



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 897**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/16** (2006.01)  
**A61P 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04809189 .6**  
86 Fecha de presentación : **23.12.2004**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1701733**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2006**

54 Título: **Protección de superficie de tejidos biológicos expuestos.**

30 Prioridad: **30.12.2003 SE 0303588**  
**01.09.2004 US 606130 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **Bioactive Polymers AB.**  
**c/o Mats Johnsson Steglitsvägen 20 B**  
**227 32 Lund, SE**

72 Inventor/es: **Bengmark, Stig;**  
**Larsson, Kare;**  
**Lindman, Björn y**  
**Andersson, Roland**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 305 897 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

Protección de superficie de tejidos biológicos expuestos.

### 5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a una red de barrera biodegradable que comprende dos polipéptidos, siendo uno aniónico y el otro catiónico. La invención también se refiere a aplicadores y kits que comprenden componentes para ser usados para crear dicha red de barrera biodegradable. La invención también proporciona el uso de dicho aplicador o kit en una terapia, tal como en medicina, medicina veterinaria y horticultura.

### **Antecedentes de la invención**

Las superficies de los tejidos deben protegerse dependiendo del tipo y grado de exposición y desgaste químico a los que normalmente se someten. Por tanto, todas las células en el cuerpo están cubiertas por una membrana celular de bicapa que consiste, fundamentalmente, en lípidos y proteínas. Las superficies epiteliales, que están conectadas con el mundo exterior, y el tracto respiratorio, gastrointestinal y, hasta cierto grado, el tracto genitourinario, están expuestas a un entorno bastante duro. Estas superficies epiteliales también están cubiertas por una capa mucosa que tiene propiedades viscoelásticas y muy protectoras. Por otra parte, los tejidos, tales como la sinovia y el mesoteilo, no están protegidos por mucosa, puesto que no están expuestos a una condición drástica de la misma magnitud.

Además, los tejidos epiteliales vitales, tales como vasos sanguíneos u órganos sanguíneos, están revestidos por membranas mucosas, serosas, sinoviales y endoteliales, de forma que pueden funcionar independientemente entre sí. Las membranas peritoneales, pericárdicas y pleurales consisten en una única capa de células mesoteliales, que está cubierta por una fina película de fluido peritoneal. Los componentes de las membranas, así como la capa cobertora de fluido, tienen varias funciones, por ejemplo, la lubricación de los órganos que encierran.

La membrana epitelial protectora es muy delgada y está formada por una capa delicada de tejido conectivo cubierta por una monocapa de células mesoteliales y sólo una o pocas bicapas de fosfolípidos. Esto hace que el tejido sinovial y del mesotelio sea especialmente vulnerable a las infecciones y traumatismos. Cuando una de estas membranas se expone a un problema físico, químico o microbiano, en respuesta a ello a menudo se liberan muchas sustancias potentes que son perjudiciales para las membranas. Por consiguiente, la estructura y función de la membrana puede destruirse con facilidad cuando se producen traumatismos, isquemia e infecciones. Después de la irritación de una membrana sensible al estrés, por ejemplo, sólo por la desecación o abrasión de las superficies de las membranas durante una cirugía, ésta será cubierta con rapidez por un coágulo de fibrina. Puesto que la actividad activadora del plasminógeno (es decir, la capacidad fibrinolítica) es menor después de un traumatismo, los coágulos de fibrina después se organizan como adhesiones fibrosas, es decir, pequeñas bandas o estructuras a través de las cuales las membranas serosas o sinoviales adyacentes se adhieren de una manera anómala. Las operaciones quirúrgicas, la infección o la inflamación de estas partes del cuerpo, que están revestidas con membranas serosas o sinoviales, pueden dar como resultado una inflamación adhesiva, independientemente del tamaño del área afectada. Las adhesiones entre tejidos epiteliales vitales se forman en los primeros días después de una cirugía, traumatismo o infección, y pueden observarse no sólo en porciones concretas del cuerpo, sino en todos los tejidos vitales. Estas adhesiones entre, por ejemplo, las zonas de contacto entre los intestinos, o entre los intestinos y la pared abdominal, son el resultado de daños tisulares, que a menudo pasan inadvertidos, tales como la desecación, y se producen por diversas razones, incluyendo la estimulación mecánica y química de tejidos vitales que acompaña a las manipulaciones quirúrgicas, la infección bacteriana postoperatoria, la inflamación u otras complicaciones.

Puede observarse una adhesión de tejidos epiteliales vitales, grande o pequeña, en la mayoría de los campos quirúrgicos. Se ha informado que de todos los pacientes que han sufrido cirugía abdominal en un hospital a lo largo de un periodo de cuatro años, se ha descubierto que 93% tenían adhesiones de operaciones previas. Además, en un periodo de 10 años será necesaria una prevención de la adhesión en aproximadamente 20% de todas las operaciones quirúrgicas, que corresponde con más de un millón de operaciones anuales en cada gran continente.

Sin embargo, las adhesiones postquirúrgicas obtenidas son el resultado de una respuesta natural de curación de heridas en los daños en tejidos que se producen durante una cirugía. Numerosos factores desempeñan un papel en la curación de heridas peritoneales y el desarrollo de adhesiones. Entre otros, se sabe que los macrófagos peritoneales desempeñan un papel importantes en la reparación peritoneal inicial.

Por tanto, mientras se espera que, después de la cirugía, el cuerpo produzca nuevas capas protectoras, resulta deseable suministrar la correspondiente protección desde el exterior a las superficies epiteliales expuestas de una manera eficaz. Además, resulta importante prevenir o reducir la infección y/o la inflamación obtenida después de una cirugía, así como la formación de fibrina acompañante.

Se ha informado acerca de diversas macromoléculas y materiales bioactivos que disminuyen el grado de las adhesiones abdominales postoperatorias. De forma similar, se ha estudiado una serie de métodos para limitar la formación de la adhesión quirúrgica, con unos resultados prometedores pero a menudo ambiguos. Sin embargo, la mayoría de los esfuerzos realizados para evitar o reducir las adhesiones peritoneales postoperatorias finalmente se han abando-

## ES 2 305 897 T3

nado. Entre los métodos utilizados pueden mencionarse la prevención de la formación de fibrina, la reducción de la formación de fibrina, la separación de superficies, y las técnicas quirúrgicas.

5 Se han llevado a cabo numerosas investigaciones en las que se colocan barreras en un sitio de lesión para evitar la formación de un puente de fibrina entre el tejido dañado y los órganos vecinos. Estas barreras incluyen materiales reabsorbibles, tales como celulosa regenerada oxidada enzimáticamente degradable, e hidrogeles fisioquímicamente reticulados de disolución lenta de tipo Pluronic™.

10 La mayoría de los métodos de protección de superficies epiteliales expuestas, en las que la formación de adhesión postquirúrgica es limitada, también se han enfocado en proporcionar una separación en la herida colocando un material entre los tejidos. Además, se han añadido varios tipos de disoluciones de polímeros viscosos, tales como polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa de sodio, dextranos, y ácido hialurónico, antes y/o al final de la cirugía para controlar los acontecimientos de curación de heridas después de la aparición de las supuestas lesiones en los tejidos. Se supone que estas disoluciones actúan aumentando la lubricación y evitando que los coágulos de fibrina se adhieran a otras superficies, o separando de forma mecánica los tejidos dañados mientras se curan.

15 Las disoluciones poliméricas empleadas se basan principalmente en la viscosidad del polímero de alto peso molecular, que se pretende que aumente cuando aumenta la concentración. El polímero a menudo es un polisacárido, tal como en el documento US 4.994.277, en el que se describe un gel viscoelástico de goma de xantano biodegradable en una disolución acuosa para evitar las adhesiones entre tejidos vitales. Sin embargo, la principal desventaja de estos polímeros cuando se emplean para reducir, por ejemplo, la adhesión peritoneal como revestimientos protectores durante la cirugía o como agentes de separación de superficies, es que no disminuyen significativamente las adhesiones debido a su corto tiempo de residencia en la cavidad peritoneal. El resultado es que deben realizarse más cirugías en el paciente.

20 Se han empleado disoluciones de polímeros menos viscosos como revestimientos protectores de tejidos durante la cirugía, para mantener la lubricidad natural de los tejidos y los órganos, y para proteger las membranas que los rodean. El prerrevestimiento para la protección de tejidos y para evitar la adhesión incluye el revestimiento de tejidos al principio de la cirugía, antes de que pueda producirse una manipulación e irritación significativa del tejido, y se sigue de forma continua a lo largo de la operación, de forma que puede mantenerse un revestimiento protector sobre los tejidos.

25 El documento US 5.366.964 describe una disolución viscoelástica quirúrgica para estimular la curación de heridas, que se emplea en contacto directo con células que están sometidas a una curación de heridas. La disolución está prevista para la protección de las células y para el revestimiento de las células durante la cirugía, y comprende uno o varios componentes poliméricos. Se supone que la hidroxipropilmetilcelulosa y el sulfato de condroitina van a lubricar el tejido, mientras que el hialuronato de sodio proporciona propiedades viscoelásticas a la disolución.

30 Varios agentes empleados en la actualidad para tratar las adhesiones postquirúrgicas contienen ácido hialurónico. Por ejemplo, el documento US 5.409.904 describe disoluciones que reducen la pérdida de células y los daños en tejidos, previstas para proteger a las células endoteliales durante una cirugía oftálmica. Las composiciones utilizadas están compuestas de un material viscoelástico que comprende ácido hialurónico, sulfato de condroitina, colágeno modificado y/o celulosa modificada. En el documento WO 9010031 se describe una composición para evitar la adhesión de tejidos después de una cirugía que contiene dextrano y ácido hialurónico, en la que se supone que las sustancias van a actuar de forma sinérgica. En el documento WO 9707833 se describe un material de barrera para evitar las adhesiones quirúrgicas, que comprende ésteres bencílicos o derivados del ácido hialurónico covalentemente reticulados.

35 Se ha descubierto que un agente basado en el ácido hialurónico fabricado por Pharmacia con el nombre comercial de Healon y previsto originalmente como una instilación ocular es el agente más eficaz conocido hasta la fecha. Sin embargo, el ácido hialurónico se aísla a partir de crestas de gallo y, por tanto, es muy caro además de ser potencialmente alergénico incluso en pequeñas cantidades y aún más para grandes superficies, tales como el peritoneo, que tiene un área de aproximadamente 2 m<sup>2</sup>.

40 En el documento WO 9903481 se describe una composición para lubricar y separar tejidos y membranas biológicas de las membranas adyacentes, o de células o tejidos adyacentes, que comprende un polímero hidrófobo formado a partir de un polímero catiónico hidrosoluble biológicamente aceptable que porta grupos hidrófobos unidos covalentemente.

45 De forma similar, en el documento EP 0.705.878 se describen composiciones hidroinsolubles biocompatibles que comprenden un polisacárido polianiónico combinado con un polímero bioabsorbible hidrófobo.

50 En el documento US 6.235.313 se compara una diversidad de polímeros según su fuerza adhesiva a superficies de mucosas. Se ensayaron hidrogeles cargados negativamente, tales como alginato y carboximetilcelulosa, con grupos carboxílicos expuestos sobre la superficie, así como algunos hidrogeles cargados positivamente, tales como quitosano. La elección se basó en el hecho de que la mayoría de las membranas celulares realmente están cargadas negativamente. Sin embargo, no existe ninguna conclusión definitiva sobre cuál es la propiedad más importante para obtener una buena bioadhesión a la pared del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, se considera que el quitosano se une a una membrana mediante interacciones iónicas entre grupos amino cargados positivamente sobre el polímero, y grupos

ácido siálico cargados negativamente sobre la membrana. Por tanto, las moléculas policatiónicas, tales como el quitosano y la polilisina, tienen una fuerte tendencia a unirse a superficies epiteliales expuestas, puestos que éstas tienen, generalmente, una carga negativa neta.

5 Un inconveniente principal de estas dos moléculas cationicas es que muestran efectos tóxicos. Por ejemplo, se considera que la polilisina actúa como inhibidor del canal de calcio porque produce un cambio conformacional, inhibiendo, con ello, los flujos de iones transmembrana.

10 El documento WO 97/22371 y en Elbert *et al.*, J. Biomed. Mater. Res., 1998, vol. 42, pp. 55-65, se describen composiciones de barrera basadas en polímeros reticulados que incluyen polilisina y otro componente, tal como polietilenglicol.

### Sumario de la invención

15 La invención se refiere a una nueva red de barrera biodegradable inventada, que no es tóxica, que es posible producirla con bajo coste, que es biodegradable y no alergénica. Esta red permite la posibilidad de tratar las adhesiones postquirúrgicas de una manera eficaz.

20 En primer lugar, la invención se refiere a una red de barrera biodegradable que comprende un polipéptido cationico, un polipéptido aniónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 En segundo lugar, la invención se refiere a un aplicador que comprende un polipéptido cationico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, un polipéptido aniónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, estando dicho péptido cationico y aniónico separados entre sí mediante un separador.

30 En tercer lugar, la invención se refiere a un kit que comprende un polipéptido cationico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, un polipéptido aniónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un medio para administrar dicho polipéptido cationico y aniónico.

35 Por último, la invención proporciona un método para tratar a un mamífero que presenta una lesión, que comprende el uso del aplicador o el kit según la invención para crear una red de barrera biodegradable según la invención.

40 Proporcionando dicha red, aplicador y kit, un nuevo producto mejorado estará disponible en el mercado para ser utilizado en la curación de heridas.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

45 En el contexto de la presente invención se aplican las siguientes definiciones:

50 La expresión “red de barrera biodegradable” pretende significar una barrera que evite la adhesión entre tejidos en una lesión, y que proporcione protección a un tejido lesionado frente, por ejemplo, a la inflamación y los agentes infecciosos. Además la barrera es degradable a lo largo del tiempo durante el proceso de curación de la lesión.

55 La “red” pretende significar una red formada entre una mezcla de al menos dos polipéptidos, en la que al menos uno es cationico y el otro es aniónico.

60 El “mismo tipo de resto aminoácido” pretende significar que los restos aminoácidos en un polipéptido son, por ejemplo, sólo H (H-H-H-H-H-H-H).

65 En el presente contexto, los nombres de los restos aminoácidos empleados son los definidos en la Protein DataBank (PNB) ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)), que están basados en la nomenclatura de la IUPAC (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, Eur. J. Biochem., 138, 9-37 (1984), junto con sus correcciones en Eur. J. Biochem., 1542, 1 (1985)). El término “aminoácido” pretende indicar un aminoácido del grupo que consiste en arginina (Arg o R), histidina (His o H), lisina (Lys o K), aspartato (Asp o D), y glutamato (Glu o E).

#### *La red de barrera biodegradable*

65 La invención se refiere a una red de barrera biodegradable. La red de barrera biodegradable se produce en los sitios de lesiones. La red comprende un polipéptido cationico, un polipéptido aniónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La red se forma aplicando al menos un polipéptido aniónico y al menos un polipéptido cationico en secuencia a un tejido. El vehículo del polipéptido cationico está gelificado para concentrar su administración. El tejido lesionado y la membrana protectora se retiran parcial o totalmente. Por tanto, el tejido subyacente se expone y la red actúa como protección de las superficies epiteliales expuestas de un mamífero, tal como seres humanos o animales.

El polipéptido cationico puede seleccionarse del grupo que consiste en los restos aminoácidos R, H, K, sus variantes sintéticos y semisintéticos y sus mezclas, tales como una polilisina, poliarginina o polihistidina. El polipéptido puede

## ES 2 305 897 T3

estar en la forma L. El polipéptido puede ser un polipéptido que consiste en uno y el mismo resto aminoácido, tal como R-R-R-R o H-H-H-H, o una mezcla de éstos, tales como R-H-R-R-H, etc. Uno o más restos aminoácidos sintéticos o semisintéticos también pueden estar presentes en el polipéptido.

5 El polipéptido aniónico puede seleccionarse del grupo que consiste en los restos aminoácidos D, E, sus variantes sintéticos y semisintéticos, tales como poliglutamato o poliaspartato. El polipéptido puede estar en la forma L. El polipéptido puede ser un polipéptido que consiste en uno y el mismo resto aminoácido, tal como D-D-D-D o E-E-E-E, o una mezcla de éstos, tales como D-D-E-D-E. Uno o más restos aminoácidos sintéticos o semisintéticos también pueden estar presentes en el polipéptido.

10 La longitud de los polipéptidos puede ser la misma o diferente, dependiendo de dónde se va a formar la barrera biodegradable, es decir, dependiendo del tejido al que se va a aplicar. El tamaño puede ser al menos 5.000 Da, tal como entre aproximadamente 5.000 a aproximadamente 50.000 Da. Los ejemplos son 6.000, 7.000, 8.000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 40.000 y sus mezclas.

15 Además, al menos uno de los polipéptidos mencionados anteriormente puede estar unido al menos a un resto aminoácido neutro diferente, otros péptidos u otras sustancias, tales como una sustancia que limpie las superficies lesionadas, proporcione antioxidantes, module la apoptosis, estimule la curación, inhiba la fibrogénesis y el crecimiento tumoral, controle el sangrado, inhiba la inflamación, aumente la estabilidad o proteja frente a infecciones. Los ejemplos son agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes limpiadores, antioxidantes, moduladores de la apoptosis, agentes de curación, inhibidores de la fibrogénesis, agentes antitumorales y agentes antisangrado.

20 Por consiguiente, los polipéptidos pueden modificarse mediante amidación, esterificación, acilación, acetilación, PEGilación o alquilación.

25 La red mencionada anteriormente también puede comprender un diluyente o tampón farmacéuticamente aceptable.

30 Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa una sustancia no tóxica que no interfiera con la eficacia de la actividad de protección de superficies de los polipéptidos. Estos tampones o diluyentes aceptables son muy conocidos en la técnica (véase Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990)).

35 El término “tampón” pretende significar una disolución acuosa que contiene una mezcla de ácido-base con el fin de estabilizar el pH. Los ejemplos de tampones son trizma, bicina, tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPMS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPPO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazol-láctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO, TES, tricina.

40 El término “diluyente” pretende significar una disolución acuosa o no acuosa para diluir el péptido en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de disolución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tal como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

45 La red de la invención también puede comprender uno o más agentes terapéuticos, tales como antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, sustancias que limpien las superficies lesionadas, proporcionen antioxidantes, modulen la apoptosis, estimulen la curación, inhiban la fibrogénesis y el crecimiento tumoral, o controlen el sangrado.

50 Los ejemplos de agentes terapéuticos son las penicilinas, cefalosporinas, carbacefemos, tetraciclinas, macrólidos, yodo, plata, cobre, clorhexidina, ácido acetilsalicílico, y los ejemplos de sustancias limpiadoras son las enzimas proteolíticas.

Los ejemplos de agentes que tengan actividad antioxidante son diversas vitaminas, glutatión, ácido fólico, curcumina, resveratrol, epigallocatequina, antocianidinas y numerosos otros agentes.

55 Los ejemplos de agentes que modulan la apoptosis, inhiben la fibrinogénesis y el crecimiento tumoral son los glucocorticosteroides, insulina, dexametasona, carotenoides, ácido linoleico y ácidos linoleicos conjugados, melatonina, isotiocianatos, shikonina, solamargina, perifosina, desoxinivalenol, carboxiamidotriazol (CAI), inhibidores de la histona desacetilasa y numerosos otros agentes.

60 Los ejemplo de agentes que estimulan la curación son diversos factores del crecimiento, insulina, vitamina E, ácido retinoico, componentes herbales y numerosos otros agentes, y los ejemplos de agentes que controlan el sangrado son la norepinefrina, gelatina, colágeno, celulosa oxidada y numerosos otros agentes.

65 El polipéptido mencionado anteriormente puede sintetizarse mediante métodos químicos convencionales, incluyendo la síntesis mediante un procedimiento automático. En general, se sintetizan análogos de péptidos basándose en la estrategia de protección de Fmoc en fase sólida convencional con HATU (N-óxido del hexafluorofosfato de N-[dimetilamino-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-ilmetilel]-N-metilmetanaminio) como agente de acoplamiento u otros agentes de acoplamiento, tales como HOAt-1-hidroxi-7-azabenzotriazol. El péptido se retira de la resina en

## ES 2 305 897 T3

fase sólida con ácido trifluoroacético que contiene los captadores apropiados, que también protegen a los grupos funcionales de las cadenas laterales. El péptido bruto se purifica aún más utilizando una cromatografía de fase inversa preparativa. Pueden emplearse otros métodos de purificación, tales como cromatografía de reparto, filtración en gel, electroforesis en gel, o cromatografía de intercambio iónico. Pueden emplearse otras técnicas de síntesis, tales como la estrategia de protección de tBoc, o el uso de diferentes reactivos de acoplamiento o similares, para producir péptidos equivalentes.

### *Un aplicador o kit de la invención*

Además, la invención se refiere a un aplicador que comprende un polipéptido catiónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, un polipéptido aniónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, estando dicho péptido catiónico y aniónico separados entre sí mediante un separador. Los polipéptidos son como se definieron anteriormente, y la disolución es una disolución farmacéuticamente aceptable como se definió anteriormente.

El aplicador puede ser una jeringa, un aerosol de uno o dos componentes, un nebulizador, escayolas, catéteres, adhesivos, implantes y vendas.

El separador que separa el polipéptido aniónico y el polipéptido catiónico antes de que se apliquen a un tejido lesionado puede ser cualquier separador, con la condición de que sea no tóxico y no influya en el efecto de los polipéptidos. El separador puede ser biodegradable. La función principal de una capa de separación entre las dos disoluciones de polipéptidos es lavar todos los péptidos catiónicos antes de la administración del polipéptido polianiónico, y evitar la precipitación dentro del aplicador. Por tanto, debería consistir sólo en agua destilada o el tampón utilizado en la disolución del polipéptido. Sin embargo, esta disolución acuosa no debería diluir las disoluciones de los polipéptidos y, por tanto, no debe administrarse sobre el polipéptido catiónico aplicado primero. El separador puede ser un estado gelificado de la disolución acuosa. Además, el separador puede ser una membrana.

Además, el aplicador puede comprender uno o más agentes terapéuticos, tales como los definidos anteriormente. Los agentes están separados de los dos polipéptidos, o están mezclados mezclan con uno o ambos polipéptidos.

El agente terapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en penicilina, cefalosporina, carbacefemos, tetraciclinas, macrólidos, yodo, plata, cobre, clorhexidina, y agentes antiinflamatorios, tales como el ácido acetilsalicílico.

Por consiguiente, la invención se refiere a un kit que comprende un polipéptido catiónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, un polipéptido aniónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y un medio para administrar dicho polipéptido catiónico y aniónico. Los polipéptidos son como se definió anteriormente.

El medio puede seleccionarse del grupo que consiste en jeringas, aerosoles, escayolas, catéteres, adhesivos, implantes y vendas.

Además, el kit puede comprender uno o más agentes terapéuticos, tales como antimicrobianos y agentes antiinflamatorios. Otros agentes terapéuticos adecuados son los definidos anteriormente. El agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en penicilina, cefalosporina, carbacefemos, tetraciclinas, macrólidos, yodo, plata, cobre, clorhexidina, y ácido acetilsalicílico.

El agente terapéutico en el aplicador o kit descrito anteriormente puede estar separado de los dos polipéptidos, o mezclado con uno o ambos polipéptidos.

El aplicador y/o el kit como se describió anteriormente puede utilizarse en una terapia, tal como en medicina, medicina veterinaria y horticultura.

Por último, la invención proporciona un método para tratar a un mamífero que presenta una lesión, que comprende el uso del aplicador y/o el kit como se describió anteriormente, creando la red descrita. Los ejemplos de áreas en las que la invención puede ser útil incluyen lesiones e infecciones del bulbo oftálmico, heridas, lesiones e infecciones nasales, lesiones e infecciones de la piel, quemaduras solares, lesiones/quemaduras térmicas de la piel, llagas producidas por un tiempo prolongado en el lecho, úlceras crónicas en la piernas, lesiones vaginales, inflamación de la vejiga urinaria, úlceras esofágicas y estomacales, inflamación y úlceras en el intestino, inflamaciones y lesiones serosas de las articulaciones, superficies cortadas o lesiones en órganos sólidos, tales como el pulmón, hígado y bazo, lesiones óseas, defectos peritoneales e inflamación.

### **Ejemplos**

La invención se describirá más a fondo a continuación y será ilustrada haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, debe advertirse que estos ejemplos no deben considerarse limitantes de la invención de ninguna manera.

## Ejemplo 1

*Prevención de la adhesión*

5 Se adoptó un modelo reproducible y estandarizado de rata y conejo. Se utilizaron 48 ratones hembra MRI con un peso de aproximadamente 25-30 g para inducir las adhesiones, y 42 para otros ensayos. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estandarizadas y tuvieron acceso ilimitado al pienso y al agua del grifo.

10 Se indujo una anestesia con quetamina 150 mg/kg (Ketalar, Parke Davis) y zilazina 7,5 mg/kg (Rompun, Bayer Sverige AB), mediante inyección intramuscular. Después de una desinfección se realizó una laparotomía de 25 mm de largo a lo largo de la línea media. Se expusieron ambas superficies peritoneales de la pared abdominal lateral, y se realizaron incisiones precisas de 2 x 15 mm de longitud a la misma distancia de la línea media, incluyendo los músculos. Las heridas se cerraron inmediatamente con suturas individuales 2 x 4 a distancias iguales utilizando polipropileno 5.0 (Prolene, Ethicon, Johnson & Johnson). La laparotomía de la línea media se cerró en dos capas con una sutura de polipropileno 5.0 continua. En el momento de la evaluación se administró una sobredosis de anestésico, 15 el abdomen se abrió totalmente a través de una incisión precisa en forma de U con la base a la derecha. Se midieron las longitudes de las adhesiones en ambos lados utilizando un calibre metálico, y los datos se expresaron como porcentaje de heridas cubiertas por adhesiones.

20 Se prepararon disoluciones acuosas frescas de poli-L-glutamato al 0,5% y poli-L-lisina el día del experimento y se conservaron en la nevera hasta su uso. Polilisina marcada con FITZ fue mezclada con polilisina en una proporción de 1:10 (en peso). Todos los productos químicos y sustratos de los cultivos celulares se obtuvieron en Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU; las micropartículas fluorescentes (marcadas con azul del Nilo) se obtuvieron en Microparticles GmbH. (Berlín, Alemania).

25 Los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos basándose en el tratamiento y el tiempo de evaluación. Los grupos control fueron inyectados por vía intraperitoneal con 2 ml de disolución de cloruro de sodio fisiológica. Dos grupos de tratamiento recibieron 1 ml de la disolución de poli-L-lisina y 5 min después 1 ml de la disolución de poli-L-glutamato. Uno de los grupos control y de tratamiento (2 x 14 animales) se sacrificó una semana después de la cirugía, 30 y se calcularon las longitudes de las adhesiones. Los dos grupos restantes (2 x 10 animales) se mantuvieron durante cuatro semanas antes de someterse al proceso de evaluación.

Se empleó el ensayo de Kruskal-Wallis para determinar la diferencia en la cantidad de adhesión entre los diferentes grupos tratados, y se utilizó el ensayo de la U de Mann-Whitney para comparar los grupos individuales.

35 Se detectó una disminución significativa en el desarrollo de adhesiones una semana y un mes después de la herida peritoneal (\*\* $p \leq 0,001$ ) comparado con los correspondientes controles (ensayo de la U de Mann-Whitney). Se obtuvo una disminución marcada (22%) pero no significativa ( $p = 0,235$ ) después de un mes entre los grupos control, mientras que no se observó diferencia entre los grupos tratados en ese momento.

40 No se descubrieron adhesiones que estuvieran relacionadas con un fuerte depósito del compuesto en diferentes emplazamientos fuera de la herida en sí misma. Después de 24 h, los animales que habían recibido poli-L-lisina y poli-L-glutamato mostraron una gran capa protectora sobre la herida peritoneal, y una película delgada en el resto de la superficie peritoneal. Sin embargo, el compuesto marcado con FITZ sólo estaba visible en la herida un día después, 45 y fue detectable sobre y dentro de la herida. El depósito fue reconstruido gradualmente hasta el final del periodo de observación de 6 días.

## Ejemplo 2

50 *Índice de ingestión de partículas y de fagocitosis*

Se ensayó el desarrollo en el tiempo de la función fagocítica *in vitro* en macrófagos residentes peritoneales de ratones después de 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 16 h, y 24 h de incubación con poli-L-lisina + poli-L-glutamato (40  $\mu\text{g/ml}$ ) y/o partículas fluorescentes (1  $\mu\text{m}$ ).

55 Se obtuvieron muestras de macrófagos mediante lavado abdominal con 10 ml de disolución DMEM enfriada en hielo. Las muestras en el medio se centrifugaron inmediatamente a 1200 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en DMEM que contenía FBS al 10% y penicilina/estreptomicina, y después se cultivaron en placas de cultivo celular de 48 pocillos, a  $5 \times 10^5$  células en cada pocillo. Después de 1,5 h, las células no adherentes se retiraron mediante un lavado, se añadieron las partículas (100/célula) junto con los fármacos de ensayo (poli-L-lisina + poli-L-glutamato) en una dosis de 40  $\mu\text{g/ml}$  a 12 x 5 pocillos, y se añadieron partículas solas al resto de los 12 x 5 pocillos. Además, se realizaron controles negativos en cada momento del tiempo. Las células se incubaron (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%) y se desprendieron y fijaron en el momento de la evaluación utilizando 250  $\mu\text{l}$  de EDTA 5 mM y un volumen igual de paraformaldehído al 2%. Se realizó un análisis FACS (FACScan, Becton Dickinson, San José, CA), en el que se 65 registró el tamaño celular (dispersión hacia adelante, FSC), granularidad (dispersión lateral, SSC) e intensidad de la fluorescencia (en canales FL3) de  $1,5 \times 10^4$  células en cada medida. En puertas definidas manualmente, la proporción de células fagocitantes/macrófagos totales se expresó en porcentaje como la media de los datos de cinco pocillos en cada momento y grupo de tratamiento (control y poli-L-lisina + poli-L-glutamato).

## ES 2 305 897 T3

Las células no tratadas incorporaron más partículas. Por tanto, el nivel máximo de meseta (mediana) de su intensidad de fluorescencia (FL3) y SSC se ajustó como 100%. Todas las medidas se expresaron como el porcentaje de la mediana del nivel de meseta y se denominó el índice de ingestión de partículas, puesto que se refiere a la cantidad de partículas ingeridas.

5

Se empleó el ensayo de la U de Mann-Whitney para comprobar la meseta de fagocitosis, y se usó el ensayo de rangos señalados de Wilcoxon para ensayar la diferencia en el índice de fagocitosis y de ingestión de partículas entre las parejas de tratamiento (control y poli-L-lisina + poli-L-glutamato, respectivamente).

10

Mientras que el índice de fagocitosis de los macrófagos no tratados alcanzó la meseta de fagocitosis en aproximadamente 5 h (la diferencia entre 4 y 5 h disminuyó por debajo del nivel insignificante,  $p = 1$ ), la población tratada requirió 8 h para el mismo efecto (la diferencia entre 8 y 10 h fue insignificante,  $p = 0,058$ ). Se obtuvo una diferencia baja pero significativa ( $p = 0,043$ ) en el índice de fagocitosis después de 24 h (97,3% y 94,3%, respectivamente).

15

El desarrollo en el tiempo del índice de ingestión, que se refiere al número de partículas fagocitadas por los macrófagos, se hizo significativo entre 1 y 2 h ( $p = 0,008$ ). La población celular control alcanzó la meseta entre 16 y 24 h (con una diferencia insignificante entre el índice a las 13 y 24 h,  $p = 0,841$ ), mientras que la población celular tratada no alcanzó la meseta en ningún momento de las primeras 24 h estudiadas. Además, el número de partículas ingeridas fue significativamente menor en el grupo tratado en todos los momentos del tiempo ( $p = 0,043$ ).

20

Una citometría de flujo verificó que los macrófagos fagocitan las partículas del compuesto de ensayo, lo cual da como resultado un significativo crecimiento celular y grandes vacuolas fagocíticas.

### Ejemplo 3

25

#### *Microscopía electrónica de transmisión*

30

Se recogieron macrófagos peritoneales de dos animales sanos no tratados como se describió anteriormente y se cultivaron en placas de cultivos de células (Thermanox, Naperville, IL, EEUU). Las células se retiraron mediante un lavado después de 1,5 h y se añadió poli-L-lisina + poli-L-glutamato (40  $\mu\text{g/ml}$ ) en disolución DMEM suplementada en secuencia, seguido de una incubación de 24 h. El medio de incubación se retiró y las células se fijaron en glutaraldehído tamponado con fosfato al 2,5%, seguido de un enjuagado en disolución fosfato de Millonig. Las muestras se postfijaron en tetraóxido de osmio al 1% y posteriormente se deshidrataron con una serie graduada de etanol, lo cual fue seguido de una inmersión en un kit de Araldite 502. Se obtuvieron secciones verticales con un cuchillo de diamante, y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo en un LKB Ultrastainer. Las muestras se estudiaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL 1200 EX.

35

La microscopía electrónica verificó que los macrófagos fagocitan las partículas del compuesto de ensayo, lo cual da como resultado un significativo crecimiento celular y grandes vacuolas fagocíticas.

40

### Ejemplo 4

#### *Microscopía electrónica de barrido*

45

Se observaron las heridas y las torundas peritoneales de ocho animales tratados (4) y no tratados (4) después de uno y siete días tras la cirugía, y los cultivos celulares se realizaron como se describió anteriormente.

50

Las muestras se fijaron en glutaraldehído tamponado con fosfato al 2,5% a temperatura ambiente, y después se postfijaron en  $\text{OsO}_4$  al 1%. Las muestras se deshidrataron en acetona, se secaron hasta el punto crítico y se revistieron mediante pulverización con oro antes de estudiarse en un microscopio electrónico LEO 420.

Los datos de SEM demostraron que las células mesoteliales cubrieron la superficie del compuesto desde el primer día.

55

### Ejemplo 5

#### *Histología*

60

Se abrieron ocho animales y después se inyectaron por vía intraperitoneal con poli-L-lisina + poli-L-glutamato. En el día primero, segundo, tercero y sexto del postoperatorio, dos animales se sacrificaron y se retiraron las heridas. Éstas fueron rápidamente congeladas y sumergidas para producir un bloque que se cortó inmediatamente en cortes de muestra de 7  $\mu\text{m}$ . Los cortes se dejaron secar en la oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente y después se tiñeron con una disolución de hidrócloruro de 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAP) 100  $\mu\text{g/l}$  durante 10 min. Se realizó una microscopía fluorescente con un filtro FITZ y un filtro DAPI, y las imágenes se fusionaron digitalmente (OpenLab, Improvision). Se realizó una macrofoto alrededor de las heridas retiradas utilizando transiluminación, luz ambiental mixta, e iluminación UV.

65

## ES 2 305 897 T3

Los estudios histológicos demostraron que el material añadido estaba presente en la herida desde el primer día. Además, más y más células fueron detectadas para cada día hasta que la matriz fue completamente reconstruida.

### Ejemplo 6

#### *Biodegradación*

Se trataron animales sanos no operados por vía intraperitoneal como en el ejemplo 1, y se sacrificaron después de dos meses.

No pudieron detectarse restos visibles de poli-L-lisina ni poli-L-glutamato. La biodegradabilidad fue apoyada por los descubrimientos realizados, en los que tras un mes de seguimiento se obtuvieron los mismos resultados utilizando una dosis doble de poli-L-lisina + poli-L-glutamato, aunque esto provocó algunas adhesiones adicionales relacionadas con el compuesto en la evaluación realizada el 7º día.

### Ejemplo 7

#### *Biodegradación*

Se prepararon disoluciones acuosas frescas de liozina al 1% y al 2%, poli-L-glutamato, poli-L-lisina y poli-L-glutamato, y ácido hialurónico al 0,25%. Las disoluciones de liozina, poliglutamato, liozina + poliglutamato, y polisina + poliglutamato entonces se administraron a los animales como en el ejemplo 1.

El grado de adhesiones abdominales una semana después de la cirugía disminuyó significativamente en los cuatro grupos tratados ( $p \leq 0,001$ ) comparados con los controles. Sin embargo, no se obtuvieron cambios significativos en la respuesta con el ácido hialurónico ( $p = 0,264$ ). Las combinaciones de poli-L-lisina/liozina parecían producir un producto insoluble.

### Ejemplo 8

#### *Efecto de la poli-L-lisina por sí sola (comparativo)*

Se preparó una disolución acuosa fresca de poli-L-lisina al 0,5% y se administró a los animales como en el ejemplo 1.

Esta administración de poli-L-lisina por sí sola produjo convulsiones y muerte en 30 min, es decir, antes de que despertasen de la anestesia. Los síntomas parecen estar relacionados con el efecto de la apertura de los canales de calcio, disminuyendo con rapidez los niveles de  $Ca^{++}$  plasmáticos.

#### *Presentación del procedimiento experimental*

a. Se produjeron lesiones térmicas convencionales sobre ambos lados de la espalda de diez ratones. Una herida fue tratada con la composición, la otra actuó de control. Se observó una menor proporción de infección, una curación más rápida y menos secuelas en las heridas tratadas.

b. Se produjeron incisiones de 1 cm de longitud en ambos lados de la espalda de diez ratas. Una herida fue rellenada con la composición, la otra actuó de control. Se observó una curación más rápida y sin problemas en la herida tratada.

c. Se realizaron incisiones convencionales en el hígado y el bazo de diez ratas. Otras diez ratas actuaron como controles. La cantidad de sangrado se redujo significativamente en los animales tratados. El tratamiento pegó el defecto, lo cual produjo como resultado una curación más rápida y menos secuelas.

d. Se indujeron heridas e inflamación de la mucosa colónica en ratas por varios métodos, tales como infusión con ácido acético, metotrexato y sulfato de dextrano. Las superficies inflamatorias y las heridas se "pintaron" con la composición. Se observó una menor inflamación y una mejor curación.

e. Infecciones y heridas de la mucosa nasal humana fueron tratadas con la composición. Se observó una rápida limpieza y curación de las heridas.

f. Se trataron llagas humanas producidas por un tiempo prolongado en el lecho con la composición. Se observó una limpieza rápida de las superficies infectadas y necróticas. El tratamiento se repitió a lo largo de un periodo de tiempo más largo.

g. Se trataron úlceras humanas crónicas en la pierna con la composición. Se observó una limpieza rápida de las superficies infectadas y necróticas. El tratamiento se repitió a lo largo de un periodo de tiempo más largo.

REIVINDICACIONES

1. Una red de barrera biodegradable, que comprende:

- a) un polipéptido catiónico,
- b) un polipéptido aniónico, y
- c) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. La red de barrera biodegradable según la reivindicación 1, en la que a) se selecciona del grupo que consiste en los restos aminoácidos R, H, K, sus variantes sintéticos y semisintéticos y sus mezclas.

3. La red de barrera biodegradable según la reivindicación 2, en la que b) se selecciona del grupo que consiste en los restos aminoácidos D, E, sus variantes sintéticos y semisintéticos y sus mezclas.

4. La red de barrera biodegradable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los restos aminoácidos dentro de al menos uno de los polipéptidos comprenden restos aminoácidos del mismo tipo.

5. La red de barrera biodegradable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos uno de los polipéptidos está unido a uno o más restos aminoácidos, otros péptidos u otras sustancias.

6. La red de barrera biodegradable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que al menos uno de los péptidos está modificado mediante amidación, esterificación, acilación, acetilación, PEGilación o alquilación.

7. La red biodegradable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que los péptidos tienen un tamaño de al menos 5.000 Da, tal como de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 50.000 Da.

8. La red de barrera biodegradable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la red biodegradable comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un diluyente o tampón.

9. La red de barrera biodegradable según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la red biodegradable comprende un agente terapéutico, tal como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes limpiadores, antioxidantes, moduladores de la apoptosis, agentes de curación, inhibidores de la fibrogénesis, agentes antitumorales y agentes antisangrado.

10. La red de barrera biodegradable según la reivindicación 9, en la que el agente terapéutico se selecciona del grupo que comprende penicilinas, cefasloporinas, carbacefemos, tetraciclinas, macrólidos, yodo, plata, cobre, clorhexidina, ácido acetilsalicílico, enzimas proteolíticas, vitaminas, glutatión, ácido fólico, curcumina, resveratrol, epigallocatequina, antocianidinas, glucocorticosteroides, insulina, dexametasona, carotenoides, ácido linoleico y ácidos linoleicos conjugados, melatonina, isotiocianatos, shikonina, solamargina, perifosina, desoxinivalenol, carboxiamidotriazol (CAI), inhibidores de la histona desacetilasa, factores del crecimiento, insulina, vitamina E, ácido retinoico, componentes herbales, norepinefrina, gelatina, colágeno, y celulosa oxidada.

11. Un aplicador que comprende:

- a) un polipéptido catiónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- b) un polipéptido aniónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

estando separados dicho polipéptido catiónico y polipéptido aniónico entre sí por un separador.

12. El aplicador según la reivindicación 11, en el que el aplicador se selecciona del grupo que comprende jeringas, aerosoles de uno o múltiples componentes, nebulizadores, escayolas, catéteres, adhesivos, implantes y vendas.

13. El aplicador según las reivindicaciones 11-12, en el que el separador es una disolución acuosa gelificadas o una membrana.

14. El aplicador según las reivindicaciones 11-13, en el que los polipéptidos son como se definió en las reivindicaciones 2-10.

15. Un kit, que comprende:

- a) un polipéptido catiónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable;
- b) un polipéptido aniónico y un vehículo farmacéuticamente aceptable; y

## ES 2 305 897 T3

c) un medio para administrar dicho polipéptido catiónico y aniónico.

16. El kit según la reivindicación 15, en el que los polipéptidos son como se definió en las reivindicaciones 2-10.

5 17. El kit según las reivindicaciones 15-16, en el que el medio se selecciona del grupo que comprende jeringas, escayolas, catéteres, adhesivos, implantes, vendas, aerosoles de uno o múltiples componentes, y nebulizadores.

10 18. El aplicador según las reivindicaciones 11-14, o el kit según las reivindicaciones 15-17, que comprende un agente terapéutico, tal como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes limpiadores, antioxidantes, moduladores de la apoptosis, agentes de curación, inhibidores de la fibrogénesis, agentes antitumorales y agentes antisangrado.

15 19. El aplicador o el kit según la reivindicación 18, en el que el agente terapéutico se selecciona del grupo que comprende penicilinas, cefasporinas, carbacefemos, tetraciclinas, macrólidos, yodo, plata, cobre, clorhexidina, ácido acetilsalicílico, enzimas proteolíticas, vitaminas, glutatión, ácido fólico, curcumina, resveratrol, epigallocatequina, antocianidinas, glucocorticosteroides, insulina, dexametasona, carotenoides, ácido linoleico y ácidos linoleicos conjugados, melatonina, isotiocianatos, shikonina, solamargina, perifosina, desoxinivalenol, carboxiamidotriazol (CAI), inhibidores de la histona desacetilasa, factores del crecimiento, insulina, vitamina E, ácido retinoico, componentes herbales, norepinefrina, gelatina, colágeno, y celulosa oxidada.

20 20. El aplicador o el kit según las reivindicaciones 18-19, en el que el agente terapéutico se separa de los dos polipéptidos, o se mezcla con uno o ambos polipéptidos.

25 21. El uso del aplicador o el kit según las reivindicaciones 11-20 para la fabricación de una red de barrera biodegradable para su uso en una terapia, tal como en medicina, medicina veterinaria y horticultura.

30

35

40

45

50

55

60

65