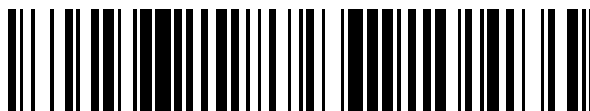


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 698**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/26 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2014 PCT/TR2014/000251**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15012775**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2014 E 14772477 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 3024505**

54 Título: **Una matriz dérmica y su método de producción, que tiene efectos sinérgicos que comprende micropartículas que proporciona reparación tisular**

30 Prioridad:

25.07.2013 TR 201309048

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

04.04.2019

73 Titular/es:

**ABDI IBRAHIM ILAC SANAYI VE TICARET A.S.
(100.0%)
Sanayi Mah. Tunc Cad. No:3
34500 Esenyurt Istanbul, TR**

72 Inventor/es:

**OZER, KEVSER OZGEN;
GOKCE, EVREN HOMAN;
EROGLU, IPEK y
TANRIVERDI, SAKINE TUNCAY**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 707 698 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

Una matriz dérmica y su método de producción, que tiene efectos sinérgicos que comprende micropartículas que proporciona reparación tisular

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a matrices dérmicas como se definen en la reivindicación 10 y a su método de producción como se define en la reivindicación 1, usadas en el tratamiento de heridas crónicas, que permiten la reparación rápida del tejido dérmico, y que comprenden en su estructura micropartículas que tienen agentes antioxidantes con efectos sinérgicos.

Técnica anterior

- 10 Hoy en día se usan productos convencionales tales como cremas, geles, lociones y pomadas en el tratamiento de heridas crónicas. Con el fin de que dichos productos sean eficaces en el tratamiento, es necesario que se apliquen con frecuencia. Además, la dosis de aplicación también debe ser uniforme. Sin embargo, hay tratamientos actuales que podrían eliminar estos problemas que son una parte del procedimiento convencional. En dichas aplicaciones de tratamiento se usan métodos de transferencia de xenoinjerto e injerto con el fin de reemplazar tejidos nuevos sobre
15 zonas con pérdidas de tejidos grandes. Estos métodos son dolorosos y al mismo tiempo podrían tener desventajas basadas en el donante.

- La etapa final más actualizada que se conoce en tratamientos de heridas crónicas, comprende formulaciones innovadoras. Sistemas de micropartículas y sistemas de matrices proporcionan métodos de tratamiento ventajosos cuando se comparan con métodos de la técnica anterior. Como resultado de la investigación bibliográfica llevada a
20 cabo, se ha observado que se han desarrollado matrices que comprenden agentes que ayudan a cicatrizar la zona, y que proporcionan el soporte mecánico necesario, que compensan y con efecto oclusivo del área de tejido perdido como resultado de diferentes lesiones. Se han preparado matrices dérmicas, en especial que comprenden composiciones de colágeno-quitosano, colágeno-gelatina, colágeno-glicosaminoglicanos y colágeno-ácido hialurónico, y por incubación de fibroblastos en estas y se ha observado la cicatrización del tejido herido.

- 25 Las matrices dérmicas son sistemas preparados con polímeros naturales o sintéticos con el fin de mantener eficazmente el crecimiento y desarrollo celular, y el uso de estas en el tratamiento de heridas ha abierto un nuevo horizonte. El principal objetivo de estas estructuras es volver a desarrollar el tejido que se ha dañado y llevar a esta región diferentes biomateriales y moléculas bioactivas.

- Hoy en día están presentes productos comerciales que cicatrizan el epitelio, que tienen diferentes características. En
30 dichos productos, se usan parches para heridas preparados con quitosano que es un polímero natural, o se usan polímeros tales como poliuretanos sintéticos y PLGA y se proporciona un medio donde los queratinocitos forman pequeñas colonias en la epidermis, y de esta forma se obtiene una formación de epitelio más rápida. En dichos productos donde se reemplaza el epitelio, se proporciona una estructura bidimensional. Sin embargo, estas dimensiones preferidas en la formación del epitelio no son suficientes en tratamientos de sustitución que requieren
35 estructuras tridimensionales.

- La zona de la herida está abierta a la infección y complicaciones similares y el procedimiento más eficaz para prevenir las infecciones es proporcionar un tratamiento eficaz tan pronto como sea posible. Las primeras seis horas son el espacio de tiempo más importante en términos de formación de colonias bacterianas después de producirse la herida. El método más eficaz para prevenir infecciones es sellar la herida usando parches estériles sobre las
40 heridas y limpiar la herida en condiciones asépticas antes de sellarla con un parche estéril, estas condiciones son incluso más eficaces que el tratamiento con antibióticos. Por esta razón, cubrir inmediatamente la herida, aumentando la autorreparación de la capa dérmica, y desarrollando tejidos completamente en capas que reemplazarán la zona de tejido, son algunos de los temas cruciales que es necesario abordar en los estudios actuales.

- 45 Los procedimientos convencionales (pomadas, cremas, geles, lociones) usados en el tratamiento de heridas, no son capaces de superar problemas básicos tales como infecciones de heridas, deshidratación, pérdida de calor, que el tejido vivo permanezca desprotegido, pérdidas de proteínas, eritrocitos, leucocitos, agentes inmunológicos y oligoelementos.

- Una de las desventajas más importantes de las formulaciones convencionales, es que la cantidad aplicada puede cambiar o variar y como resultado la dosis aplicada no se puede uniformizar, y es necesario realizar la aplicación
50 con frecuencia. Cada vez que se lleva a cabo la aplicación, el paciente siente dolor y esto hace que el procedimiento de tratamiento sea más difícil. Además, podrían surgir reacciones alérgicas debido al agente tensioactivo o componentes tales como conservantes y perfume usados en estas formulaciones. Además de la terapia convencional, la transferencia de injerto que es otro tratamiento llevado a cabo en el caso de pérdida grande de tejido, también tiene muchas desventajas. Estas desventajas pueden ser enfermedades que son transmitidas desde
55 el donante, o la formación de nuevas heridas en la zona del donante de la cual se ha tomado el injerto. Aunque los autoinjertos son materiales preferidos, en algunos casos puede no haber ningún tejido de piel adecuado que se pueda transferir a pacientes. Además de esto, hay una nueva herida en la zona donde se ha tomado el tejido del

injerto. Otra desventaja es que estos procedimientos pueden requerir operaciones quirúrgicas. Se consideró que eran necesarios procedimientos innovadores para acortar el tiempo de tratamiento, con el fin de prevenir complicaciones tales como infecciones, y con el fin de superar dichas desventajas.

5 Las formulaciones que se han preparado con el fin de alcanzar estos objetivos, que tienen colágeno, quitosano y gelatina, son sistemas bidimensionales, y dichos sistemas bidimensionales no eran suficientes para proporcionar soporte físico. Con el fin de superar este problema, los métodos usados para asegurar que las matrices dérmicas preparadas usando colágeno fueran materiales químicos que comprenden estructuras tridimensionales, arruinan las condiciones que es necesario que estén presentes para el crecimiento celular. En la presente técnica, los productos desarrollados para alcanzar dichos objetivos no comprenden micropartículas y actúan como un parche para herida en donde las células pueden crecer un poco más rápido.

Breve descripción de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar una matriz dérmica, que aumente la eficacia de los tratamientos de heridas crónicas y disminuya el tiempo de cicatrización y asegure la reparación tisular.

15 Otro objetivo de la invención es proporcionar una matriz dérmica que no solo comprende colágeno y laminina sino que también comprende micropartículas que llevan agentes antioxidantes que ayudan a acelerar la reparación tisular mostrando efectos sinérgicos.

Otro objetivo de la invención es obtener un método de producción de la matriz dérmica que permite la reparación tisular, en donde se usan agentes formados por proteínas ubicados dentro de la estructura natural de la dermis y otros componentes.

20 Otro objetivo de la invención es proporcionar un método de producción de la matriz dérmica que mantiene el crecimiento celular y la reparación tisular, mediante el uso del método de reticulación que no es un método químico.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método de producción de la matriz dérmica que permite la reparación tisular y previene que los biomateriales sensibles al calor se degraden por aplicación de un procedimiento de liofilización.

25 Se ha mostrado en la figura adjunta un método de producción de la matriz dérmica que proporcionar la reparación tisular producida con el fin de alcanzar el objetivo de esta invención, en donde dicha figura ilustra los siguiente;

Figura 1 - Es el diagrama de flujo del método objeto de la invención.

Un método de producción de la matriz dérmica (10) caracterizado por que comprende las etapas de:

- Preparación del sistema de matriz dérmica (11),
- 30 - Preparación del sistema de solución de colágeno (111),
- Adición de laminina a la solución de colágeno y mezclamiento (112),
- Congelación y almacenamiento de la mezcla (113),
- Liofilización de la mezcla almacenada (114),
- Reticulación del liofilizado (115),
- 35 - Formación de micropartículas (12),
- Preparación de solución acuosa del polímero (121), en donde el ácido hialurónico (HA) se disuelve en agua pura,
- Preparación de la mezcla de fosfolípido, agente antioxidante y alcohol (122) en donde se mezclan dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y resveratrol en alcohol y se disuelven,
- Adición de la solución acuosa sobre la mezcla de alcohol y mezclamiento (123),
- 40 - Secado por atomización de la mezcla entera obtenida (124),
- Combinación de las micropartículas con un sistema de matriz dérmica (13), en donde las micropartículas de ácido hialurónico (HA) - dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) cargadas de resveratrol se pulverizan mediante un pulverizador de polvo seco sobre la matriz dérmica (11).

45 El método (10) objeto de la invención se basa principalmente en la preparación de un sistema de matriz dérmica y un sistema de micropartículas por separado y, después de esto, pulverización de las micropartículas sobre la matriz dérmica combinando así físicamente estos dos sistemas.

Según el método (10) objeto de la invención, primero de todo se prepara una solución de colágeno (111) añadiendo colágeno a solución de ácido acético con el fin de preparar un sistema de matriz dérmica (11). En la aplicación preferida de la invención, se añade colágeno bovino (111) en una concentración de 0,1% a la solución de ácido acético 0,1 M.

5 Después de esto, se añade laminina sobre la solución de colágeno (112). En una realización preferida de la invención, se toman 2,5 ml de la solución de colágeno que se ha preparado y se añaden 20 μ l de laminina, y se mezcla todo en un baño de hielo (112). Cuando se usa el baño de hielo, el objetivo es evitar el deterioro de las estructuras de proteínas que están presentes dentro de la mezcla. En una realización preferida de la invención, el mezclamiento se lleva a cabo a una velocidad de 3000 ciclos/minuto, durante 1 minuto, usando una sonda 10-G.

10 La mezcla que comprende colágeno y laminina se deja reposar durante 12 horas a una temperatura de $-20\pm 1^\circ\text{C}$ y se congela (113). Después de esto, dicha mezcla que se ha congelado se somete a liofilización durante 24 horas (114). De esta forma se asegura que se evita el deterioro de los biomateriales sensibles al calor dentro de dicha mezcla.

15 La estructura liofilizada que comprende colágeno y laminina que se ha obtenido se reticula (115) a la longitud de onda de 254 nm usando un dispositivo de reticulación ultravioleta (reticulador UV). En otro sitio, se prepara una solución acuosa de polímero (121) con el fin de proporcionar la formación de micropartículas (12). Con el fin de asegurar esto, se usan 0,2 g de sal de sodio del ácido hialurónico (HA) y se disuelven en 150 ml de agua pura. Mientras tanto, se mezclan dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y resveratrol en alcohol y se disuelven (122). En una realización preferida de la invención, se añaden 0,7-0,75 g de DPPC y 0,05-0,1 g de resveratrol en 350 ml de etanol y se mezclan (122). El uso de resveratrol (antioxidante) muestra efectos sinérgicos con el colágeno y la laminina que
20 forman la estructura de proteínas, y como resultado, aumenta la eficacia del producto final con respecto a la reparación tisular. Además de esto, se asegura que se mantiene la integridad de la matriz del producto final durante un tiempo largo.

25 La solución de HA (121) que se ha preparado, se añade sobre la solución (122) de DPPC y resveratrol en alcohol y se mezcla a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ (123). La mezcla completa que se ha preparado se pone dentro de un secador por atomización y se obtienen micropartículas por atomización (124). En la realización preferida de la invención; se ha ajustado el secador por atomización de modo que la temperatura inicial es 180°C , y la velocidad de atomización es 400 l/h.

30 Las micropartículas de HA cargadas con resveratrol y preparadas con un secador por atomización se pulverizan sobre la matriz dérmica preparada previamente (11) en forma de polvo seco y se combinan dichos dos sistemas (13). De acuerdo con la realización preferida de la invención, las micropartículas pulverizadas comprenden resveratrol 50 μM . Estas matrices que se han obtenido, se usan en especial en tratamientos de heridas crónicas y aumentan significativamente la velocidad de cicatrización de la herida.

35 Con el fin de determinar el diámetro y espesor de las matrices dérmicas obtenidas usando el método objeto de la invención, se ha usado un dispositivo automático de extensión y se ha evaluado el diámetro y espesor de las matrices. Como resultado del análisis que se ha llevado a cabo, el diámetro medio de la matriz dérmica obtenida es $2,24 \pm 0,05$ cm y su espesor medido es de $0,23 \pm 0,04$ cm.

Se ha determinado que los tamaños de poros de las matrices dérmicas que se han obtenido usando microscopía electrónica de barrido y microscopía confocal con el fin de determinar la morfología de la superficie, eran aproximadamente como máximo 100 μm . Además de esto, se ha observado que estaban presentes fibras de colágeno tridimensionales y las micropartículas se habían reticulado.

40 Las matrices que se han preparado para la capacidad de retención de agua, se han dejado reposar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ del agua, durante 20 segundos antes de determinar sus pesos. Calculando la tasa en porcentaje del peso inicial y comparándola con el peso medido después de completarse el ensayo, se ha determinado que la capacidad de retención de agua es $84 \% \pm 1,5$.

45 Se ha usado un dispositivo de análisis de textura TA-XT plus, con el fin de determinar las características mecánicas de las matrices dérmicas. Como resultado del análisis, se han calculado los valores de dureza de 26-21 N, compresión de 23-18 N/mm, cohesión de 0,93-1 y elasticidad de 0,8-1, mediante curvas de potencia, tiempo que pertenecen a la matriz. Como resultado de la determinación del contenido de humedad, se ha calculado que la cantidad de humedad de la matriz dérmica objeto de la invención es 0,2%. Se ha calculado que los tamaños de las micropartículas localizadas dentro de la matriz dérmica están entre 15-30 μm usando el método de difracción
50 láser.

Como puede verse en las imágenes obtenidas por SEM, las formulaciones son esféricas y tienen superficies lisas. Los tamaños de partículas observados por SEM, se han comparado con los resultados del método de distribución por difracción laser llevado a cabo previamente, y se ha encontrado que los tamaños concordaban.

55 La capacidad de carga de fármaco de las micropartículas que se han preparado, se ha calculado como 0,5-1 mg y se ha calculado que la eficacia de la encapsulación es entre 97%-98,7%.

Con el fin de determinar la cantidad liberada de resveratrol de las micropartículas, se han llevado a cabo estudios de liberación de agente activo de formulaciones de micropartículas preparadas con diferentes concentraciones de resveratrol. Los resultados del análisis mostraban que la cantidad de resveratrol liberado de las formulaciones durante 24 horas era entre 73-85%.

5 Se ha examinado el efecto de las enzimas hialuronidasa, colagenasa, lipasa y fosfolipasa en relación con la liberación de resveratrol de las micropartículas. Se han llevado a cabo estudios de degradación enzimática separados con las enzimas hialuronidasa y colagenasa con el fin de examinar el efecto de las enzimas en la matriz dérmica. Mientras que la matriz dérmica que no comprendía micropartículas era degradada enzimáticamente con colagenasa en 30 minutos, la degradación de la matriz dérmica que comprendía micropartículas cargadas con resveratrol tardaba el doble de tiempo. El resveratrol no solo era ventajoso en cuanto que mantenía la cicatrización de heridas, sino que también era ventajoso porque protegía la integridad de la matriz frente a la colagenasa durante un tiempo más prolongado.

10 Se ha usado un programa de software de microscopio confocal 3D con el fin de determinar si las micropartículas estaban distribuidas homogéneamente en la matriz dérmica y dónde se localizaban. Se reanudó el estudio confocal y se han evaluado los datos en este programa. Los estudios morfológicos llevados a cabo mostraban que las micropartículas estaban distribuidas de forma mucho más homogénea en la superficie superior de la matriz dérmica y que dichas micropartículas estaban en contacto completo con la matriz.

15 Se cultivaron células fibroblastos dérmicos humanos (Invitrogen C-013-5C) en condiciones de humedad que comprendían $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 de acuerdo con las instrucciones del productor. Se ha incubado una solución de resveratrol con formulaciones que no comprendían resveratrol y formulaciones de micropartículas que comprendían resveratrol durante 24 horas, y se ha examinado el efecto en todas las muestras con respecto a la vitalidad celular. Como la solución de resveratrol, o formulaciones que están vacías o contienen agentes activos, se observó que no tenían potencial citotóxico, y han mostrado efectos crecientes en la proliferación celular en concentraciones que corresponden a un contenido de resveratrol $50\ \mu\text{M}$. Se han examinado parámetros de estrés oxidativo tales como el glutatión, malondialdehído y superóxido dismutasa totales y glutatión peroxidasa, dentro de las células que se han analizado. Los resultados que se han obtenido eran una indicación de que el tipo de dosis desarrollado para el resveratrol comprendía actividad oxidativa a un nivel molecular.

20 En conclusión, los estudios llevados a cabo en años recientes, mostraban que la cicatrización de heridas dependía de los componentes seleccionados dentro de la formulación y que las formulaciones innovadoras que comprendían proteínas que forman la estructura natural de la dermis, proporcionaban tratamiento eficaz y se podía acortar el tiempo de tratamiento. Es evidente que es necesario preparar los nuevos sistemas que llevan fármaco para tratamientos de heridas a largo plazo.

25 No hay formulaciones de nueva generación de que comprendan la combinación seleccionada. El efecto sinérgico de las matrices dérmicas con el resveratrol en relación con la reparación tisular se ha evaluado por primera vez con esta invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de matriz dérmica (10), caracterizado por que comprende las etapas de:
 - Preparación del sistema de matriz dérmica (11),
 - Preparación del sistema de solución de colágeno (111),
- 5 - Adición de laminina sobre la solución de colágeno y mezclado (112),
 - Congelación y almacenamiento de la mezcla (113),
 - Liofilización de la mezcla almacenada (114),
 - Reticulación del liofilizado (115),
 - Formación de micropartículas (12),
- 10 - Preparación de solución acuosa del polímero (121), en donde el ácido hialurónico (HA) se disuelve en agua pura,
 - Preparación de una mezcla de fosfolípido, agente antioxidante y alcohol (122) en donde se mezclan dipalmitoilefosfatidilcolina (DPPC) y resveratrol en alcohol y se disuelven,
 - Adición de la solución acuosa sobre la mezcla de alcohol y mezclado (123),
 - Secado por atomización de la mezcla entera obtenida (124),
- 15 - Combinación de las micropartículas con un sistema de matriz dérmica (13), en donde las micropartículas de ácido hialurónico (HA) - dipalmitoilefosfatidilcolina (DPPC) cargadas de resveratrol se pulverizan mediante un pulverizador de polvo seco sobre la matriz dérmica (11).
 2. Un método de producción de matriz dérmica (10) según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa de preparar una mezcla de fosfolípido, agente antioxidante y alcohol (122), en donde se mezclan 0,7-0,75 g de dipalmitoilefosfatidilcolina (DPPC) y 0,05-0,1 g de resveratrol en 350 ml de alcohol y se disuelven.
 3. Un método de producción de matriz dérmica (10) según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha solución acuosa se añade a la mezcla de alcohol y se mezcla (123) a $40 \pm 1^\circ\text{C}$.
 4. Un método de producción de matriz dérmica (10) según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa de preparar la solución de colágeno (111) añadiendo colágeno bovino en una concentración de 0,1% al ácido acético 0,1 M.
 5. Un método de producción de matriz dérmica (10) según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa de añadir laminina a la solución de colágeno (112) tomando 2,5 ml de la solución de colágeno que se ha preparado, añadiendo 20 μl de laminina a esta, y mezclándolos en un baño de hielo.
 6. Un método de producción de matriz dérmica (10) según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa de congelar y almacenar la mezcla (113), en donde la mezcla de colágeno y laminina se deja en reposo durante 12 horas a una temperatura de $-20 \pm 1^\circ\text{C}$.
 7. Un método de producción de matriz dérmica (10) según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa de liofilización de la mezcla (114) que se ha almacenado, en donde la mezcla que se ha congelado y dejado en reposo se liofiliza durante 24 horas, y como resultado, en donde se evita el deterioro de los biomateriales sensibles al calor, presentes dentro de dicha mezcla.
 8. Un método de producción de matriz dérmica (10) según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa de reticulación del liofilizado (115) en donde la estructura del liofilizado se somete a reticulación a la longitud de onda de 254 nm usando un dispositivo de reticulación ultravioleta (reticulador UV).
 9. Un método de producción de matriz dérmica (10) según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende la etapa de preparar una solución acuosa de polímero (121) en donde se disuelven 0,2 g de ácido hialurónico (HA) en 150 ml de agua pura.
 10. Una formulación de matriz dérmica producida usando el método según la reivindicación 1, caracterizada por que comprende micropartículas de ácido hialurónico-dipalmitoilefosfatidilcolina (DPPC) cargadas de un antioxidante en un armazón de colágeno-laminina.
 11. Una formulación de matriz dérmica según la reivindicación 10, en donde el antioxidante es resveratrol.

12. Una formulación de matriz dérmica según la reivindicación 10, en donde la formulación es biodegradable.
13. Formulación de matriz dérmica según la reivindicación 10, para usar en tratamientos de heridas crónicas.

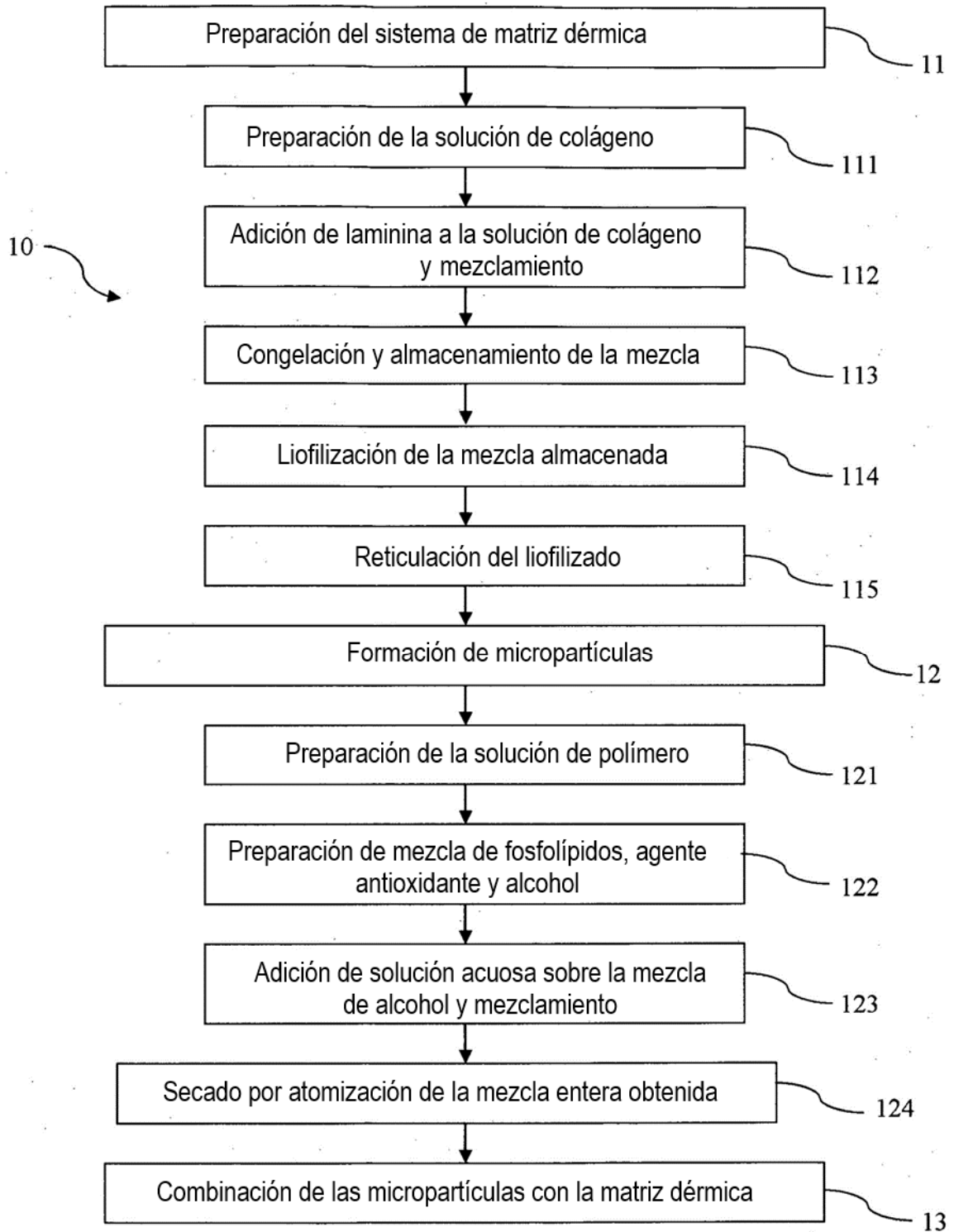


Figura 1