la labilización anterior del material de partida, tal como la oxidación. La tensión a la que se inicia el comportamiento pseudoplástico ("límite de fluencia") también es considerablemente alto para los hidrogeles de NFC.

10 La capacidad de suspensión de un material también es mejor cuanto mayor es el límite de fluencia. Si el hidrogel contiene partículas sólidas incorporadas, tales como partículas de plata, partículas de fármaco o células trasplantadas, estas se estabilizan eficazmente frente a la sedimentación por los efectos combinados de la elevada viscosidad de cizalladura cero y el límite de fluencia alto y el módulo de almacenamiento alto. La fuerza gravitacional aplicada por las partículas es mucho más débil que el límite de fluencia. Así, las células suspendidas quedan "congeladas" dentro de la matriz de gel cuando se mezclan con el hidrogel de NFC o "congeladas" sobre el gel si se depositan sobre la parte superior del gel.

15 En la figura 2b, la viscosidad de los hidrogeles se presenta como una función de la velocidad de cizalladura medida. La viscosidad de dispersiones de NFC al 0,5% (NFC derivada de plantas, la misma que en la figura 2a) en función de la velocidad de cizalladura medida en comparación con poliacrilamida y CMC (carboximetilcelulosa) al 0,5%. La región típica de velocidad de cizalladura de diferentes procesos físicos se ha marcado en la figura mediante flechas. A partir de la figura 2b, es evidente que la viscosidad de las dispersiones de NFC disminuye a velocidades de cizalladura relativamente pequeñas y alcanza un nivel similar al medido para los materiales de referencia a velocidades de cizalladura de aproximadamente 200 s^{-1} .

20 La estructura reticular de la dispersión de NFC se descompone por la cizalladura. Tras la aplicación de una determinada tensión, la viscosidad del sistema disminuye bruscamente y tiene lugar una transición de un comportamiento de tipo sólido a un comportamiento de tipo líquido. Este tipo de comportamiento es beneficioso, ya que permite mezclar homogéneamente partículas sólidas en la suspensión de NFC mediante una cizalladura mecánica moderada.

30 Cuando se someten a cizalladura (por ejemplo, en un reómetro o un tubo) líquidos de dos fases, por ejemplo dispersiones de NFC floculadas, la fase dispersa tiende a alejarse de los límites sólidos, lo que da lugar a la creación de una capa de líquido de menor viscosidad en las paredes del recipiente (figura 3). Este fenómeno comporta que la resistencia al flujo, es decir, la viscosidad, sea inferior en los límites que en el grueso de la dispersión. En consecuencia, la inyección del hidrogel de NFC con una jeringa y una aguja, o con una pipeta, es fácil incluso a concentraciones altas (1-4%). Este fenómeno permite una fácil dispensación del hidrogel, en este ejemplo suspensiones celulares con una perturbación mínima de las células, es decir, la mayoría de las células están situadas en el centro de la aguja y están prácticamente en reposo. La figura 3 muestra una presentación esquemática de una dispersión de NFC (la NFC-N utilizada en la figura 2a) que contiene células dispersadas en su interior fluyendo dentro de una aguja.

40 **Ejemplo 2**

Difusión en hidrogeles de polisacáridos nanofibrilares

45 Se dispusieron 400 μl de un hidrogel de NFC nativa u oxidada al 1% (NFC aniónica oxidada por oxidación mediada por radicales 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO) y NFC nativa no modificada sometida a tratamiento de intercambio iónico, siendo ambas NFC derivadas de plantas) por filtro en el compartimento apical de placas de pocillos de filtro Transwell™ (tamaño de poro del filtro 0,4 μm). Se añadió 1 ml de PBS en el lado basolateral y se añadieron 100 μl (25 μg) de dextranos marcados con fluorescencia en la parte superior de los hidrogeles (PM de 20 k, 70 k y 250 k). La placa se fijó firmemente y se dejó reposar en un agitador de placa de pocillos. Se tomaron muestras de 100 μl del lado basolateral y se sustituyó la misma cantidad por PBS. Las primeras muestras se tomaron a intervalos de 15 minutos, otras muestras se tomaron en diferentes puntos temporales comprendidos entre 30 minutos y 2 horas, y las muestras finales se tomaron a las 24 horas. Se tomaron un total de 168 muestras. La tabla diana (OptiPlate™-96 F) se midió a longitudes de onda de excitación y de emisión de 490 nm y 520 nm, respectivamente.

55 La figura 4 muestra la difusión de dextranos de diferentes pesos moleculares a través de un hidrogel de NFC nativa al 1%. Es evidente que diferentes compuestos modelo de peso molecular son capaces de difundirse a través del hidrogel de NFC. La difusión depende del peso molecular; las moléculas más pequeñas se difunden más rápido que las grandes. La difusión a velocidad constante de las moléculas es una característica beneficiosa de los hidrogeles de NFC cuando se utilizan en tratamientos de cicatrización de heridas. Primero los metabolitos y nutrientes normales se difunden libremente en el límite de la herida y el hidrogel. Luego, las moléculas de fármaco, los iones de plata y los factores de crecimiento secretados de las células trasplantadas pueden difundirse en la interfaz de la herida.

65 La libre difusión de moléculas es especialmente beneficiosa en situaciones donde los compuestos activos se liberan lentamente desde entidades de mayor tamaño, que se estabilizan en el gel gracias al límite de fluencia y la

viscosidad de cizalladura cero elevados. Son ejemplos de este tipo de situaciones, por ejemplo, micropartículas o nanopartículas de plata que liberan iones de plata en el hidrogel, o partículas de fármaco micronizadas poco solubles en agua, o células que producen compuestos beneficiosos en el hidrogel.

5 **Ejemplo 3**

Efecto de los hidrogeles de NFC en la prevención de la contracción en un modelo porcino

Se utilizó un modelo animal porcino para simular heridas de tercer grado.

10

Materiales y métodos

Animales y anestesia

15 Se utilizaron cerdos hembra Landrace domésticos (18-26 kg) libres de patógenos de 2 meses de edad. Los animales se anestesiaron por inyección intramuscular de ketamina (4-6 mg/kg s.c.) y medetomidina (0,5 mg/kg s.c.). A lo largo de la operación se administró anestesia por infusión intravenosa de propofol (4-10 mg·kg⁻¹·h⁻¹ i.v.). El lomo de los cerdos se rasuró, se lavó a fondo y se limpió con clorhexidina al 0,5%.

20 Heridas de biopsia

Se produjeron heridas dérmicas profundas en la piel del lomo con un punzón de biopsia de 8 mm. Se administró hidrogel de NFC (NFC nativa no modificada derivada de plantas sometida a tratamiento de intercambio iónico) con una jeringa para rellenar por completo la cavidad de la herida. Las heridas no tratadas se utilizaron como control para los grupos de tratamiento. Las heridas se cubrieron con un apósito OpSite® de poliuretano (Smith & Nephew plc, Londres, Reino Unido). Se controló la cicatrización de las heridas durante 7 días o durante 14 días. En el estudio de 14 días, en el séptimo día del postoperatorio se fotografiaron las heridas, se añadió hidrogel de NFC nuevo a las heridas tratadas y se cambiaron los apósitos.

25

30 Heridas profundas, injertos de piel y sitios donantes de injertos

Se recogió un injerto de piel de 4 cm x 5 cm con un dermatoma Zimmer (Zimmer, Inc., Warsaw, IN, Estados Unidos) ajustado a 30/1.000 pulgadas. El injerto recogido se dispuso en malla en una proporción de 1:3 con un mallador de injerto de piel (Zimmer Inc). El sitio donante del injerto se utilizó como modelo de herida de grosor parcial. La mitad de la superficie del sitio donante se cubrió con hidrogel de NFC, y la otra mitad se dejó sin tratar. A continuación se cubrió el sitio donante con un apósito OpSite® (Smith & Nephew). Se practicaron heridas de grosor completo (de 4 cm x 4 cm) en la piel del lomo de los cerdos. Los injertos de piel de grosor parcial se colocaron en estas heridas y se fijaron a la herida y a la piel sana mediante grapas quirúrgicas. Se extendió un hidrogel de NFC (NFC nativa no modificada derivada de plantas sometida a tratamiento de intercambio iónico) en la parte superior del injerto y la herida de control se dejó sin tratar. Las heridas se cubrieron con Mepitel® (Mölnlycke, Gotemburgo, Suecia) y un apósito de poliuretano OpSite® (Smith & Nephew). Se controló la cicatrización de las heridas durante 7 días o durante 14 días. En el estudio de 14 días, en el séptimo día del postoperatorio se fotografiaron las heridas, se añadió hidrogel de NFC nuevo a las heridas tratadas y se cambiaron los apósitos.

35

40

45 Secciones histológicas y análisis

Las heridas se recogieron en el día 7 o en el día 14 tras producirse. Las muestras se fijaron en formaldehído y se integraron en parafina. Las secciones histológicas de las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se analizaron con un microscopio óptico. El análisis morfométrico del tamaño de la herida se llevó a cabo utilizando el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

50

Aspectos éticos

Todos los animales fueron mantenidos y tratados de acuerdo con los principios indicados en Principles of Laboratory Animal Care (NIH publications n.º 8.623, revisado en 1985). Este estudio fue aprobado por la Oficina Estatal Provincial de Finlandia del Sur (ESLH-2009-03831/Ym-23).

55

Resultados

60 Heridas de biopsia

Las figuras 5A y 5B muestran la diferencia entre las heridas tratadas con hidrogel de NFC y de control tras el seguimiento de 7 días, las tratadas con NFC a la izquierda y las de control a la derecha. Las heridas recientes de línea basal se muestran en la figura 5B. Las heridas tratadas con hidrogel de NFC presentaron una contracción de la herida drásticamente reducida. En comparación con los controles, la zona de rotura fue un 65% mayor en las heridas tratadas con gel en el séptimo día de postoperatorio (figura 5A). En la figura 6 se muestran secciones

65

histológicas de las heridas.

Heridas profundas con STSG

5 La figura 7A (control a la izquierda, gel a la derecha) muestra la morfología macroscópica de las heridas en el día 0, y la figura 7B en el día 7 tras producirse la herida. La inhibición de la contracción de la herida y el injerto es evidente (las heridas tratadas con hidrogel de NFC tenían una superficie un 20% mayor que las heridas de control sin tratar). El análisis histológico puso de manifiesto una mayor migración de células epiteliales en las heridas tratadas con hidrogel de NFC (figura 8). Se observaron algunas células gigantes, lo que sugiere una reacción local normal al material extraño.

Heridas en el sitio donante de injerto de piel

15 El análisis morfológico macroscópico del sitio donante de injerto de piel puso de manifiesto, por lo menos, una misma proporción de epitelización con el hidrogel de NFC en comparación con la zona no tratada (figura 9).

20 Las figuras 10 y 11 muestran la diferencia entre las heridas tratadas con hidrogel de NFC con injerto y las heridas de control (sin hidrogel) con injerto tras un seguimiento de 14 días. Las heridas recientes de línea basal se muestran en las figuras 10a (control) y 11a (tratadas con hidrogel de NFC), y las figuras 10b (control) y 11b (tratadas con hidrogel de NFC) muestran las mismas heridas después de 14 días. Las heridas tratadas con hidrogel de NFC presentaron una contracción de la herida drásticamente reducida tras 14 días. En comparación con los controles, la zona de rotura fue significativamente mayor en las heridas tratadas con gel de NFC en el día 14 de postoperatorio (figura 10b, 11b). Las secciones histológicas de las heridas con injerto, que confirman los descubrimientos, se muestran en las figuras 10c (control) y 11c (tratadas con hidrogel de NFC). Estos datos muestran, además, que la NFC no inhibe la epitelización de las heridas en este contexto.

Ninguna herida presentaba ningún signo de infección.

30 El material de hidrogel de NFC previno eficazmente la contracción de la herida y la contracción del STSG. La aplicación del hidrogel de NFC en la parte superior del injerto no mostró ningún efecto adverso sobre la epitelización.

35 Estos descubrimientos indican que el hidrogel de NFC controla e inhibe la contracción, tal como se observa en la aplicación de STSG, y puede prevenir la formación de fibrosis inducida por la contracción y la restricción del movimiento al aplicar la terapia por STSG en los pacientes.

Ejemplo 4

Efecto de los hidrogeles de NFC en la prevención de la contracción en un modelo porcino

40 En este ejemplo, el efecto de los hidrogeles de NFC se comparó con el hidrogel Purilon disponible en el mercado mediante una prueba de contracción de heridas. Se utilizaron hidrogel de NFC fabricado a partir de celulosa natural e hidrogel de NFC (transparente) fabricado a partir de celulosa aniónica como materiales de ensayo.

45 El material de referencia, el gel Purilon, se analizó con un reómetro. El perfil de flujo se midió directamente para el producto al 10% en peso utilizando una configuración de medición parecida a la utilizada en los materiales de NFC. El gel Purilon muestra un tipo de comportamiento de flujo parecido a los geles de NFC, es decir, una viscosidad de cizalladura cero alta (70.000 Pa-s) y un límite de fluencia alto (150 Pa). Estos valores son comparables a los hidrogeles de NFC en concentraciones comprendidas entre el 1,5% y el 3% en peso.

50 Las pruebas se llevaron a cabo tal como se describe en el ejemplo 3, como pruebas de herida de biopsia en heridas de grosor completo de 8 mm. En el día 0, se rellenaron las heridas de biopsia con hidrogel de NFC (A), hidrogel transparente de NFC (B, F) y Purilon (C, E), y se utilizó una herida sin tratar como control (D) (véase la figura 12). Se llevó a cabo un seguimiento de la contracción durante 14 días (véase la figura 13) y el porcentaje de contracción se calculó y se representó gráficamente para cada prueba. Los resultados se muestran en la figura 14.

55 Las fotografías y el análisis morfométrico muestran que el hidrogel de NFC inhibe la contracción de la herida, mientras que la herida de control y las tratadas con Purilon se contraen significativamente a los 14 días de seguimiento.

60 La presente invención se ha descrito en la presente memoria haciendo referencia a formas de realización específicas. Sin embargo, resultará evidente para los expertos en la materia que la presente invención puede modificarse dentro del alcance de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

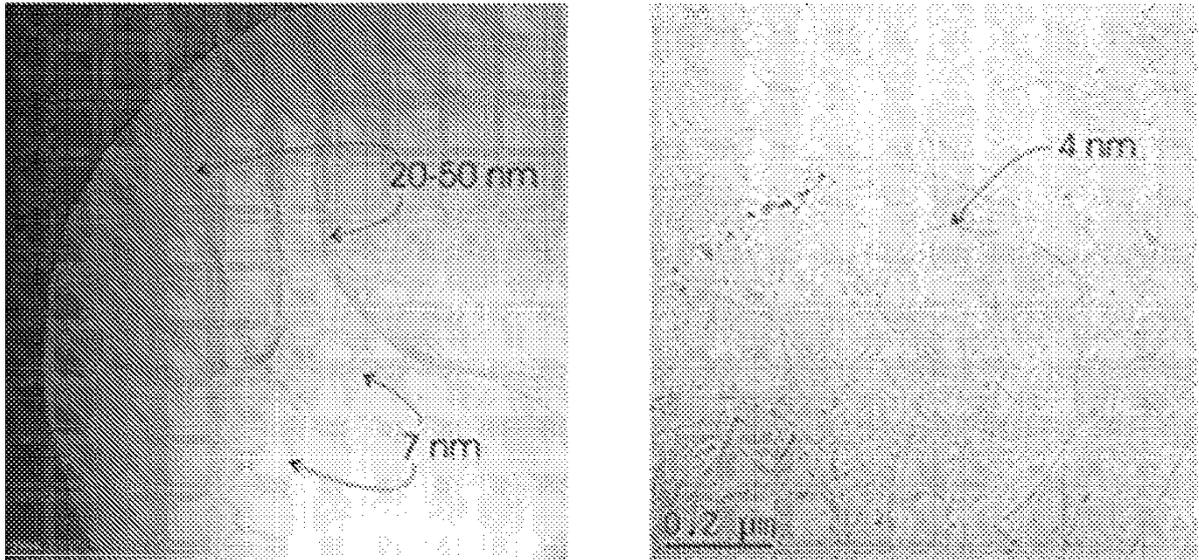
- 5 1. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar para su utilización en la prevención y el control de la formación de cicatrices y la contracción en relación con la cicatrización de heridas o la reparación de tejidos, en el que dicho polisacárido comprende celulosa y en el que dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar presenta un límite de fluencia entre 0,1 y 50 Pa en agua a una concentración de 0,5% en peso.
- 10 2. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según la reivindicación 1, en el que dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar comprende además un polisacárido seleccionado de entre hemicelulosas, quitinas, quitosanos, alginatos, pectinas, arabinoxilanos, derivados de los mismos y combinaciones de los mismos.
- 15 3. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según la reivindicación 1, en el que dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar comprende unas nanofibrillas de polisacárido y/o haces de nanofibrillas que presentan un diámetro medio en número entre 1 y 500 nm, preferentemente entre 2 y 200 nm.
- 20 4. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar comprende unos derivados y unas combinaciones de celulosas.
- 25 5. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos celulosa o derivado de la misma es obtenido de las plantas.
- 30 6. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar presenta un módulo de almacenamiento entre 1 y 50 Pa, preferentemente entre 3 y 20 Pa, en agua a una concentración de 0,5% en peso.
- 35 7. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar presenta un límite de fluencia entre 2 y 15 Pa en agua a una concentración de 0,5% en peso.
- 40 8. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho hidrogel de polisacárido nanofibrilar presenta una viscosidad de cizalladura cero entre 100 y 100.000 Pa·s, preferentemente entre 5.000 y 50.000 Pa·s, en agua a una concentración de 0,5% en peso.
- 45 9. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho polisacárido nanofibrilar es la celulosa nanofibrilar natural o la celulosa nanofibrilar aniónica.
- 50 10. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho hidrogel contiene de 0,01 a 30% en peso, preferentemente de 0,05 a 5% en peso de polisacárido nanofibrilar o cualquiera de sus combinaciones.
- 55 11. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho hidrogel comprende uno o más componentes adicionales seleccionados de entre agentes bioactivos, células y agentes nutricionales.
- 60 12. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho hidrogel presenta un material de refuerzo unido al mismo o se incorpora sobre un soporte.
- 65 13. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho hidrogel se incorpora en un material de gasa o no tejido.
14. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su utilización en la prevención y el control de la contracción en relación con la cicatrización de heridas o la reparación de tejidos.
15. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su utilización en heridas de la piel, heridas por quemadura, heridas crónicas, heridas en las membranas mucosas y úlceras, así como en heridas de los tendones.
16. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su utilización en heridas crónicas, tales como úlceras neuropáticas, úlceras de decúbito, úlceras por estasis varicosa y úlceras causadas por la diabetes y sus complicaciones.
17. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su utilización en úlceras diabéticas, particularmente en relación con la terapia por injerto de piel de grosor parcial de úlceras crónicas.
18. Hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su utilización en relación con una terapia que implica injertos de piel, tal como la terapia por injerto de piel de grosor parcial y la

terapia por injerto de piel de grosor total.

19. Dispositivo aplicador que comprende el hidrogel de polisacárido nanofibrilar según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.

5

20. Dispositivo aplicador según la reivindicación 19, en el que dicho dispositivo aplicador está incorporado en un kit.



1a

1b

Fig 1

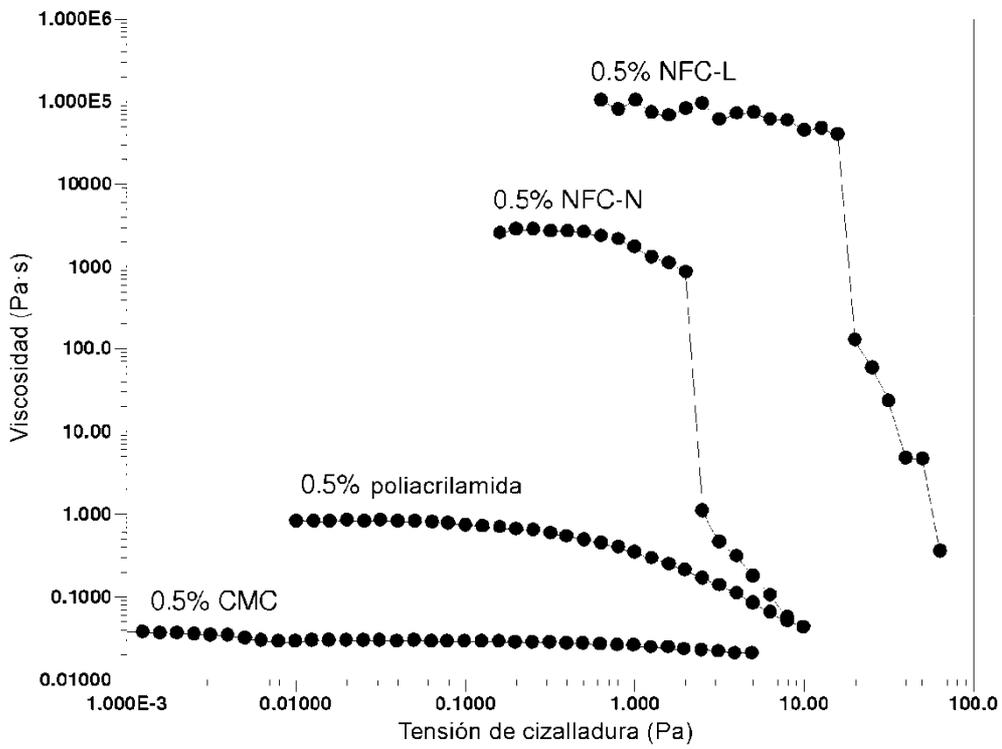


Fig. 2a

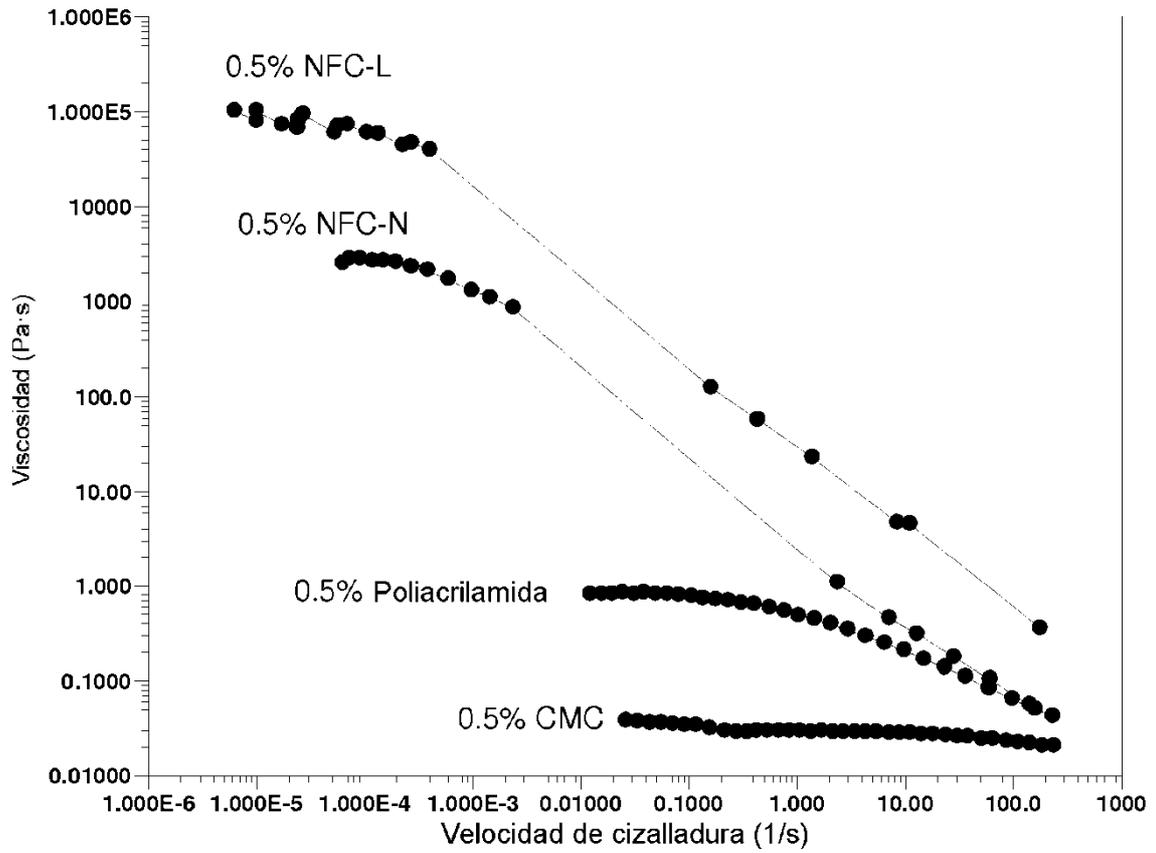


Fig. 2b

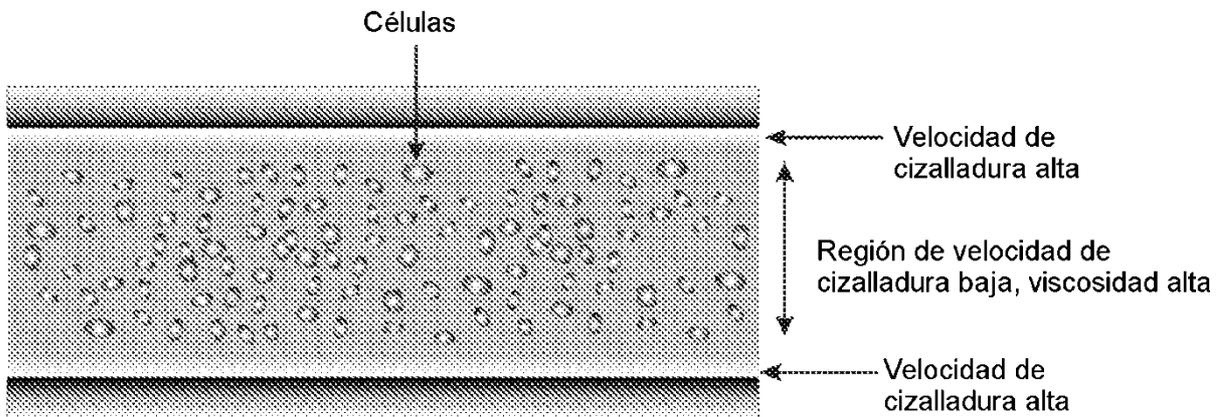


Fig. 3

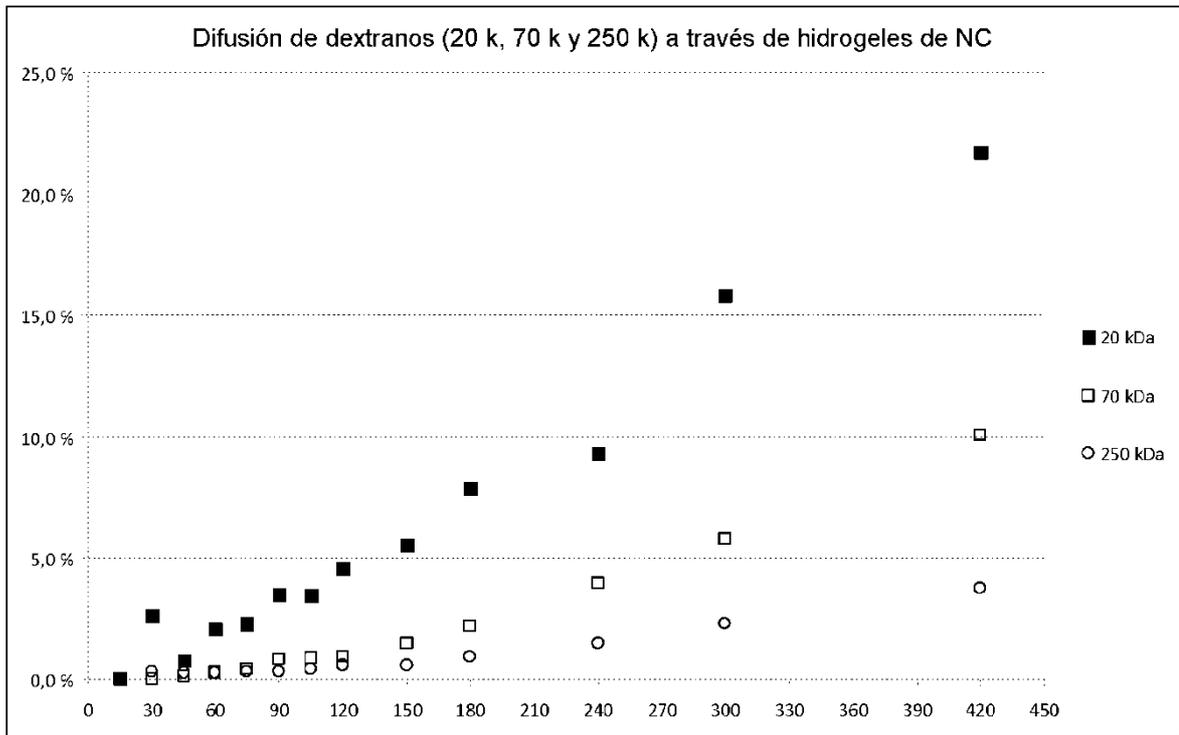


Fig. 4

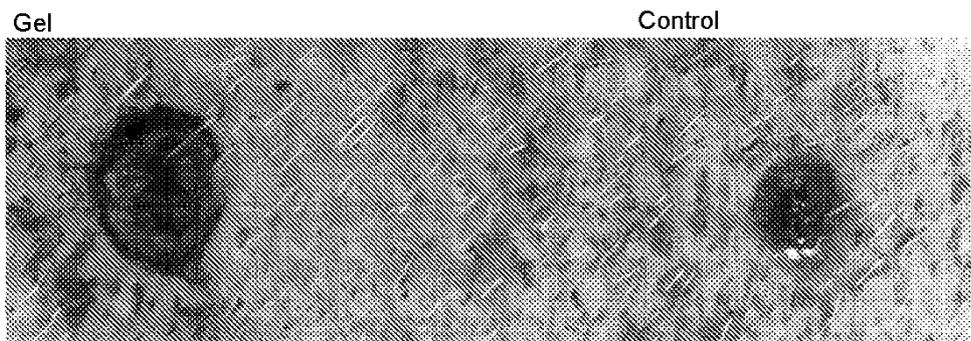


Fig. 5A

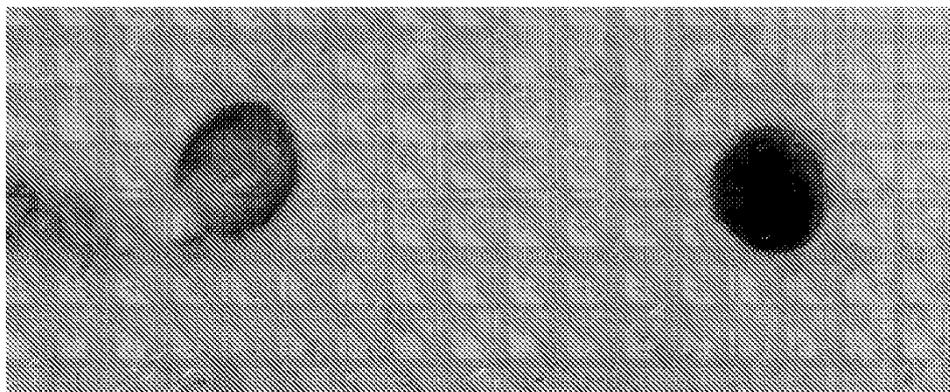


Fig. 5B

Gel

Control

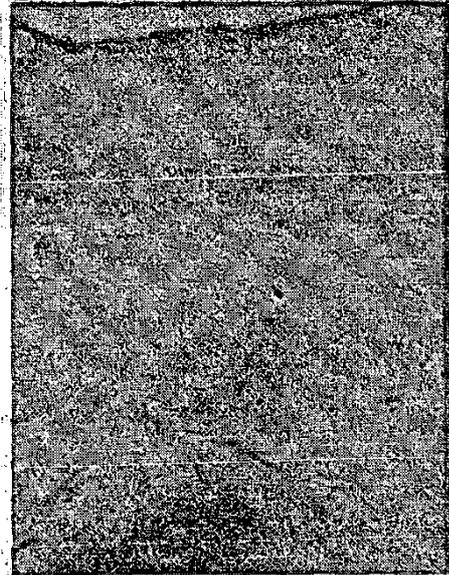
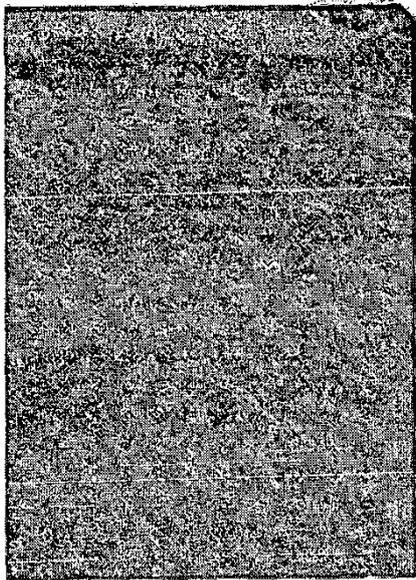


Fig. 6

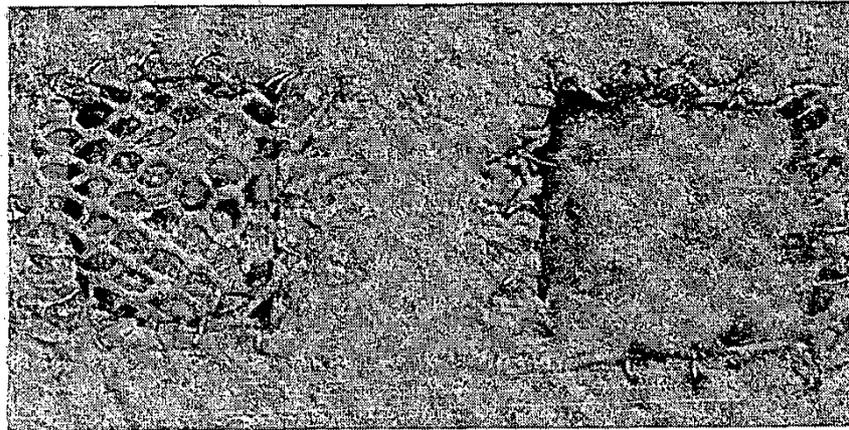


Fig 7A

Gel

Control

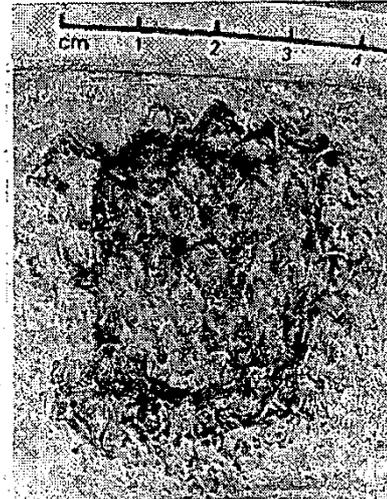
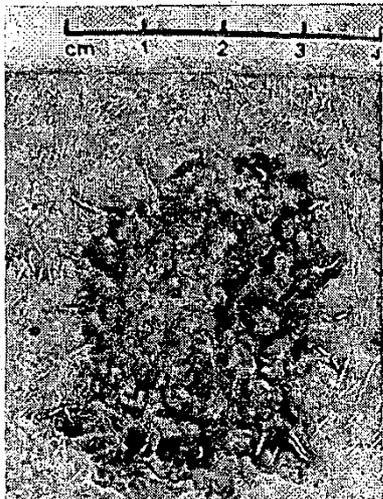


Fig. 7B

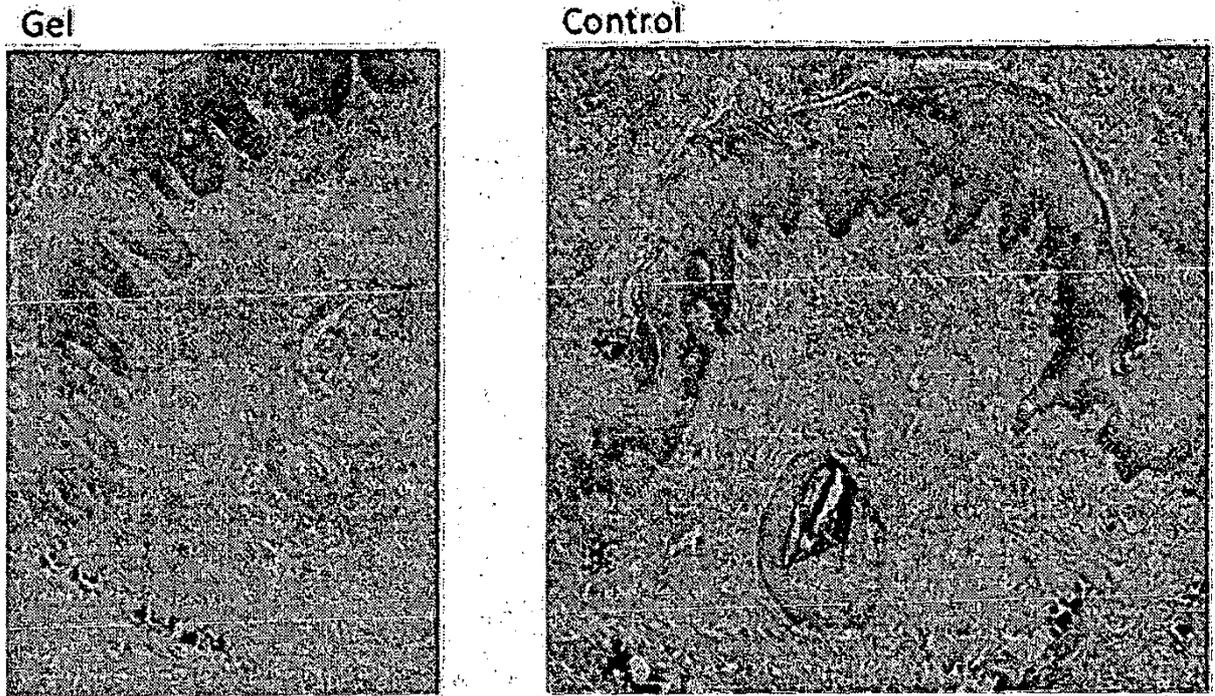


Fig. 8

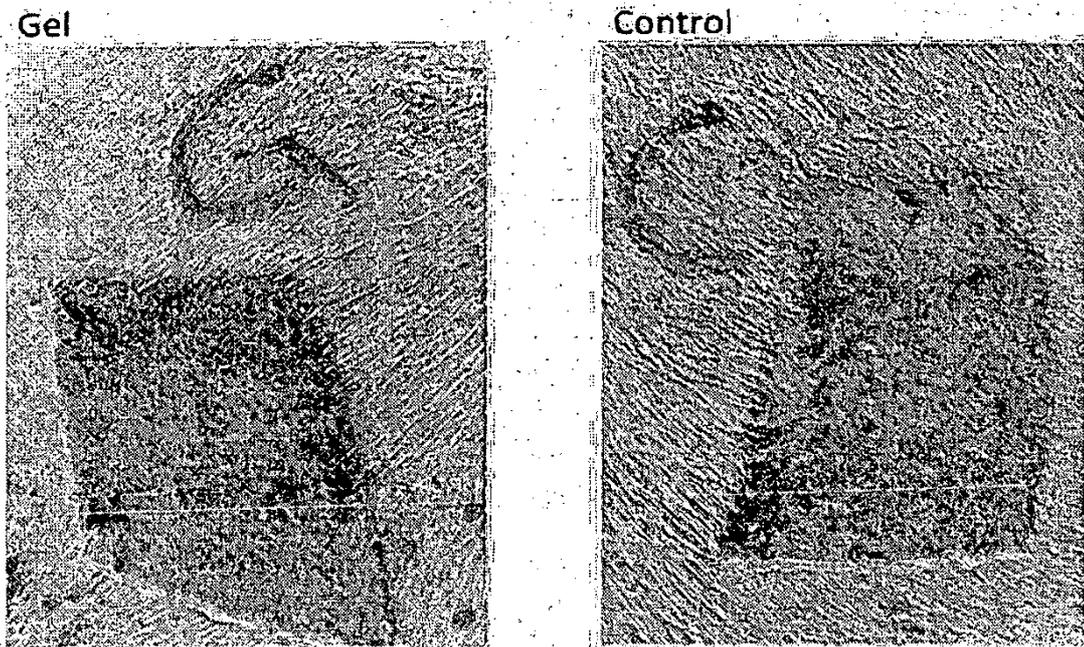


Fig. 9

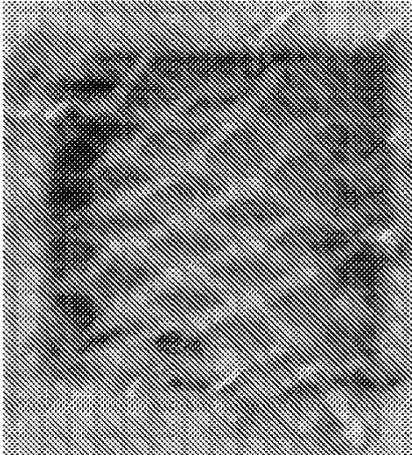


Fig. 10a

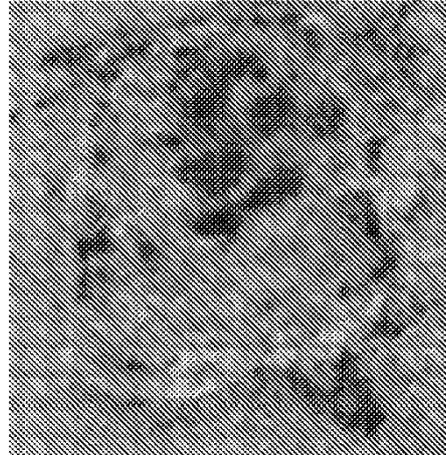


Fig. 10b

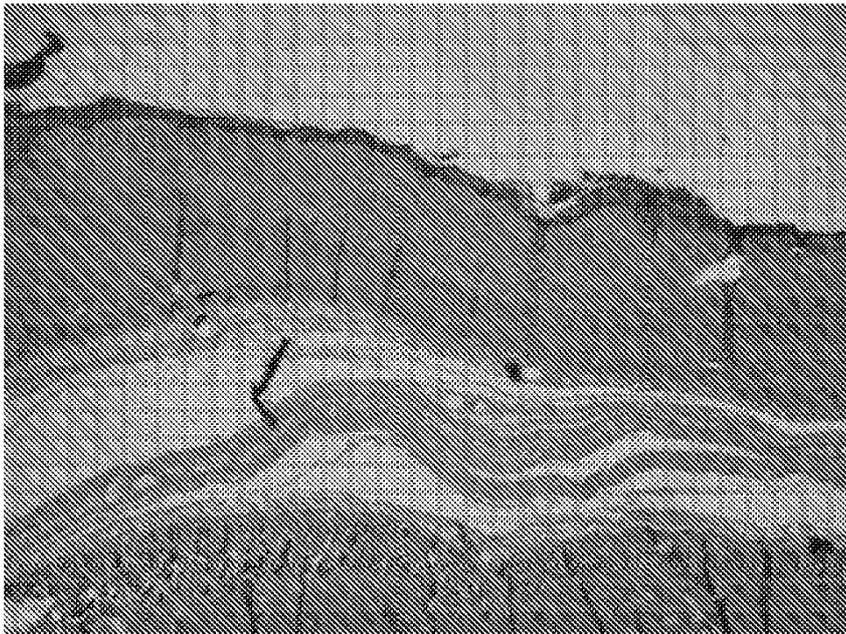


Fig. 10c

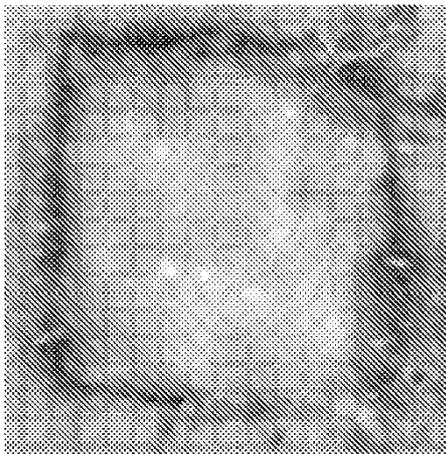


Fig. 11a

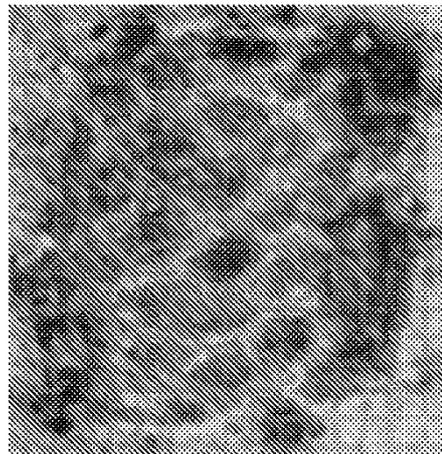


Fig. 11b



Fig. 11c

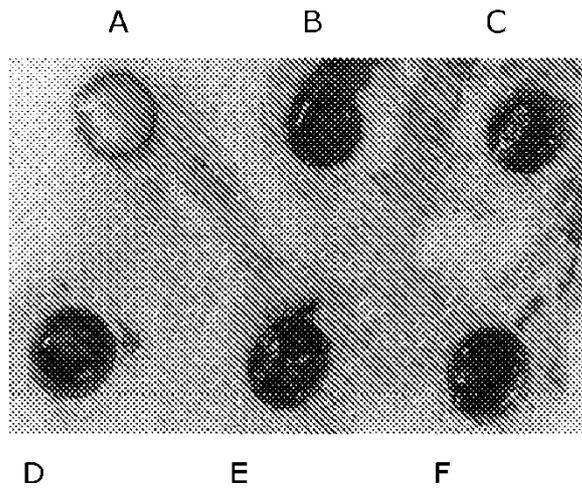


Fig. 12

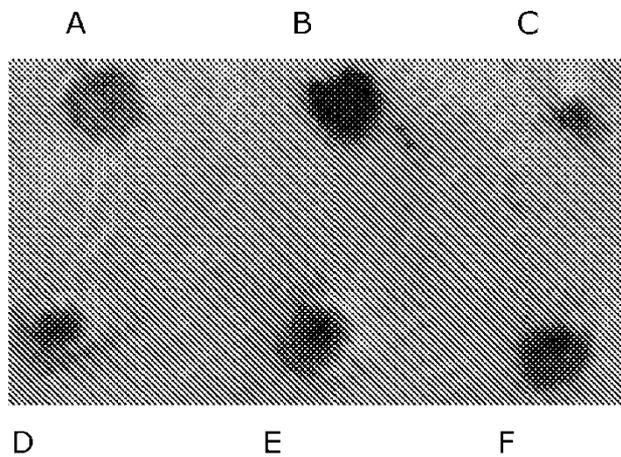


Fig. 13

Contracción de la herida a los 14 días con respecto al tamaño inicial

