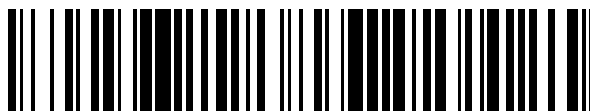


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 375**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/08	(2006.01) A61K 8/04	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01) A61K 8/19	(2006.01)
A61K 47/32	(2006.01)	
A61L 15/26	(2006.01)	
A61L 15/44	(2006.01)	
A61L 15/46	(2006.01)	
A61L 26/00	(2006.01)	
A61Q 17/00	(2006.01)	
A61K 8/90	(2006.01)	
A61K 47/34	(2007.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2014** **PCT/TR2014/000136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014** **WO14168595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2014** **E 14737346 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019** **EP 2983641**

54 Título: **Hidrogel a base de polímeros**

30 Prioridad:

08.04.2013 TR 201304209

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

10.08.2020

73 Titular/es:

YEDITEPE UNIVERSITESI (100.0%)
Inonu Mahallesi Kayisdagi Caddesi 26 Agustos
Yerlesimi Kadikoy
34755 Istanbul , TR

72 Inventor/es:

SAHIN, FIKRETTIN;
DEMIRCI, SELAMI y
DOGAN, AYSEGUL

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 778 375 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

Hidrogel a base de polímeros

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un hidrogel a base de polímero antimicrobiano de cicatrización de heridas y antienviejecimiento.

10 Antecedentes de la invención

La función básica de la piel es crear una barrera que pueda proteger al cuerpo contra los daños y efectos ambientales, y asegurar la homeostasis. De este modo, cualquier deformación que pueda ocurrir en la integridad de la piel puede dejar al cuerpo humano vulnerable a muchas situaciones patológicas tales como infección, deshidratación extrema, desequilibrio electrolítico, etc. (Baum and Arpey, 2005). Por esta razón, los grandes daños que pueden ocurrir en la piel debido a enfermedades o lesiones causan disfunciones graves e incluso muertes (Singer and Clark, 1999). Inmediatamente después del deterioro de la integridad de la piel, la cicatrización de heridas comienza en el cuerpo. Este es un evento complejo donde una serie de eventos biológicos se suceden regularmente, y en su mayoría termina con una regeneración parcial o completa del tejido. En general, la cicatrización de heridas se compone de cuatro fases interconectadas que son la homeostasis, la inflamación, la proliferación y la remodelación (Diegelmann and Evans, 2004). Aunque el organismo está organizado para cerrar y remodelar la herida, muchos factores independientes del organismo pueden retrasar el procedimiento al afectar la cicatrización de heridas y causar la formación de heridas crónicas. Por ejemplo, la contaminación microbiana que puede ocurrir en el área de la herida y los productos (endotoxina, metaloproteínasa, etc.) formados por estos microorganismos pueden impedir la restauración de la integridad de la piel al afectar negativamente el procedimiento de cicatrización (Robson, 1997). Como la colonización microbiana que se forma en la superficie de la herida es un entorno polimicrobiano que aloja muchos patógenos, el riesgo de infección de la herida es alto (Bowler et al., 2001). La infección de la herida retrasa la cicatrización de heridas y aumenta el trauma, y los procedimientos de tratamiento son más complejos y costosos.

Zoutman et al., con el estudio han demostrado que la infección de la herida aumenta la duración de la hospitalización del paciente en un promedio de 10.2 días y que esto conlleva un coste adicional de \$3,937 por paciente (1998).

Para evitar la contaminación del área de la herida por cualquier microorganismo, las células del sistema inmunitario estimuladas por el factor de crecimiento y las citocinas migran al área de la herida. En la etapa de inflamación que ocurre justo después de que ocurre la herida, los neutrófilos y los macrófagos llegan al área de la herida. Además de estos, los linfocitos y monocitos también van al área de la herida, se transforman en macrófagos y ayudan al sistema de defensa. Los neutrófilos y macrófagos que han alcanzado el área de la herida inhiben los microorganismos en el área de la herida al producir una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gordillo and Sen, 2003). Si existe una contaminación microbiana extrema en el área de la herida, las densidades de neutrófilos y macrófagos aumentan y estas células, que producen cantidades excesivas de ROS, causan destrucción de tejidos y células. Esta destrucción retrasa la cicatrización de heridas. Las especies reactivas de oxígeno interactúan con el ADN, las proteínas y los lípidos y causan su degradación. Las especies ROS se unen al ADN y causan rupturas y mutaciones de doble o única cadena (Bartosz, 2008). Además de eso, causan lisis de las células al causar la peroxidación lipídica ROS (Panchatcharam et al., 2006). Otro ejemplo de los impactos negativos de las especies ROS en la cicatrización de heridas es el hecho de que las especies ROS, tales como el peróxido de hidrógeno, reducen la proliferación y la migración de muchas células, como los queratinocitos (O'Toole et al., 1996). Sin embargo, se han desarrollado ciertas adaptaciones contra las especies de ROS para mantener la integridad de la piel. La desintoxicación de ROS es proporcionada por dos estrategias diferentes en la célula. ROS es eliminado por pequeñas moléculas antioxidantes tales como el ácido graso poliinsaturado, ascorbato o azúcares (principalmente manitol) o con superóxido dismutasa (SOD), catalasa y diversas peroxidasas (por ejemplo, glutatión peroxidasa) (Steiling et al., 1999). Entre estas enzimas, la superóxido dismutasa (SOD) permite la transformación del anión radical superóxido, que se forma principalmente en el procedimiento de cicatrización de heridas, en peróxido de hidrógeno (Ulrich et al., 2006). Aunque el peróxido de hidrógeno no es radical, se debe descomponer inmediatamente debido a su capacidad de transformación en radical hidroxilo. La reacción de reducir el peróxido de hidrógeno al agua generalmente se realiza con la ayuda de las enzimas catalasa y glutatión. Durante la cicatrización de heridas, si la cantidad de estas enzimas es menor que la de las especies ROS, causan daño al ADN, peroxidación lipídica y de proteínas en el área de la herida y, de este modo, retrasan la cicatrización de heridas.

La comunicación celular, la formación de la matriz extracelular (ECM), los factores de crecimiento y la liberación de citocinas se deben completar para una cicatrización completa en el procedimiento de cicatrización de heridas. La formación de ECM se incluye casi en todo el procedimiento de cicatrización de heridas y tiene un lugar importante. En general, los componentes que forman la ECM se sintetizan y combinan fuera de la superficie celular y, de este modo, proporcionan integridad estructural y funcional a los tejidos y órganos conectivos. La síntesis de ECM y el almacenamiento fuera de la célula están habilitados por los medios de transmisión de señal, los factores de

crecimiento y la liberación de citocinas proporcionados por los receptores de la superficie celular (Schultz and Wysocki, 2009). Las células de fibroblastos sintetizan diversos tipos de colágeno justo después de la formación de la herida para recuperar el daño que se ha producido en el tejido y mantener la integridad (McPherson and Piez, 1988). El colágeno tipo 1 y 3 proporciona resistencia a la tracción de la piel y, por lo tanto, permite que la piel sea fuerte y resistente contra el estrés mecánico.

Al principio, se pensaba que el colágeno era necesario solo para mantener la integridad de la piel, sin embargo, nuevos estudios han demostrado que el colágeno también es importante para la síntesis de muchas proteínas necesarias para la forma celular y la diferenciación, migración y cicatrización de heridas (Brett, 2008). Para asegurar una migración efectiva de los queratinocitos, debe haber una cantidad suficiente de colágeno tipo 1 en el área de la herida.

Otra proteína de matriz extracelular importante es la fibronectina. La fibronectina, que es una glicoproteína adhesiva sintetizada por las células en el área de la herida, sirve para la adhesión celular, el crecimiento, la migración celular y la diferenciación. La fibronectina actúa como un adhesivo biológico debido a su estructura molecular y funciona como un puente importante para que la célula se comunique con las otras proteínas de la matriz extracelular (Clark, 1990). La fibronectina y la fibrina permiten la adhesión celular y la migración al producir una matriz temporal en el área de la herida. Sin embargo, cuando se completa la regeneración dermalepidérmica, la fibronectina en su mayoría permanece limitada con la región de la membrana basal de la región de conexión dermoepidérmica (Schultz and Wysocki, 2009). De este modo, la fibronectina tiene efectos que varían según ciertas etapas de cicatrización de heridas.

El aumento de la remodelación y síntesis de ECM también retrasa el envejecimiento de la piel. A medida que la capa de ECM en la piel envejecida se vuelve más frágil, se producen arrugas. La composición de la piel que ha envejecido debido a factores internos o externos puede haber sido causada por una reducción de la cantidad o una deformación de la ECM en la capa de la dermis (Takasao et al., 2012). De este modo, la inducción de colágeno tipo 1, que constituye el 90% de la composición de ECM en la capa de la dermis, y la síntesis de fibra elástica permite que la piel se mantenga joven al retrasar el envejecimiento (Fernandes and Signorini, 2012).

No solo la deficiencia de ECM sino también la redundancia de ROS juega un papel importante en el envejecimiento. Las ROS, que se producen debido a condiciones ambientales, provocan un aumento (regulación positiva) de las metaloproteinasas de la matriz que particularmente sirven para la destrucción de la ECM al aumentar la inflamación en la piel (Pillai et al., 2005). Además de causar inflamación, los derivados de ROS provocan daños en la superficie de la piel al causar carbonilación de proteínas y peroxidación lipídica (Masaki, 2010). Por estas razones, dado que aumentar las actividades de las enzimas (por ejemplo, SOD, glutatión peroxidasa y catalasa) que sirven para la eliminación de ROS reducirá las degradaciones que pueden ocurrir en la piel, retrasará el envejecimiento.

Aunque el boro es un oligoelemento importante para las plantas, su actividad y mecanismo en el sistema de mamíferos no se ha entendido completamente. En varios estudios realizados hasta la fecha, se reivindica que varios compuestos que contienen boro pueden ser efectivos en el procedimiento de cicatrización de heridas. Se observó que la administración tópica de ácido bórico al 3% en las heridas redujo la duración de la estancia en unidades de cuidados intensivos en tres veces (Nzietchueng et al., 2002). Adicionalmente, se ha demostrado en estudios *in vitro* que el ácido bórico aumenta las proteínas de la matriz extracelular (Benderdour et al., 1998). Se reivindicó que el ácido bórico reduce la síntesis de moléculas intracelulares (proteoglicano, colágeno y proteínas) y aumenta la liberación de estas moléculas al medio de cultivo (Benderdour et al., 1997). Aparte de esto, aunque se encontró que cuatro compuestos diferentes (borato de trietanolamina; ácido N-dietilfosforamidato-propilborónico); 2,2 dimetilhexil-1,3-propanodiol-aminopropilboronato y 1,2 propanodiol-aminopropil-boronato) que son derivados de boro proporcionan más proteína de matriz extracelular que el ácido bórico, también se afirmó que estos compuestos son más tóxicos que el ácido bórico (Benderdour et al., 2000).

Se demostró en los estudios *in vitro* que se realizaron que el compuesto de borato de sodio, que es otro compuesto de boro, aumenta la migración celular aunque no tiene efecto proliferativo en los queratinocitos humanos (Chebassier et al., 2004a) y aumenta los niveles de metaloproteinasa-2 (MMP-2) y enzimas metaloproteinasa-9 de la matriz (MMP-9) que sirven para la migración de células dérmicas y el modelado de tejido de granulación que son etapas importantes en el procedimiento de cicatrización de heridas (Chebassier et al., 2004b).

Los poloxámeros son polímeros sintéticos que tienen una estructura tribloque compuesta de unidades de óxido de polipropileno hidrófobas y unidades de óxido de polietileno hidrófilas. El poloxámero se puede usar para transportar agentes terapéuticos, fármacos y genes (Batrokova and Kabanov, 2008). Debido a sus estructuras anfífilas, sirven como surfactantes y pueden interactuar con las membranas. En soluciones, se pueden absorber fármacos y se pueden usar para transportarlos formando micelas a concentraciones superiores a la concentración crítica de micelas (Kabanov et al., 1995). Se pueden usar en biorreactores para mejorar la viabilidad celular y disminuir el estrés de agitación (Ramirez and Mutharasan, 1990).

El documento de la Patente de los Estados Unidos con el número US2010286010, una de las aplicaciones conocidas en la técnica, describe una solución acuosa para limpiar y desinfectar lentes de contacto.

El documento de la Patente China con el número CN102885768, una de las aplicaciones conocidas en la técnica, describe un colirio en gel *in situ* con pranoprofeno y un método de preparación del mismo.

- 5 El documento de la Patente Británica con el número GB2362100, una de las aplicaciones conocidas en la técnica, describe hidrogeles que comprenden poloxámeros para el tratamiento de heridas.

Resumen de la invención

- 10 El alcance de esta invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

- 15 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un hidrogel a base de polímero antimicrobiano.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un hidrogel a base de polímero antienvjecimiento.

- 20 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un hidrogel a base de polímero para la cicatrización de heridas.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un hidrogel a base de polímero que actúa rápidamente en el área lesionada.

- 25 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar un hidrogel a base de polímero que evite la formación de cicatrices y permita el cierre rápido de la herida en el área donde se aplica.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un hidrogel a base de polímero de bajo coste.

- 30 Descripción detallada de la invención

El "hidrogel a base de polímero" desarrollado para cumplir los objetivos de la presente invención se ilustra en las figuras adjuntas, en las que:

- 35 La figura 1 muestra el efecto de la combinación de 15 µg/ml de NAB y poloxámero en la viabilidad celular de L929 (NAB: pentaborato de sodio pentahidratado; NAB + Poloxámero: Gel).

- 40 La figura 2 muestra el efecto dependiente del tiempo de combinaciones de 15 µg/ml de NAB y poloxámero en la viabilidad celular de L929 (NAB: pentaborato de sodio pentahidratado; NAB + Poloxámero: Gel).

La figura 3 muestra el efecto de la combinación de gel y el pentaborato de sodio pentahidrato, que se usa como el ingrediente activo, en ocho concentraciones altas diferentes en el intervalo de 1-8 mg/ml en la viabilidad celular de L929.

- 45 La figura 4 muestra el efecto del pentaborato de sodio pentahidratado, que se usa como ingrediente activo en la combinación de gel, a nueve concentraciones altas diferentes en el intervalo de 10-200 µg/ml sobre la viabilidad celular de fibroblastos humanos.

- 50 La figura 5 es la vista del efecto de la combinación de gel y diferentes combinaciones de las moléculas usadas en la combinación sobre el cierre de heridas *in vitro* de L929.

La figura 6 es la vista del cierre de heridas *in vitro* en células de fibroblastos humanos.

- 55 La figura 7 es la vista de los resultados del cierre de la herida *in vitro* de (a) cocultivo L929/HUVEC, (b) queratinocitos y (c) cierre de la herida de fibroblastos humanos.

La figura 8 es la vista de los resultados de (a) niveles de genes Akt, (b) Bax y (c) p53.

- 60 La figura 9 es la vista de los resultados de niveles de (a) glutatión peroxidasa, (b) superóxido dismutasa y (c) malondialdehído.

La figura 10 es la vista de los resultados del análisis de cariotipo de células de fibroblastos humanos.

- 65 En el estudio de la presente invención, se desarrolla una formulación de gel de cicatrización de heridas combinando polímeros de poloxámero y componente de boro en un gel a base de carbopol.

Estudio experimental

Preparación del gel

5 El gel, que se usará como portador para las moléculas activas, se prepara usando 1% de carbopol. En la preparación del gel, el agua destilada, a la que se agrega 1% de carbopol, se deja para hidratación a temperatura ambiente. En el procedimiento de hidratación, el carbopol se gelifica agregando 1.6 gramos de NaOH al 18% a una solución de 1 litro completamente saturada de agua. Se agregaron 3% del compuesto de boro y 4% de poloxámero a la mezcla de gel que se homogeneizó mezclando después de completar la hidratación. La mezcla se almacenó a 4 °C, durante 16-24 horas y lista para usar.

En la preparación del hidrogel de la presente invención, se usa pentaborato de sodio pentahidrato como el compuesto de boro.

15 Estudios de análisis

Método de difusión del disco

La propiedad antimicrobiana de la composición de hidrogel desarrollada se probó según el método de difusión de disco que se describe previamente en la literatura (Lalitha and Vellore, 2005). La solución de 100 µl que contenía 10⁸ ufc/ml de bacterias, 10⁶ ufc/ml de levadura y 10⁴ esporas/ml de hongos se preparó con nuevos cultivos y se inoculó con un método de dispersión en agar nutritivo (NA), agar dextrosa Sabouraud (SDA) y agar de dextrosa de patata (PDA), respectivamente. Se introdujeron 20 µl de combinación de hidrogel en los discos vacíos que luego se colocaron en los medios inoculados. Se usó hidrogel que no contenía el ingrediente activo como control negativo. En cuanto al control positivo, se usaron ofloxacina (10 µg/disco) y nistatina (30 µg/disco) para bacterias y hongos, respectivamente. Las placas de Petri inoculadas se incubaron durante 24 horas para bacterias y 48 horas para levaduras a 36±1 °C y 72 horas para hongos a 25±1 °C. La actividad antimicrobiana contra microorganismos probados en el método de difusión de disco se evaluó midiendo la zona de inhibición.

30 Determinación de toxicidad celular

El efecto tóxico de la combinación de gel preparada se determinó usando el método de MTS (3-(4, 5-dimetil-tiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2- (4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) dado en la literatura (Yalvac et al., 2009). Las moléculas usadas en el gel se prepararon solas o en combinación en el medio y se aplicaron en las líneas celulares L929 (fibroblastos de ratón), HF (fibroblastos humanos) y queratinocitos humanos que se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (5000 células/pocillo) contando. La respuesta de las células a la toxicidad de las moléculas se determinó midiendo la viabilidad celular durante 3 días. La viabilidad celular se determinó usando un método llamado MTS que mide la actividad enzimática de la deshidrogenasa mitocondrial de la célula. La sustancia MTS agregada a las células junto con el medio da como resultado la formación de cristales de formazán coloreados como un indicador de la viabilidad celular. El cambio de color resultante se evaluó en función de la medición de la absorbancia usando un lector de placas ELISA (Figura 1, 2, 3, 4, 5). Los resultados obtenidos se analizaron.

Modelo de rasguño de cicatrización de heridas

45 Para determinar el efecto del gel sobre la cicatrización de heridas, se analizó su capacidad para la migración celular y el cierre de la herida usando el ensayo de rasguño descrito en la literatura (Walter et al. 2010). En el modelo de cicatrización de heridas *in vitro*, se usaron líneas celulares de L929 (fibroblastos de ratón), HF (fibroblastos humanos) y queratinocitos humanos y cocultivo de L929-HUVEC. Las células se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos a una concentración de 100,000 células/pocillo, y almacenándolas en una incubadora de dióxido de carbono para que pudieran unirse y alcanzar la densidad suficiente. Los arañazos se formaron usando una punta de pipeta de 200 µl de modo que sean perpendiculares a las líneas horizontales dibujadas por una pluma de acetato desde el centro de los pocillos hacia el exterior de los pocillos. Se aplicó una combinación de gel en las células y se observó un cierre de arañazo. El cierre de arañazo (Figura 6-7) se analizó usando el programa NIH Image al fotografiar las regiones de los arañazos que corresponden a las líneas dibujadas por una pluma de acetato y que están en el campo de visión del microscopio a las 0, 12 y 24 horas.

PCR en tiempo real

60 Los análisis de PCR en tiempo real (reacción en cadena de la polimerasa) se realizaron según la literatura usando el método SYBR Green (Yalvac et al, 2010). Los cebadores que pertenecen a los genes colágeno, fibronectina, laminina, Akt, Bax y P53 se diseñaron usando el software de cebador BLAST (The National Center for Biotechnology= NCBI). Se aislaron los ARN totales de las células en las que se aplicó la combinación de gel y se sintetizó el ADNc. Los ADNc sintetizados se mezclaron con cebadores en una solución de mezcla SYBR Green de modo que el volumen final será de 20 µl y los niveles de expresión de los genes (Figura 8) se analizaron usando el dispositivo BIO-RAD.

Examen de los parámetros del estrés oxidativo.

Los parámetros antioxidantes se determinaron mediante análisis de actividad de enzima glutatión peroxidasa y enzima superóxido dismutasa y análisis de los niveles de MDA (malondialdehído). Las células que se sometieron a la combinación de gel, al agente activo y solo al medio para fines de control en placas de cultivo de 6 pocillos se recogieron y se realizó el aislamiento de proteínas de las pellas celulares usando una solución reguladora RIPA. Las concentraciones de las proteínas aisladas se determinaron midiendo la absorbancia y dibujando una curva estándar a una longitud de onda de 595 nm con solución de Bradford en placas ELISA de 96 pocillos usando estándares de proteína de albúmina bovina (0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/ml). Los ensayos de actividad enzimática y los niveles de MDA se determinaron de manera que cumplan con los protocolos dados en los kits comerciales (Figura 9).

Análisis cromosómicos.

Se determinó si la combinación de gel causa anomalía cromosómica usando análisis citogenéticos según la literatura (Yalvac et al., 2011). Las células se cultivaron hasta una concentración del 50% en placas de cultivo celular T-75 de manera que haya un grupo de ingrediente activo y un grupo de control. Las células se almacenaron principalmente en una solución de disolución de cromosomas durante 2.45 horas y luego en una solución de detención de metafase durante 75 minutos. Después de que las células se recogieron con tripsina, se fijaron con fijador Carnoy, se extendieron sobre portaobjetos de vidrio, se incubaron a 65 °C, durante la noche, se tiñeron con Giemsa y se analizaron las apariencias en metafase mediante un microscopio óptico (Figura 10).

Resultados experimentales

Se realizaron análisis de viabilidad celular *in vitro* en células L929 (células de fibroblastos de ratón) con el fin de determinar los efectos tóxicos de las moléculas, solas o en combinación, en la mezcla de gel compuesta de combinación de pentaborato de sodio pentahidrato y polímero de poloxámero. Se observó que la mezcla de 15 µg/ml de pentaborato de sodio pentahidrato y poloxámero, que se utilizó en la preparación del gel, no tuvo un efecto tóxico en las células de fibroblastos de ratón usadas como células modelo en experimentos de cicatrización de heridas. Después de los análisis MTS que se realizaron durante un período de tres días, se determinó que la combinación de gel y las sustancias usadas en su composición no tenían efecto tóxico (Figura 1).

Los análisis de toxicidad se repitieron para descubrir el efecto dependiente del tiempo y el período de metabolización adecuado para el gel con las concentraciones y combinaciones usadas en los análisis de viabilidad celular. Se realizaron experimentos MTS con células L929 a las 3, 6, 9 y 12 horas y se determinó el período de actividad óptimo. Después de los análisis, se determinó que la aplicación de 9 horas era el período de tiempo en el que se observaba la actividad máxima (Figura 2).

Con el fin de descubrir si el pentaborato de sodio pentahidrato usado como ingrediente activo dentro de la combinación de gel tiene efectos negativos sobre la viabilidad celular a altas concentraciones en condiciones *in vitro*, se realizaron análisis de toxicidad durante tres días para la mezcla de gel preparada dentro de carbopol usado como 8 concentraciones diferentes que varían entre 1 y 8 mg/ml y una molécula portadora. Cuando se analizó estadísticamente, se determinó una cantidad significativa de efecto tóxico a concentraciones superiores a 5 mg/ml (Figura 3).

Después de los análisis de toxicidad realizados en células de fibroblastos de ratón, también se completaron los análisis de viabilidad celular en la línea celular de fibroblastos humanos. Los análisis de viabilidad celular se realizaron en fibroblastos humanos en condiciones *in vitro* usando nueve concentraciones diferentes que varían entre 10 y 200 µg/ml. No se observó ningún efecto tóxico a las concentraciones aplicadas (Figura 4).

En condiciones *in vitro*, el ensayo de cicatrización de heridas se realizó raspando las células que crecen como una sola capa y analizando la cicatrización, fotografiando el área de la herida en ciertos períodos de tiempo. Se realizó un experimento de cierre de heridas con células L929 en condiciones *in vitro* para determinar la actividad de la formulación de gel preparada en la cicatrización de heridas. El área de la herida fue analizada por el programa de imágenes NIH fotografiando la herida a las 0, 12 y 24 horas. Mientras que en el primer período de 12 horas, el pentaborato de sodio pentahidratado usado como ingrediente activo en el gel fue más eficaz que la combinación de gel; al final del control de 24 horas, se determinó que la combinación de gel aumentaba sustancialmente el cierre de la herida. Al final de las 12 horas, se observó aproximadamente un 49% de cierre en el grupo de control, mientras que se observaron 71% y 64% de cierre en el grupo al que se administraron pentaborato de sodio pentahidratado y la combinación de gel, respectivamente. Al final de las 24 horas, mientras que la tasa de cierre de la herida del grupo de control fue del 75%, en los grupos a los que se administró la combinación de pentaborato de sodio pentahidrato y gel, las tasas de cierre de la herida se midieron como 84% y 91%, respectivamente (Figura 5).

Los experimentos de cicatrización de heridas *in vitro* se repitieron usando células de fibroblastos humanos. El cierre de la herida se analizó tomando fotografías a las 12 y 24 horas. Cuando se analizaron las tasas de cierre de heridas,

se determinó que el pentaborato de sodio pentahidratado usado en el gel era más eficaz en la cicatrización de heridas que el grupo control y la combinación de gel. Al final de un período de 12 horas, la tasa de cierre de la herida del grupo de control se determinó como 39%, mientras que las tasas de cierre de la herida de los grupos a los que se administró pentaborato de sodio pentahidratado y combinación de gel fueron 58% y 54%, respectivamente. Al final de las 24 horas, la tasa de cierre de la herida del grupo control se midió como 67%, mientras que las tasas de cierre de la herida de los grupos a los que se administró pentaborato de sodio pentahidratado y combinación de gel se midieron como 91% y 85%, respectivamente (Figura 6).

Se realizaron experimentos de cocultivo para imitar la cicatrización de heridas en la piel. La cicatrización de heridas se analizó cultivando células de fibroblastos de ratón L929 y células endoteliales HUVEC en condiciones *in vitro*. Al final de un período de tiempo de 12 horas, la tasa de cierre de la herida del grupo de control se determinó como 41%, mientras que las tasas de cierre de la herida de los grupos a los que se administró pentaborato de sodio pentahidrato y combinación de gel se determinaron como 59% y 54 %, respectivamente. Al final de las 24 horas, la tasa de cierre de la herida del grupo de control se midió en un 76%, mientras que las tasas de cierre de la herida de los grupos a los que se administró pentaborato de sodio pentahidrato y combinación de gel se midieron en un 100% y 97%, respectivamente. Se determinó que el ingrediente activo pentaborato de sodio pentahidrato y la combinación de gel fueron más efectivos en la cicatrización de heridas en comparación con el grupo control (Figura 7).

Se realizaron análisis de PCR en tiempo real para mostrar la actividad de la combinación de gel preparada en la cicatrización de heridas en el nivel de expresión génica. Los análisis realizados a nivel de expresión génica se completaron analizando los genes que afectan la migración celular y los genes apoptóticos. La disminución en los niveles del gen Akt es un factor que afecta el cierre de la herida en las células y la disminución en el nivel del gen es un indicador del aumento en la migración celular (Jones et al., 2010). Los genes Bax y p53 juegan un papel en el mecanismo apoptótico y la disminución en sus niveles de expresión se considera un indicador de la proliferación celular. Los resultados del análisis realizado mostraron que la combinación de gel y la molécula activa usada en la combinación disminuyeron los niveles de genes apoptóticos y los niveles de genes akt (Figura 8).

El estrés oxidativo es un factor que es eficaz en el procedimiento de cicatrización de heridas y el envejecimiento de la piel. Con la actividad de diversas enzimas antioxidantes, se eliminan las especies reactivas de oxígeno producidas en el cuerpo y sus efectos nocivos. El efecto de la combinación de gel desarrollada en la presente invención sobre la actividad enzimática antioxidante se determinó midiendo los niveles de glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa (SOD) y malondialdehído (MDA). La glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y el malondialdehído se usan en la literatura en estudios de cicatrización de heridas como un indicador para observar los efectos del estrés oxidativo. SOD convierte el ion superóxido en peróxido de hidrógeno y el peróxido de hidrógeno resultante se convierte en agua con glutatión peroxidasa en lisozima. Adicionalmente, la MDA también se produce como resultado de la peroxidación lipídica y causa mutaciones al interactuar con el ADN. El aumento de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa y la disminución del nivel de MDA se consideran indicadores de una cicatrización de heridas eficaz (Bayati and Abdulla, 2012). El hecho de que la glutatión peroxidasa tiene un efecto protector en la etapa de inflamación de la cicatrización de heridas se demuestra en los estudios realizados (Munz et al., 1997). La actividad de la glutatión peroxidasa se mide indirectamente analizando la oxidación de NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) basada en la absorbancia. Se determinó una cantidad sustancial de actividad enzimática en la combinación de gel y los grupos de pentaborato de sodio pentahidrato en comparación con el grupo de control. La actividad de la enzima superóxido dismutasa se determinó indirectamente. El alto nivel de actividad enzimática se observó en la combinación de gel y los grupos pentaborato de sodio pentahidrato.

Cuando se analizaron los niveles de malondialdehído, que son indicadores de la peroxidación lipídica, se observaron niveles bajos de MDA en la combinación de gel y los grupos de pentaborato de sodio pentahidrato en comparación con el grupo de control. Cuando se examinaron los parámetros de estrés oxidativo, se determinó que el grupo de pentaborato de sodio pentahidrato solo era más eficaz que la combinación de gel (Figura 9).

Se realizaron análisis de cariotipo para determinar si la combinación de gel preparada causó una anomalía cromosómica en las células. Los resultados mostraron que cuando se aplicaron de pentaborato de sodio pentahidrato y combinación del gel, las células mantuvieron sus cariotipos normales (Figura 10).

Mediante el uso del "hidrogel basado en polímero" de la presente invención; loción, crema, emulsión, pulverizador, espuma, gelatina, pasta, polvo o yesos, placa de piel y apósitos para heridas pueden desarrollarse en diferentes composiciones terapéuticas que son antimicrobianas (antibacterianas, anticandidales, antifúngicas) y curación rápida de heridas, y que previenen la formación de arrugas y cicatrices.

Se pueden agregar todo tipo de perfumes, humectantes y surfactantes, que no interactuarán químicamente con los productos en las formulaciones, a dicho hidrogel a concentraciones adecuadas de modo que no reduzcan las propiedades antimicrobianas, de cicatrización de heridas y de antienvjecimiento de los mismos.

La formulación de hidrogel descrita en el presente documento de patente se puede usar en todos los productos médicos, productos de cuidado personal, aplicaciones cosméticas, formulaciones de fármacos y aplicaciones médicas una vez optimizada.

Referencias

- Al-Bayat, Fouad, and Mahmood Ameen Abdulla. "A Comparison of Wound Healing Rate Following Treatment with Aftamed and Chlorine Dioxide Gels in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012 (2012).
- auf dem Keller, Ulrich, et al. "Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds." *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Vol. 11. No. 1. Nature Publishing Group, 2006.
- Bartosz, Grzegorz. "Reactive oxygen species: destroyers or messengers?" *Biochemical pharmacology* 77.8 (2009): 1303-1315.
- Batrakova, Elena V., and Alexander V. Kabanov. "Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers." *Journal of Controlled Release* 130.2 (2008): 98-106.
- Baum, Christian L., and Christopher J. Arpey. "Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events." *Dermatologic surgery* 31.6 (2006): 674-686.
- Benderdour, M., et al. "Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation." *Journal of trace elements in medicine and biology* 14.3 (2000): 168-173.
- Benderdour, M., et al. "Boron modulates extracellular matrix and TNF α synthesis in human fibroblasts." *Biochemical and biophysical research communications* 246.3 (1998): 746-751.
- Benderdour, Mohamed, et al. "Effect of boric acid solution on cartilage metabolism." *Biochemical and biophysical research communications* 234.1 (1997): 263-268.
- Bowler, P. G., B. I. Duerden, and D. G. Armstrong. "Wound microbiology and associated approaches to wound management." *Clinical microbiology reviews* 14.2 (2001): 244-269.
- Brett, David. "A review of collagen and collagenbased wound dressings." *Wounds* 20.12 (2008):347-353.
- Chebassier, Nathalie, et al. "In vitro induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in keratinocytes by boron and manganese." *Experimental dermatology* 13.8 (2004):484-490.
- Clark, Richard AF. "Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin." *Journal of Investigative Dermatology* 94 (1990): 128s-134s.
- Diegelmann, Robert F., and Melissa C. Evans. "Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing." *Front Biosci* 9.1 (2004): 283-289.
- Ellis, Ian R., et al. "Migration Stimulating Factor (MSF) promotes fibroblast migration by inhibiting AKT." *Cellular signalling* 22.11 (2010): 1655-1659.
- Fernandes, Desmond, and Massimo Signorini. "Combating photoaging with percutaneous collagen induction." *Clinics in dermatology* 26.2 (2008): 192-199.
- Gordillo, Gayle M., and Chandan K. Sen. "Revisiting the essential role of oxygen in wound healing." *The American journal of surgery* 186.3 (2003): 259-263.
- Hotel-Dieu, Place A. Ricordeau, and FR44035 NANTES. "Stimulatory effect of boron and manganese salts on keratinocyte migration." *Acta Derm Venereol* 84 (2004): 191-194.
- Kabanov, Alexander V., et al. "Micelle formation and solubilization of fluorescent probes in poly (oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) solutions." *Macromolecules* 28.7 (1995): 2303-2314.
- Lalitha, M. K. "Manual on antimicrobial susceptibility testing." URL: <http://www.ijmm.org/documents/Antimicrobial.doc> (2005).
- Masaki, Hitoshi. "Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects." *Journal of dermatological science* 58.2 (2010): 85-90.
- McPherson JM, Piez KA. Collagen in dermal wound repair.In: Clark RAF, Henson PM, editors. *The molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press, 1988: 471-91.

- Munz, B., et al. "A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair." *Biochemical Journal* 326.Pt 2 (1997): 579.
- 5 Nzietchueng, Rosine Mayap, et al. "Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing." *Journal of trace elements in medicine and biology* 16.4 (2002): 239-244.
- O'Toole, Edel A., Mimi Goel, and David T. Woodley. "Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration." *Dermatologic surgery: official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.]* 22.6 (1996): 525.
- 10 Panchatcharam, Manikandan, et al. "Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species." *Molecular and cellular biochemistry* 290.1 (2006): 87-96.
- Pillai, S., C. Oresajo, and J. Hayward. "Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation induced matrix degradation-a review." *International journal of cosmetic science* 27.1 (2005): 17-34.
- 15 Ramírez, Octavio T., and R. Mutharasan. "The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress." *Biotechnology and bioengineering* 36.9 (2004): 911-920.
- 20 Robson, Martin C. "Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria." *Surgical Clinics of North America* 77.3 (1997): 637-650.
- Schultz, Gregory S., and Annette Wysocki. "Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing." *Wound Repair and Regeneration* 17.2 (2009): 153-162.
- 25 Singer, Adam J., and Richard AF Clark. "Cutaneous wound healing." *New England journal of medicine* 341.10 (1999): 738-746.
- 30 Steiling, Heike, et al. "Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair." *Experimental cell research* 247.2 (1999): 484-494.
- Takasao, Naoko, et al. "Cinnamon extract promotes type I collagen biosynthesis via activation of IGF-I signaling in human dermal fibroblasts." *Journal of agricultural and food chemistry* 60.5 (2012): 1193-1200.
- 35 Walter, M. N. M., et al. "Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays." *Experimental cell research* 316.7 (2010): 1271-1281.
- 40 Yalvac, Mehmet E., et al. "Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electro-poration." *Neurochemical research* 34.7 (2009): 1272-1277.
- Yalvaç, Mehmet E., et al. "Human tooth germ stem cells preserve neuro-protective effects after longterm cryo-preservation." *Curr Neurovasc Res* 7 (2010): 49-58.
- 45 Yalvaç, Mehmet E., et al. "Differentiation and Neuro-Protective Properties of Immortalized Human Tooth Germ Stem Cells." *Neurochemical research* 36.12 (2011): 2227-2235.
- Zoutman, Dick, Shirley McDonald, and Dilini Vethanayagan. "Total and attributable costs of surgicalwound infections at a Canadian tertiary-care center." *Infection control and hospital epidemiology* (1998): 254-259.
- 50

REIVINDICACIONES

1. Hidrogel; que es contra el envejecimiento, cicatrizante de heridas y antimicrobiano que se obtiene al agregar pentaborato de sodio pentahidrato y poloxámero al gel que se usa como portador.
- 5 2. Hidrogel según la reivindicación 1, caracterizado por el uso de pentaborato de sodio pentahidrato al 3%.
3. Hidrogel según las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por un 4% de poloxámero usado en el gel preparado.
- 10 4. Hidrogel según las reivindicaciones 1 a 3, que se puede usar en una loción, crema, emulsión, pulverizador, espuma, pasta, polvo, yeso, placa de piel, apósitos para heridas.

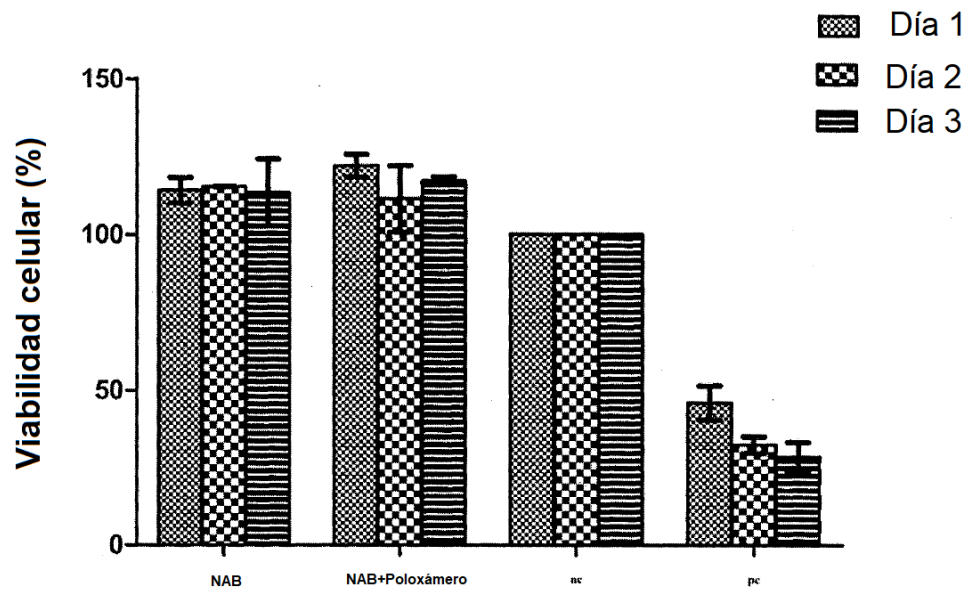


Figura 1

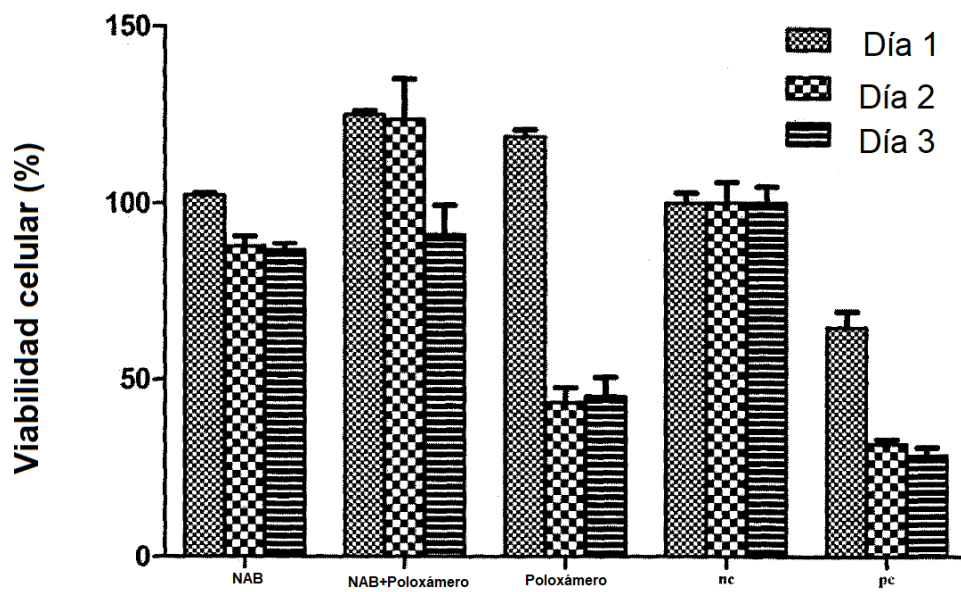


Figura 2

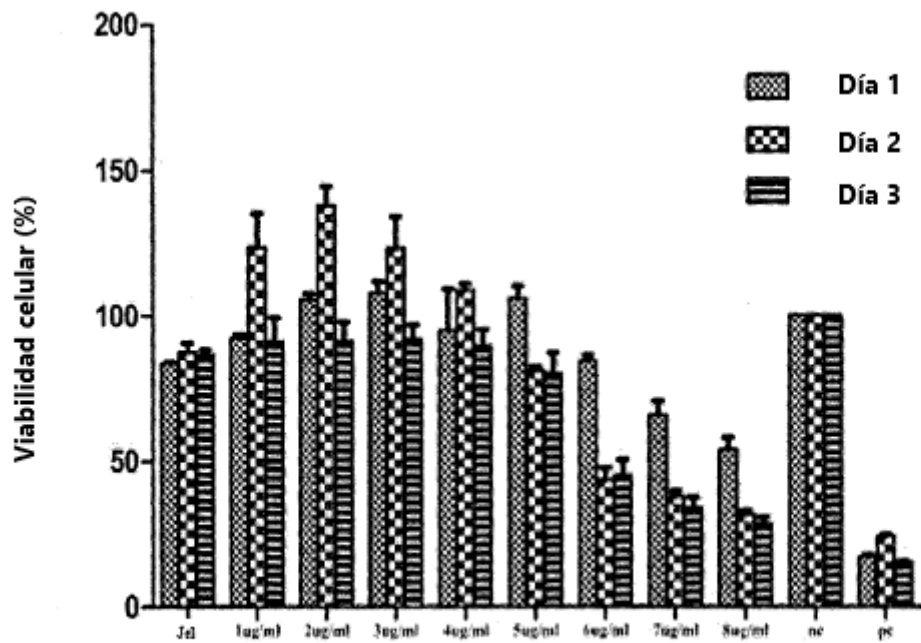


Figura 3

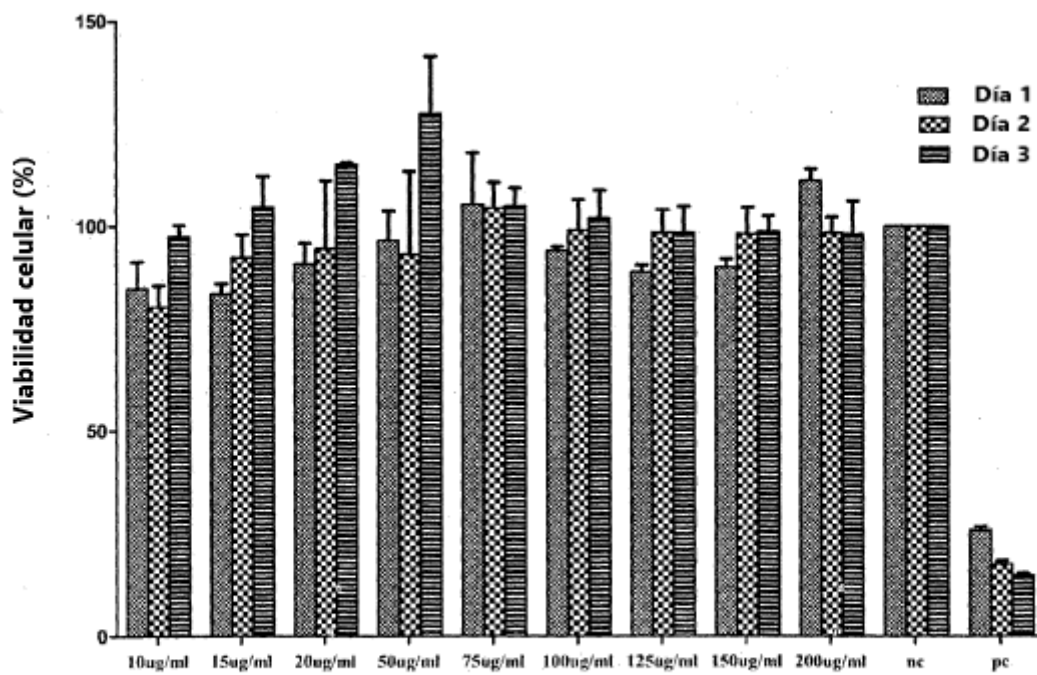


Figura 4

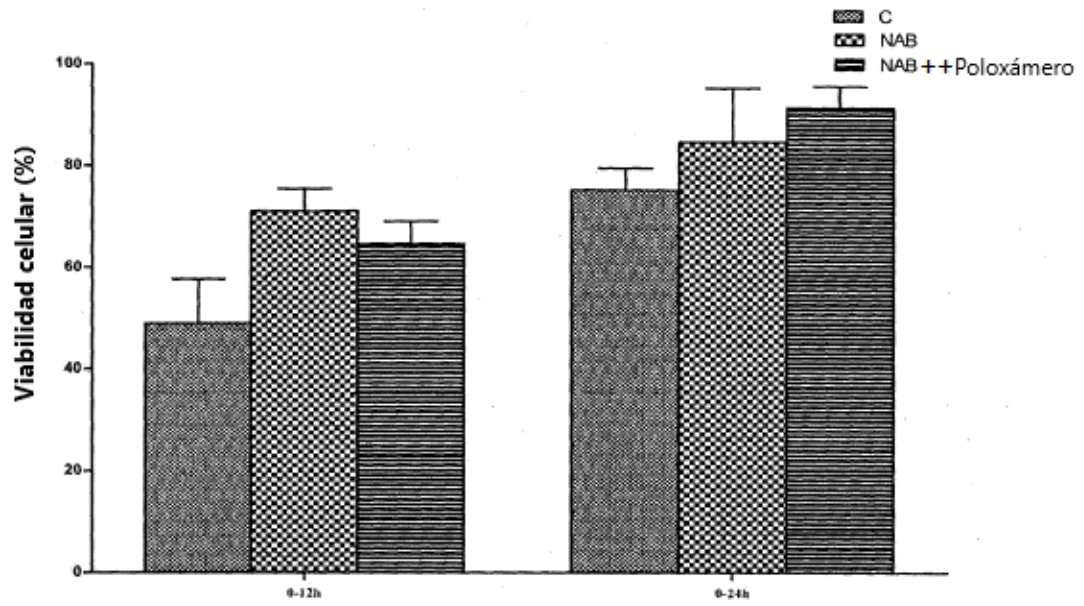


Figura 5

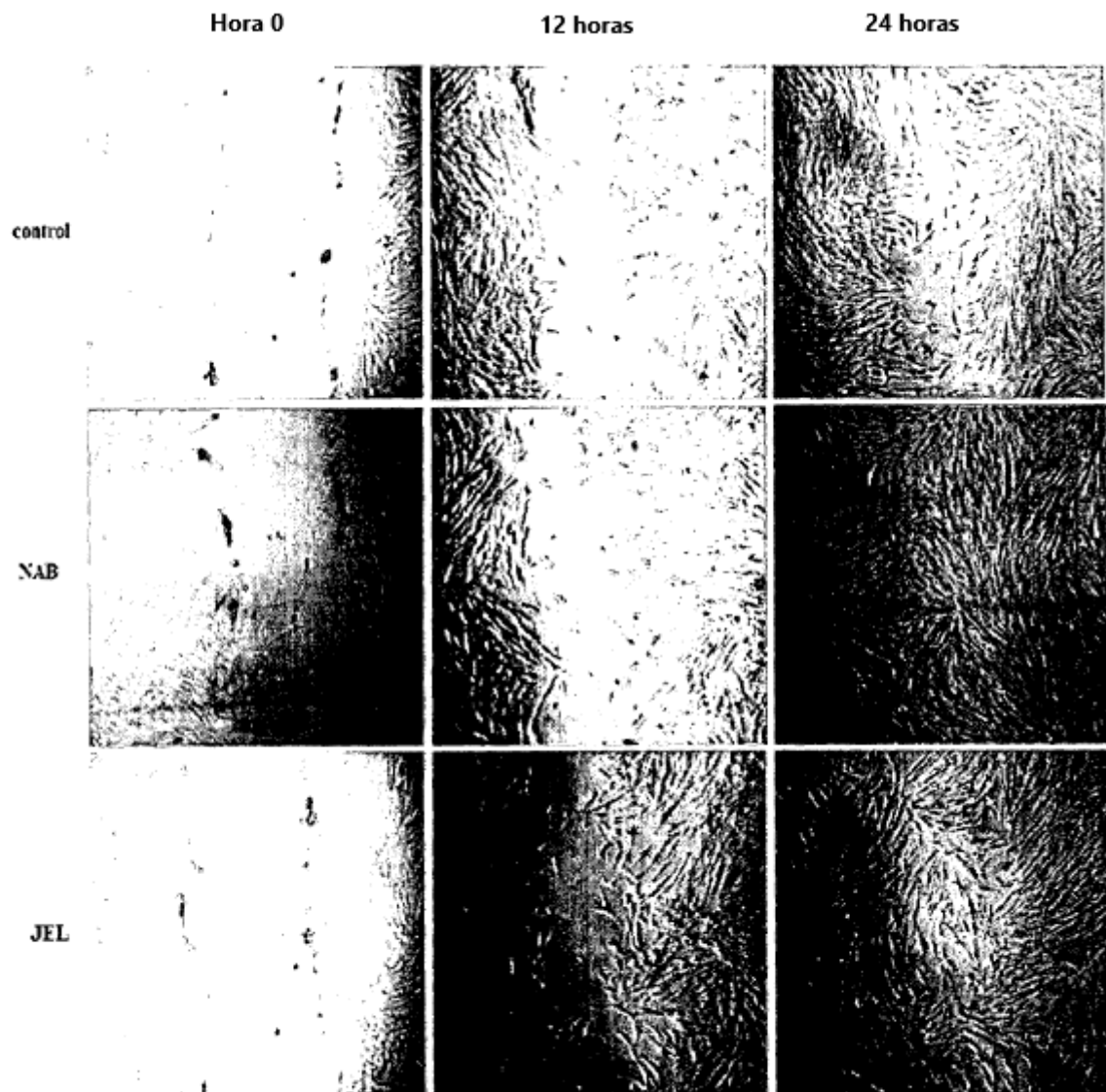


Figura 6

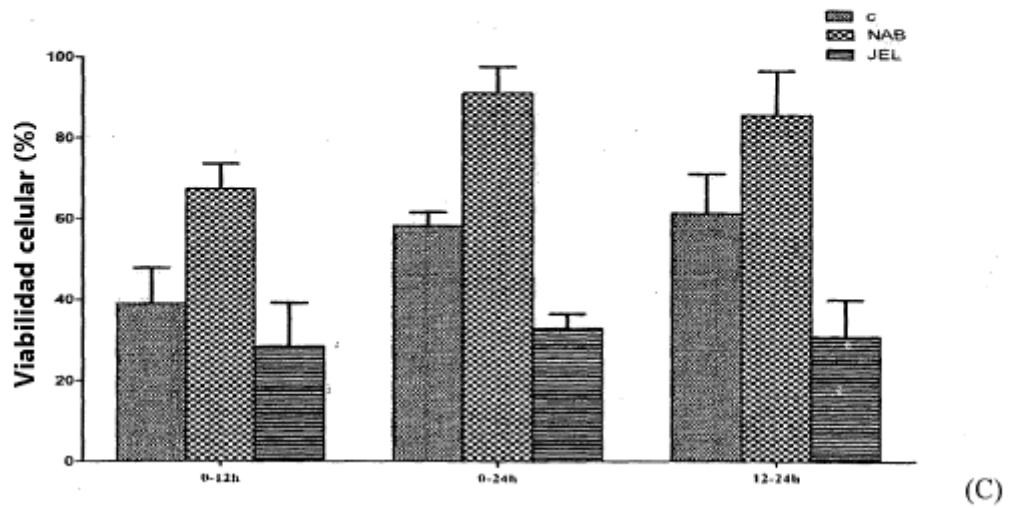
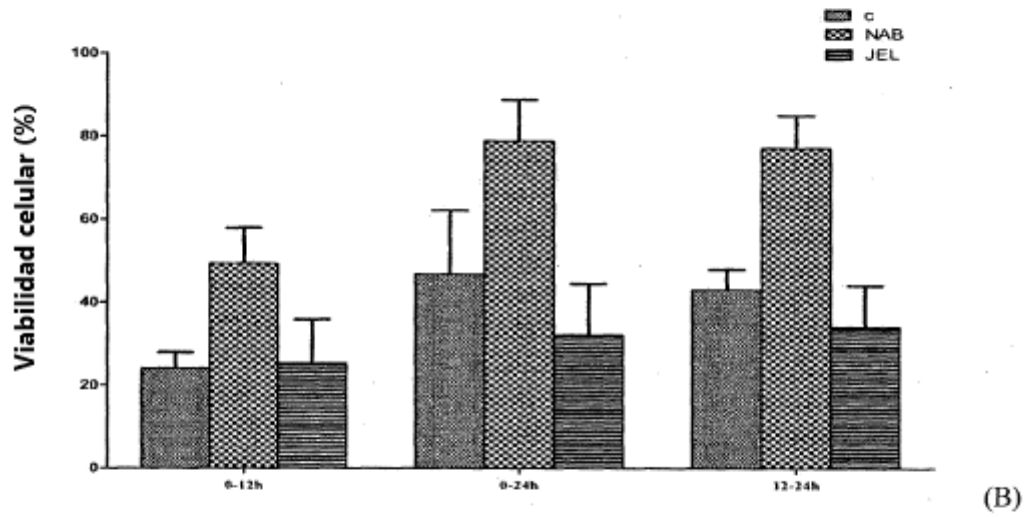
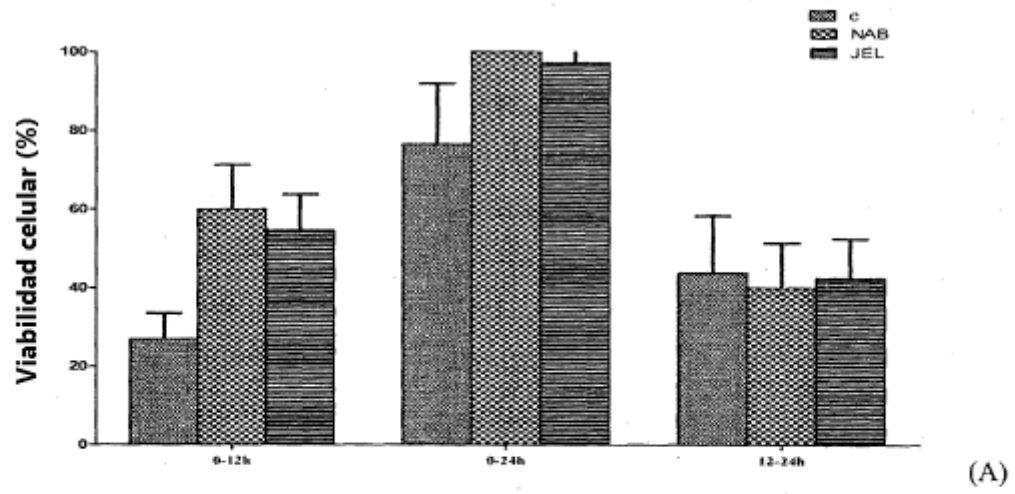


Figura 7

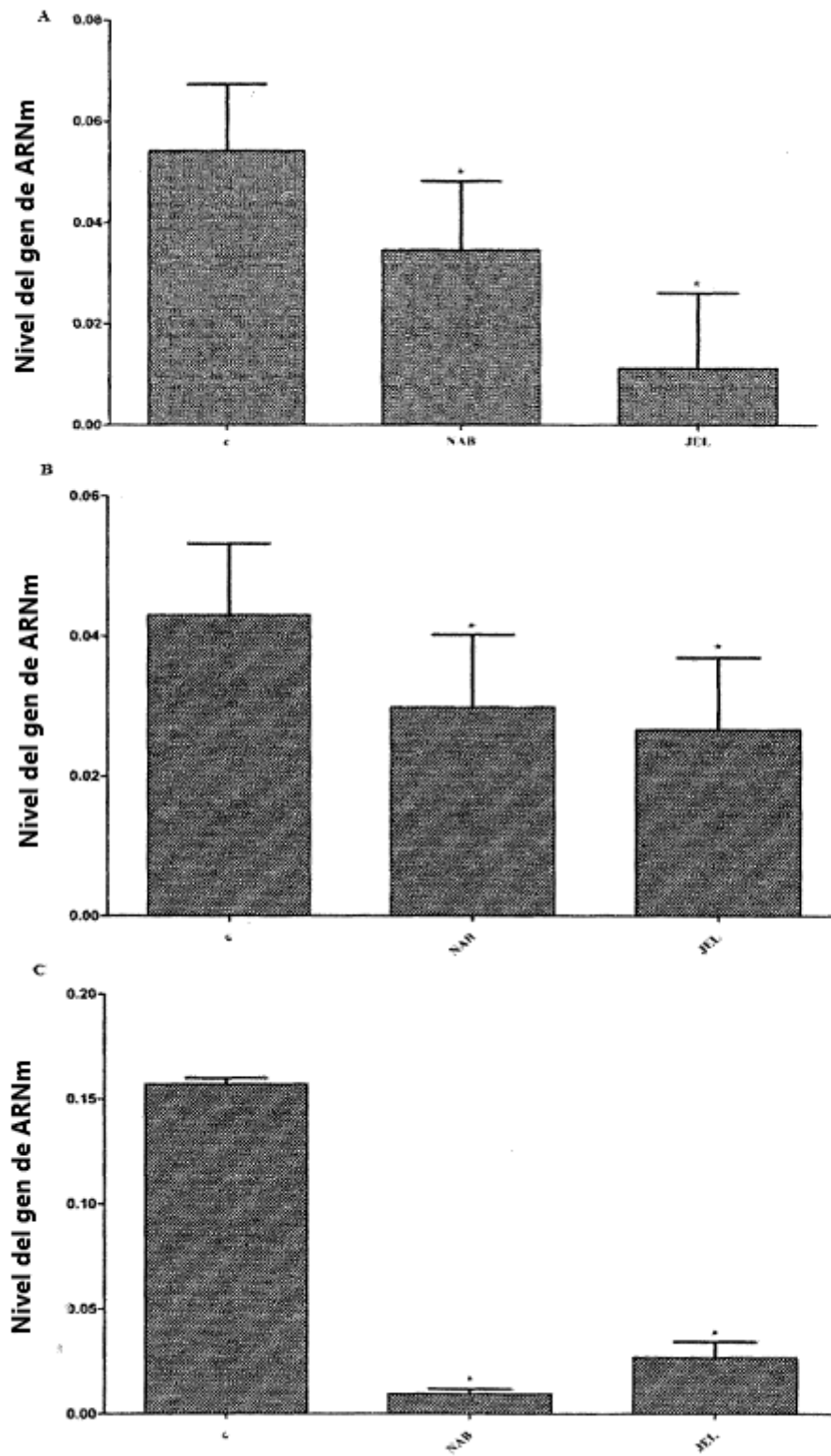


Figura 8

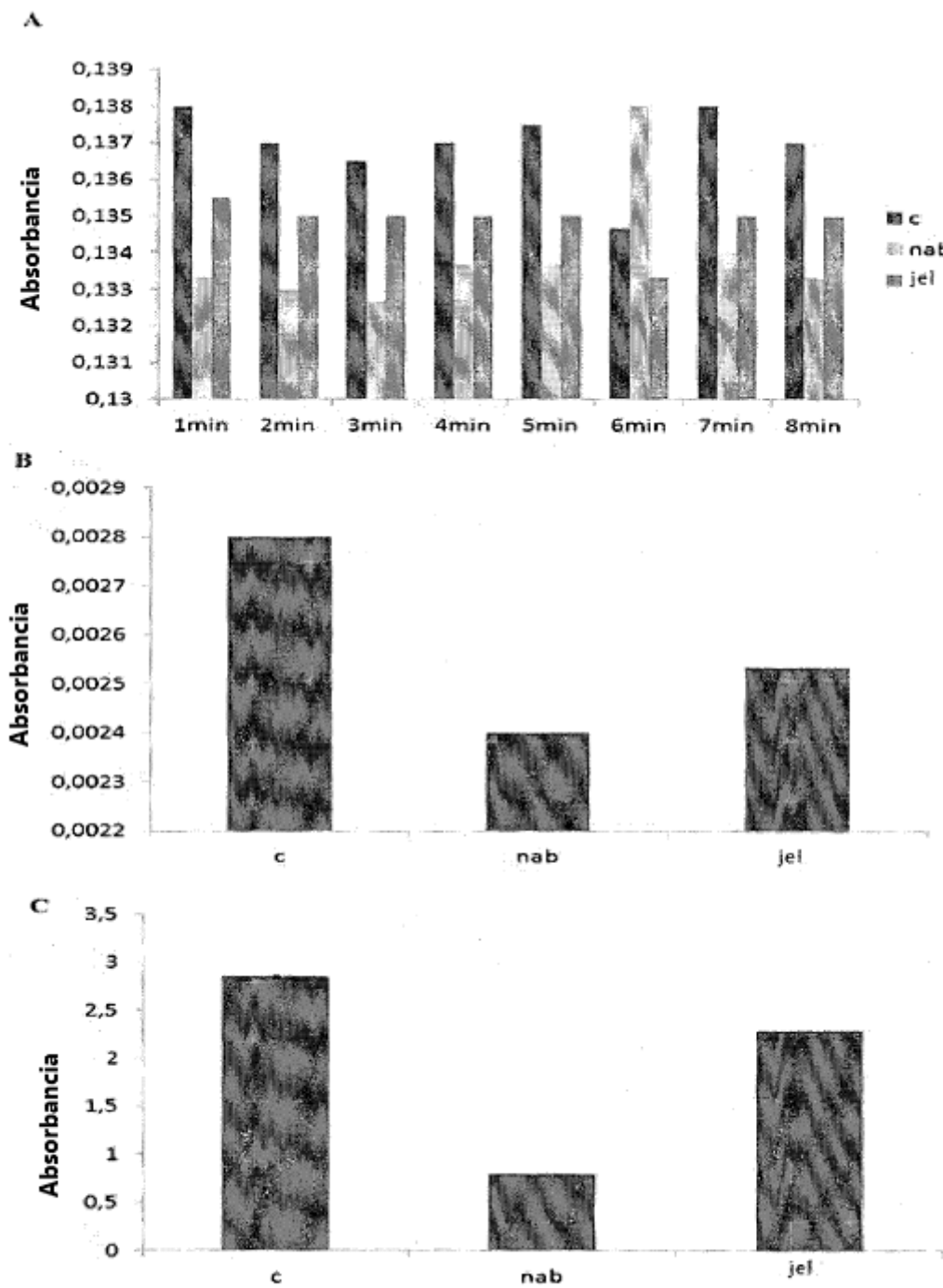


Figura 9

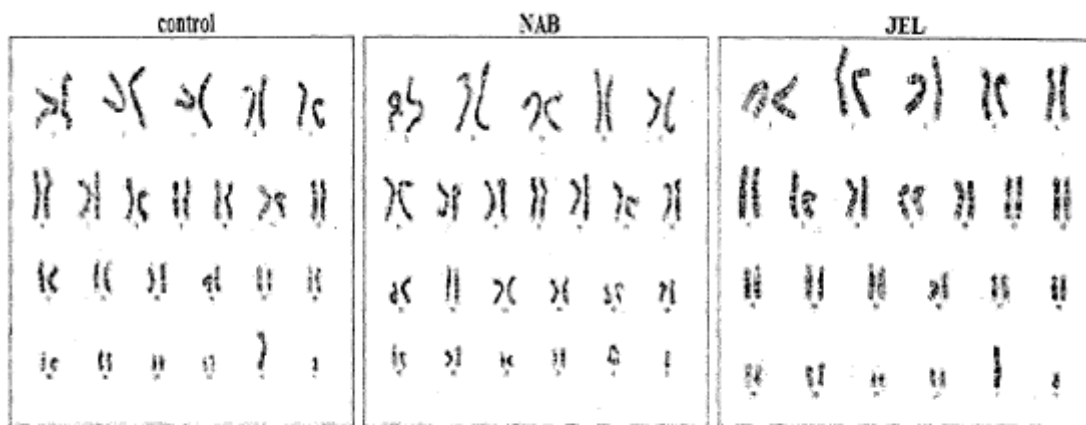


Figura 10