

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 089**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)

**A61L 15/42** (2006.01)

**A61L 15/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2006 PCT/EP2006/001313**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.08.2006 WO06089660**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2006 E 06706920 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 1863843**

54 Título: **Procedimiento para la limpieza de colágeno marino, así como su transformación en esponjas porosas**

30 Prioridad:

**24.02.2005 DE 102005008416**

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

**04.12.2017**

73 Titular/es:

**KLINIPHARM GMBH (100.0%)  
Hauptstrasse 23  
65760 Eschborn, DE**

72 Inventor/es:

**ALUPEI, CORNELIU, IULIAN;  
RUTH, PETER;  
ROHRER, CHRISTIAN y  
SCHATTON, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 645 089 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**

Procedimiento para la limpieza de colágeno marino, así como su transformación en esponjas porosas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la limpieza de colágeno marino, en particular para la mejora del olor y de la apariencia de colágeno marino.

La invención se refiere además de ello a un procedimiento para la producción de esponjas porosas de colágeno marino, las cuales son adecuadas en particular para fines médicos.

10 El colágeno es una proteína biodegradable, como también biocompatible, la cual se usa como material de partida para múltiples usos en la industria de la alimentación, en la industria farmacéutica y cosmética, así como en la medicina.

15 Con "colágeno marino" se entiende colágeno que ha sido aislado de organismos marinos, es decir, que habitan en el mar, en particular de representantes de la cepa de las Porifera, preferentemente de *Chondrosia reniformis*.

Se conocen y se usan en la medicina muchos productos de colágeno. Forman parte de estos productos por ejemplo, esponjas, fibras o membranas.

20 Estos productos se producen predominantemente a partir de colágeno, el cual se obtiene del tejido conectivo, de la piel, de los huesos o de los tendones de mamíferos, por ejemplo, de vacuno, de caballos o de cerdos. Las desventajas esenciales de estos productos se ven en que

- 25 - habitualmente ha de servir como fuente para el colágeno una cría para obtener una suficiente cantidad de colágeno;
- el colágeno obtenido es habitualmente soluble tanto en medios ácidos, como también básicos, lo cual requiere una reacción de reticulación adicional (físicamente mediante tratamiento térmico o químicamente mediante el uso de sustancias bifuncionales), para mejorar las propiedades mecánicas del colágeno y su estabilidad en medios
- 30 líquidos;
- existe el riesgo de una contaminación con la encefalopatía esponjiforme bovina (BSE).

Como alternativa a la obtención de colágeno de mamíferos se describe en el documento WO 01/64046 un procedimiento para el aislamiento de colágeno de esponjas marinas del género *Chondrosia reniformis* (Porifera, Demospongiae).

35 En este procedimiento se coloca material de esponja de partida fresco en alcohol, a continuación se lava con agua y se mezcla con un medio de extracción, preferentemente con un valor de pH de 7 – 12. El extracto de colágeno resultante se prepara mediante el aumento del pH de la suspensión a un valor de 8 – 11, agitación, centrifugado, posterior reducción del valor de pH del sobrenadante, así como centrifugado y aislamiento del precipitado.

El colágeno de esponja que se obtiene con este procedimiento presenta sin embargo desventajas, las cuales consisten esencialmente en que

- 45 - la solución de colágeno tiene una apariencia sucia,
- el colágeno no es puro microbiológicamente, y
- los productos de este colágeno de esponja presentan un olor desagradable.

50 La tarea en la cual se basa la presente invención se basó en dejar de lado las desventajas mencionadas de colágeno marino y en poner a disposición colágeno de organismos marinos que sea adecuado también para la producción de productos para fines médicos.

La tarea se soluciona mediante un procedimiento en el cual se limpia un precipitado de colágeno mediante pasos de tratamiento químicos y se mejora debido a ello su olor y su apariencia. El colágeno purificado puede transformarse a

55 continuación mediante liofilización en esponjas porosas.

Según la presente invención el procedimiento para la limpieza de colágeno marino comprende el tratamiento de un precipitado de colágeno, como puede ser obtenido por ejemplo según el procedimiento descrito en el documento WO 01/64046, con peróxido de hidrógeno en soluciones acuosas con diferentes valores de pH.

60 Para este fin debería ajustarse en primer lugar la humedad del precipitado de colágeno a un contenido del 70 al 95 % en peso, preferentemente a un contenido del 80 al 90 % en peso. Esto puede producirse mediante escurrido del precipitado de colágeno mediante presión o una centrifugación para reducir el contenido de humedad del precipitado de colágeno en caso necesario al contenido deseado.

65

El precipitado de colágeno se suspende entonces en una solución de  $H_2O_2$  acuosa, la cual presenta un contenido de  $H_2O_2$  de 0,1 a 1 % (v/v), de forma preferente de 0,5 % (v/v). Se ajusta entonces el pH de la suspensión de colágeno a un valor de entre 11 a 13. De esta manera el colágeno pasa a solución.

- 5 Tras la incubación del colágeno con  $H_2O_2$  en condiciones alcalinas se filtra la solución de colágeno para eliminar componentes no solubles. Tras ello se precipita el colágeno de la solución, en cuanto que se añade a la solución un disolvente adecuado orgánico que puede ser mezclado con agua.

10 El precipitado de colágeno se filtra y vuelve a ajustarse su contenido de humedad a 70 – 95 % en peso, preferentemente 80 a 90 % en peso. A continuación se disuelve el colágeno nuevamente en una solución de  $H_2O_2$  acuosa, la cual presenta un contenido de  $H_2O_2$  de 0,1 a 1 % (v/v), de forma preferente de 0,5 % (v/v), y se ajusta el pH de esta solución de colágeno a un valor de entre 5 a 7, de manera que el colágeno puede usarse entonces para la producción de esponjas, membranas o fibras para fines médicos.

- 15 El ajuste del pH a un valor de entre 11 a 13 se produce preferentemente con NaOH, puede producirse no obstante también con otros hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos, como por ejemplo, KOH,  $Ca(OH)_2$  o  $Mg(OH)_2$ .

20 Como disolvente orgánico que puede ser mezclado con agua se prefieren etanol e isopropanol. La precipitación del colágeno se produce de forma preferente con una proporción de agua con respecto a etanol que se encuentra entre 1:2 y 1:3.

25 La neutralización de la solución de colágeno a pH de 5 a 7 puede producirse mediante reducción del valor de pH mediante adición de ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido propiónico, ácido láctico o ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Preferentemente el valor de pH se ajusta mediante adición de 5 N de ácido clorhídrico.

Las ventajas del procedimiento según la invención son

- 30 - un alto rendimiento en la extracción de proteína;  
- un colágeno estéril, el cual está libre de bacterias;  
- un colágeno libre de BSE, dado que las Porifera no tienen estructuras de nervios,  
- un colágeno con una apariencia atractiva, que no parece estar sucio,  
- un colágeno sin olor desagradable;  
35 - un colágeno no soluble en medios ácidos, en cuyo caso no es necesaria una reacción de reticulación adicional para mejorar sus propiedades mecánicas y estabilidad en líquidos;  
- un colágeno el cual puede usarse para la producción de vendajes para la sanación de heridas o como soporte para la regeneración de tejido.

40 Debido a estas ventajas el colágeno limpiado con el procedimiento según la invención se adecua particularmente bien para la producción de productos para fines médicos.

Son por tanto también objetivo de la invención el colágeno limpiado con el procedimiento según la invención, así como su uso para la producción de esponjas porosas, material fibroso o membranas.

- 45 La invención se refiere por lo tanto también a un procedimiento para la producción de esponjas porosas a partir del colágeno marino limpiado.

50 Las esponjas de colágeno porosas pueden producirse mediante un procedimiento en el cual se congela y se liofiliza una solución del colágeno marino obtenida por el procedimiento según la invención, después de que la solución de colágeno o bien se haya espumado mediante fuerte sacudida o agitación o se haya eliminado mediante vacío el aire contenido en la solución de colágeno, para obtener esponjas con poros más pequeños. La solución de colágeno contiene colágeno preferentemente en una concentración de 0,5 a 5 % en peso.

55 Mediante el uso de correspondientes formas, en las cuales se congela la solución de colágeno o la espuma de colágeno, pueden producirse esponjas de colágeno porosas con forma cualquiera.

60 Las esponjas de colágeno con propiedades mejoradas, en particular en lo que se refiere a su uso médico, pueden lograrse mediante un tratamiento ácido de las esponjas de colágeno, después de que se hayan liofilizado. El tratamiento ácido se produce mediante ácidos inorgánicos, preferentemente mediante inmersión de la esponja en una solución de 0,1 N de HCl. Después de ello la esponja tratada con ácido puede deshidratarse mediante congelación y liofilización, o mediante inmersión en etanol y secado al aire.

65 Con el procedimiento según la invención para la producción de esponjas de colágeno pueden producirse también esponjas de colágeno porosas con propiedades antimicrobianas. Para ello puede añadirse a la suspensión de colágeno antes de la refrigeración una sustancia de eficacia antimicrobiana. Una sustancia de eficacia antimicrobiana es sulfadiazina de plata, que se añade en una cantidad de 1 % en peso, referido a la cantidad de

colágeno en la suspensión.

De manera alternativa al modo de proceder anterior, las esponjas de colágeno porosas pueden sumergirse tras el tratamiento ácido en una solución con una sustancia de eficacia antimicrobiana. A continuación, la esponja de colágeno puede deshidratarse mediante liofilización o, siempre y cuando la sustancia de eficacia antimicrobiana no sea soluble en etanol, mediante inmersión en etanol y posterior secado al aire.

Son por lo tanto también objetivo de la invención las esponjas de colágeno porosas producidas con el procedimiento que se ha mencionado anteriormente y su uso para la producción de productos para fines médicos como por ejemplo, apósitos.

#### Ejemplo 1

Procedimiento para la limpieza de colágeno de esponja

Un precipitado de colágeno precipitado en un medio ácido (pH 3), el cual se obtuvo según el procedimiento descrito en el documento WO 01/64046, se separó del medio mediante filtración y se escurrió mediante presión hasta que se alcanzó un contenido de humedad restante de aproximadamente 84 % en peso. Las fibras de colágeno obtenidas de este modo se congelaron para el almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -20 °C.

Se suspendieron 121 gramos de las fibras de colágeno congeladas mediante agitación durante dos horas en 1300 ml de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acuosa del 0,5 % (v/v). Entonces se ajustó el pH de la solución mediante una solución de 5 N de NaOH a un valor de 12,4 para lograr una solución de las fibras de colágeno. La solución de colágeno resultante se filtró para eliminar componentes no solubles y a continuación se regó con 2600 ml de etanol (concentración 98 %) bajo fuerte agitación. El colágeno precipitado de esta manera presentó un color blanco o ligeramente amarillo, así como una apariencia fibrosa.

Las fibras de colágeno se liberaron mediante filtración del medio, se escurrieron mediante aplicación de presión o mediante centrifugación y a continuación se suspendieron de forma homogénea bajo agitación en 300 ml de una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acuosa del 0,5 % (v/v). El pH de la suspensión se ajustó con una solución de 5 N de HCl a un valor de 6,5. El ajuste del valor de pH se produjo mediante una fuerte agitación para evitar la formación de precipitados de fibras. De esta manera se obtuvo una solución de colágeno estéril con una concentración de colágeno de 2,8 % en peso.

Todos los pasos de procedimiento se llevaron a cabo a temperatura ambiente y todos los objetos, los cuales entraron en contacto con el colágeno, se limpiaron antes de su uso con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 0,5 %.

#### Ejemplo 2

Producción de esponjas porosas con colágeno de esponja limpiado

Una solución de colágeno de esponja con una concentración de colágeno de 2 % en peso y un valor de pH de 6,5 que se obtuvo según un procedimiento según el ejemplo 1, se espumó mediante agitación fuerte con ayuda de un Ultra Turrax. La espuma de colágeno se vertió en un molde rectangular de polipropileno o poliestireno. Las alturas de las capas de espuma variaron entre 2 y 8 mm. La espuma de colágeno se congeló en el molde a - 40 °C y a continuación se liofilizó.

#### Ejemplo 3

Producción de esponjas a base de colágeno de espuma precipitado

Se produjeron esponjas porosas a partir de colágeno de esponja tal como se describe en el ejemplo 2. A continuación se suministraron las esponjas liofilizadas a un tratamiento ácido de 30 minutos mediante inmersión en una solución de 0,1 N de HCl. Tras este tratamiento se lavaron las esponjas repetidamente con agua destilada hasta que se eliminaron los últimos restos de ácido.

Estas esponjas se congelaron en estado aún húmedo y se secaron mediante liofilización.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la limpieza de colágeno marino, que comprende los pasos:
  - 5 - ajustar el contenido de humedad de un precipitado de colágeno precipitado en un medio ácido a del 95 al 70 % en peso,
  - suspender el colágeno en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acuosa
  - solubilizar el colágeno mediante el ajuste del pH de la suspensión de colágeno a un valor de entre 11 y 13;
  - precipitar el colágeno con un disolvente orgánico que puede mezclarse con agua,
  - 10 - separar el colágeno mediante filtración,
  - ajustar el contenido de humedad del colágeno precipitado a del 95 al 70 % en peso,
  - resuspender el colágeno en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acuosa, y
  - ajustar el pH de la solución de colágeno resultante a un valor de entre 5 y 7.
- 15 2. Procedimiento para la fabricación de esponjas porosas de colágeno marino, comprendiendo los pasos:
  - ajustar el contenido de humedad de un precipitado de colágeno precipitado en un medio ácido a del 95 al 70 % en peso,
  - suspender el colágeno en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acuosa
  - 20 - solubilizar el colágeno mediante el ajuste del pH de la suspensión de colágeno a un valor de entre 11 y 13;
  - precipitar el colágeno con un disolvente orgánico que puede mezclarse con agua,
  - separar el colágeno mediante filtración,
  - ajustar el contenido de humedad del colágeno precipitado a del 95 al 70 % en peso,
  - resuspender el colágeno en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acuosa, y
  - 25 - ajustar el pH de la solución de colágeno resultante a un valor de entre 5 y 7,
  - espumar la solución de colágeno resultante o eliminar mediante vacío el aire contenido en la solución del colágeno resultante,
  - congelar la solución de colágeno espumada o desgasificada; y
  - liofilizar la solución de colágeno congelada.
  - 30
3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado por que** el contenido de humedad se ajusta a del 90 al 80 % en peso.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acuosa presenta un contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> del 0,1 al 1,0 % (v/v), preferentemente del 0,5 % (v/v).
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el disolvente orgánico que puede mezclarse con agua se elige del grupo que comprende etanol e isopropanol.
- 40 6. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado por que** la solución de colágeno presenta un contenido de colágeno del 0,5 al 5 % en peso
7. Procedimiento según las reivindicaciones 2 o 6, **caracterizado por que** a la solución de colágeno se le añade antes del espumado o de la desgasificación una sustancia activa antimicrobiana.
- 45 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado por que** la solución de colágeno comprende la sustancia activa antimicrobiana en una cantidad de un 1 % en peso, referido al contenido de colágeno de la solución.
9. Procedimiento según las reivindicaciones 2 o 6, **caracterizado por que** la esponja de colágeno se trata tras su liofilización con un ácido inorgánico, preferentemente con una solución de HCl al 0,1 N y tras ello se lava con agua hasta que ya no pueda detectarse ácido.
- 50 10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado por que** la esponja tratada con ácido se sumerge en la solución de una sustancia de acción antimicrobiana.
- 55 11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado por que** la esponja tras la inmersión se deshidrata mediante congelación y liofilización, o mediante inmersión en etanol y secado al aire.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7, 8, 10 u 11, **caracterizado por que** en el caso de la sustancia activa antimicrobiana se trata de sulfadiazina de plata.
- 60 13. Esponja porosa de colágeno marino, **caracterizada por que** se fabricó según un procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 12.
- 65 14. Uso de una esponja porosa de colágeno marino, la cual se fabricó según un procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 12, para la fabricación de productos médicos.