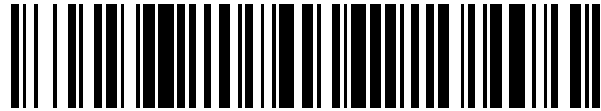


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 558**

51 Int. Cl.:

A61L 15/32 (2006.01)
A61L 15/28 (2006.01)
A61L 15/24 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2005 E 05758716 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 1793872**

54 Título: **Matrices de gelatina elásticas no adhesivas**

30 Prioridad:

30.09.2004 US 614414 P

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

06.09.2016

73 Titular/es:

**COVALON TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
405 BRITANNIA ROAD EAST
MISSISSAUGA ON L4Z 3E6, CA**

72 Inventor/es:

**DITIZIO, VALERIO;
DICOSMO, FRANK y
XIAO, YUEHUA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 581 558 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

Matrices de gelatina elásticas no adhesivas

Área de la invención

- 5 La presente invención hace referencia a matrices elásticas no adhesivas. Más específicamente, la presente invención hace referencia a matrices de gelatina elásticas reticuladas no adhesivas, y al método de realización de las mismas. Las matrices pueden estar previstas en una variedad de configuraciones no limitadas a apósitos para heridas, barreras para heridas, recubrimiento vascular y de tejidos. Las matrices pueden también realizarse para incorporar una variedad de agentes farmacéuticos, químicos y otros agentes. Además, las matrices elásticas no adhesivas de la presente invención pueden utilizarse solas o en conjunto con otros materiales.
- 10 Antecedentes de la invención
- 15 Las láminas de gelatina, láminas de colágeno y esponjas son un grupo de biomateriales que se han utilizado ampliamente en el área médica. Son materiales secos y absorben y retienen grandes cantidades de agua. Este grupo de biomateriales es tanto biocompatible como biodegradable, causando poca o ninguna inflamación. Estos biomateriales son de utilidad como apósitos para heridas, andamios de piel artificial y dispositivos terapéuticos de administración de fármacos, por los que los biomateriales pueden contener agentes terapéuticos y administrar tales agentes terapéuticos a las células y tejidos adecuados, tal como se ejemplifica en la Patente Estadounidense 6,475,516 del solicitante.
- 20 Las láminas de gelatina y colágeno según el arte previo son habitualmente inelásticas y pueden presentar propiedades tóxicas. Por ejemplo, la patente estadounidense 3,491,760 describe un recubrimiento para heridas multicapa adhesivo, flexible pero inelástico, compuesto de colágeno o gelatina que se “espuma” utilizando burbujas de aire, tratado con un plastificante (glicerol), reticulado con una solución de glutaraldehído al 4%, y con la película de gel resultante cubierta con una capa de recubrimiento adherida. Tal como se conoce generalmente, las matrices de colágeno y gelatina reticuladas con glutaraldehído muestran toxicidad residual.
- 25 También son conocidos materiales esponjosos de gelatina, tal como Gelfoam™. Estos materiales son absorbibles, estériles e insolubles al agua, y se utilizan para controlar el sangrado durante la cirugía y pueden además estar previstos en un formato en polvo. El material es no elástico. Otra esponja de gelatina no elástica que se utiliza en la actualidad es Surgifoam™. Gelfilm™ es un material no elástico obtenido a partir de una solución de gelatina reticulada con formaldehído.
- 30 El colágeno hidrolizado, también conocido como gelatina, se ha utilizado como un vehículo para la administración de agentes terapéuticos cuando se enlaza de forma covalente a la superficie de dispositivos médicos tubulares tales como catéteres y stents, tal como se describe en las patentes estadounidenses con Nos. de publicación 6,132,765 y 6,228,393 del solicitante. El material está hidratado y es mínimamente elástico.
- Diversas patentes describen materiales de colágeno inelástico reticulado tales como por ejemplo las patentes estadounidenses con Nos. de publicación 4,703,108, 4,970,298, 5,550,187, 5,744,545, y 6,132,765.
- 35 Sehal y Vijay (Anal. Biochem. 218: 87-91, 1994) describen un método para amidación mediada por carbodiimida soluble en agua utilizando 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC) / N-hidroxi succinimida (NHS). Dicho método es conocido para reticular colágeno, gelatina y otras proteínas. Sin embargo, las matrices resultantes no son elásticas.
- 40 En Choi et al. (Biomaterials 20: 409-41, 1999) se describe la fabricación de piel artificial que contiene gelatina y alginato y está reticulada con EDC. Una esponja soluble se sumergió en una solución de acetona:agua (9:1 en volumen) que contenía 20-100 mg de EDC, y se reticuló durante 24 h. Está indicado que el EDC cuando se disuelve en agua se desactiva y pierde rápidamente su habilidad de reticulación, y por tanto el EDC se disolvió en acetona al 90%. El material de la matriz producida es inherentemente inelástico.
- 45 En la industria farmacéutica, las cápsulas elásticas de gelatina blanda o “Softgels” se elaboran a partir de una solución de gelatina que se plastifica con propilenglicol, sorbitol, glicerina u otras mezclas autorizadas. Sin embargo, la gelatina en las cápsulas de softgel no está reticulada para que las cápsulas continúen siendo solubles cuando se ingieran. Además, las cápsulas de softgel carecen de elasticidad y resistencia ante la acción de procesos degenerativos tales como un aumento de la temperatura y una acción enzimática moderada.
- 50 La patente WO98/16165 describe una película elástica con un contenido de humedad del 11 al 16%. Dichas películas comprenden de un 60 a un 95% en peso de gelatina y colágeno, por lo cual el colágeno está presente en hasta un 30% en peso. Las películas además comprenden de 0,5 a 4% en peso de un agente reticulante y de un 5 a

un 40% en peso de un plastificante, preferiblemente de polietilenglicol. Las películas se forman combinando gelatina, colágeno y el plastificante en una solución y secando la solución resultante. Las películas obtenidas de este modo se reticulán a continuación aplicando el agente reticulante. Las películas reticuladas pueden ser utilizadas para el sellado tisular o para la inhibición de la adhesión tisular.

- 5 Existe la necesidad de producir matrices de gelatina que sean elásticas, y que tengan una resistencia a la tracción considerable, a la vez que no se muestren propensas a endurecerse o a volverse quebradizas.

Resumen de la invención

10 La presente invención proporciona matrices de proteína sustancialmente no adhesivas, y elásticas para una variedad de usos clínicos. Más específicamente, la presente invención proporciona matrices de gelatina elásticas sustancialmente no adhesivas, para su uso en una variedad de aplicaciones no limitadas a barreras para heridas, apósitos para heridas, apósitos quirúrgicos, vendajes y en la administración de fármacos terapéuticos y/o agentes químicos. La presente invención proporciona además un método novedoso para la realización de las matrices de gelatina elásticas no adhesivas de la invención.

15 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, el objeto de la misma es una matriz elástica de gelatina no adhesiva según se define en la reivindicación independiente 1. La matriz es a la vez no adhesiva y elástica, de forma que sea flexible. La matriz está liofilizada de forma que no contenga cantidades importantes de disolvente y comprende una mezcla de colágeno o colágeno no desnaturalizado, polímeros biocompatibles, un agente o agentes reticulantes y un plastificante opcional.

La matriz de la presente invención, por tanto, es una matriz elástica de gelatina no adhesiva liofilizada.

20 La matriz de la presente invención comprende;

- un mezcla de proteína que comprende colágeno y/o gelatina y polímeros biocompatibles que comprenden alginato, polietilenglicol y poli-L-lisina, en donde dichos polímeros están reticulados con uno o más agentes reticulantes y dicha mezcla está liofilizada. En diversos aspectos, la mezcla puede además comprender uno o más plastificantes.

25 En diversos aspectos, el colágeno puede utilizarse solo o puede utilizarse colágeno desnaturalizado, es decir, gelatina utilizada por sí sola o en combinación.

Tal como se define en la reivindicación independiente 19, otro aspecto de la presente invención es un método para realizar la matriz elástica de gelatina no adhesiva, donde el método comprende:

(a) calentar una solución proteica;

(b) añadir uno o más polímeros biocompatibles a (a);

30 (c) añadir al menos un agente reticulante a (b);

(d) enfriar (c) y liofilizar.

35 En algunos aspectos de la invención, la proteína de (a) es gelatina y en otros aspectos es una mezcla de gelatina y colágeno. Un plastificante puede añadirse adicionalmente a (b) y/o (c). Además, se pueden añadir uno o más de un agente farmacéutico, químico u otro agente antes y/o después de la reacción de reticulación de la etapa (c). Por ejemplo, puede añadirse iones de plata, plata metálica o una sal de plata a la matriz para el tratamiento de quemaduras u otros traumas para minimizar y/o inhibir la infección. La matriz puede ser fabricada como un recubrimiento tal como una barrera para heridas, un apósito para heridas, un vendaje vascular y combinaciones de los mismos. La matriz puede además ser fabricada como una esponja. La matriz de la invención puede además ser utilizada para reducir la inflamación crónica, absorber exudados y/o promover un entorno húmedo de la herida. La matriz de la invención puede además tener incorporado en la misma un agente químico u otro agente que se administre a un tejido deseado, para al menos un tratamiento de entre tratamientos de exfoliación y de condiciones relacionadas con la edad en mamíferos.

45 En aspectos de la invención, la matriz elástica de gelatina no adhesiva puede conformarse alrededor de una red o un soporte fibrilar. Aún en otros aspectos de la invención, la matriz de gelatina de la invención puede utilizarse en conjunto con láminas de polímeros, películas, filamentos o membranas y mallas de silicona, poliuretano, polietileno, Dacron™, nailon, seda, celulosa y mezclas de los mismos.

5 En otros aspectos de la presente invención, la matriz elástica de gelatina no adhesiva puede estar prevista como un dispositivo oclusivo que comprende una estructura oclusiva y la matriz de gelatina sustancialmente no adhesiva, en donde la matriz tiene superficies opuestas de tal manera que una superficie de la matriz esté fijada a una superficie de la estructura oclusiva, donde la otra superficie de la matriz está adaptada para cubrir, y estar en contacto con, el tejido. En dichos aspectos, el dispositivo oclusivo puede ser una película plástica, por ejemplo.

Descripción detallada de las realizaciones

10 La presente invención consiste en una novedosa matriz elástica sustancialmente no adhesiva de contenido proteico que es biocompatible. En realizaciones de la invención, la matriz es una matriz elástica de gelatina que mantiene su elasticidad de manera que pueda configurarse en una diversidad de formas, según se requiera en diversas condiciones clínicas. Como tal, la matriz elástica de gelatina de la invención es flexible y tiene una variedad de usos clínicos para el tratamiento de una diversidad de condiciones. Además, la matriz de la invención puede configurarse en una variedad de formatos, y utilizarse en conjunto con otros dispositivos o estructuras. La matriz de la invención también puede tener una variedad de agentes farmacéuticos, químicos y/u otros agentes incorporados en la matriz, según se desee, para una diversidad de aplicaciones clínicas. La matriz de gelatina de la invención es también sustancialmente no adhesiva, lo que significa que la matriz sustancialmente no se adhiere a las heridas, tejidos (tales como, pero sin limitarse a, piel, vasos sanguíneos y hueso) y a órganos. Por último, la matriz de la invención es absorbente, estable *in vivo* e *in vitro*, y puede ser fabricada con la resistencia a la tracción y la elasticidad que se requiera para una aplicación clínica deseada.

20 La matriz elástica de la invención se realiza a partir de una solución que comprende proteína o una mezcla de proteínas, un polímero o polímeros biocompatibles, un agente o agentes reticulantes, un disolvente o disolventes y, de forma opcional, un plastificante. La proteína para su uso en la invención se selecciona de colágeno, colágeno desnaturalizado (es decir, gelatina) y mezclas de los mismos que se mezclan adicionalmente junto con uno o más polímeros biocompatibles. Se pueden añadir de forma opcional plastificantes. La solución es liofilizada para eliminar esencialmente cualquier disolvente y proporcionar la matriz elástica de gelatina no adhesiva de la invención.

25 Los polímeros biocompatibles para su uso en la invención se seleccionan del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), poli-L-lisina, poli-D-lisina, alginato, quitosán, ácido hialurónico, sulfato de condroitina y mezclas de los mismos.

30 En aspectos de la invención los agentes reticulantes para su uso en la invención se seleccionan a partir del grupo que consiste en 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), formaldehído, glutaraldehído, poliaziridinas, diglicidil éteres y mezclas de los mismos. En realizaciones, se utilizan EDC y NHS en combinación como el agente reticulante.

En aspectos de la invención, el plastificante opcional para su uso en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en glicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos.

35 En aspectos de la invención, el disolvente para su uso en la presente invención se selecciona del grupo que consiste en agua, metanol, etanol, isopropanol, dimetilsulfuro (DMS), y mezclas de los mismos. En aspectos de la invención, el disolvente es agua o si se utiliza además con un disolvente orgánico polar, la relación del disolvente es habitualmente de aproximadamente 9:1, agua con respecto al disolvente orgánico polar, en la mezcla final.

40 La solución de colágeno y/o gelatina junto con el polímero o polímeros biocompatibles, el agente o agentes reticulantes, el plastificante o plastificantes opcionales y el disolvente o disolventes, se mezclan y se congelan, y a continuación se someten a criodesecación (es decir, se liofilizan). Las matrices producidas de esta manera son sustancialmente no adhesivas y elásticas.

Los rangos para las cantidades de proteína (colágeno o gelatina), la cantidad de polímero biocompatible, la cantidad de disolvente y la cantidad de plastificante opcional en la solución de la composición y en la composición final liofilizada son tal como sigue a continuación:

	% en peso en la composición inicial	% en peso en la matriz de gelatina elástica no adhesiva, liofilizada
Proteína – colágeno o colágeno desnaturalizado (es decir, gelatina)	0,5 – 30%	50-90%

45

(continuación)

	% en peso en la composición inicial	% en peso en la matriz de gelatina elástica no adhesiva, liofilizada
Polímero biocompatible	<i>Hasta aproximadamente 10%</i>	<i>Hasta aproximadamente un 40% (en aspectos aproximadamente un 10-40%)</i>
Agente reticulante	<i>0,1 – 2%</i>	<i>0,5-5%</i>
Disolvente	<i>50 – 99%</i>	<i>Hasta aproximadamente un 10%</i>
Plastificante (opcional)	<i>0 – 5%</i>	<i>0 – 10%</i>
<i>*Observar que los rangos proporcionados en la tabla anterior para cada proteína, polímero biocompatible, agente reticulante, disolvente y plastificante incluye cualquier sub-rango de los rangos detallados.</i>		

5 La matriz elástica de gelatina no adhesiva de la invención se realiza combinando soluciones de proteína, polímeros biocompatibles y agentes reticulantes en un disolvente adecuado. Las soluciones de los diversos constituyentes de la matriz según se describe en los ejemplos son acuosas, sin embargo, en aspectos de la invención el polímero o polímeros y el agente o agentes reticulantes pueden ser disueltos en primer lugar en un disolvente orgánico polar tal como, pero sin limitarse a, metanol, etanol, isopropanol y dimetil sulfóxido (DMSO), y en tal caso, la relación del disolvente de la mezcla final es habitualmente de 9:1 a favor del agua.

10 En aspectos de la invención, las soluciones de la proteína y del polímero biocompatible se mezclan y se incuban durante un periodo de tiempo a una temperatura tal que la proteína no se solidifique, es decir que no forme un gel. Las temperaturas de aproximadamente 55°C son adecuadas para dicha incubación. Si se utilizara polietilenglicol (PEG) como un polímero biocompatible, el PEG se añade habitualmente a la mezcla y a las soluciones de proteínas que se están incubando. Una solución del agente reticulante se añade a continuación y la mezcla resultante se mezcla durante un periodo de tiempo hasta que se forma un gel consistente. El gel se vierte a continuación en un molde adecuado y se mantiene a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos, y posteriormente se enfría a aproximadamente 4°C durante un periodo de tiempo que se encuentra en el rango de aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 12 horas. La mezcla se lava para eliminar los componentes solubles tales como PEG residual y agente reticulante y se liofiliza durante un periodo de aproximadamente 24 horas o más hasta que el contenido de humedad final de la matriz elástica de gelatina no adhesiva es menos de aproximadamente un 10%.
20 Un experto en el arte entiende que el contenido de humedad final de la matriz resultante (la matriz liofilizada) puede ajustarse a cualquier valor hasta aproximadamente un 10% en peso de la matriz.

25 La matriz elástica de gelatina no adhesiva de la invención puede estar desarrollada para liberar fármacos en tejidos y órganos, incluyendo, pero sin limitarse a, piel, laceraciones tisulares, heridas quirúrgicas de la piel, de tejidos y de órganos, vasos sanguíneos y hueso. En esta realización, la matriz puede fabricarse para tener agentes farmacéuticos, químicos y/u otros agentes incorporados en la misma. En un aspecto, el agente farmacéutico, químico y/u otro agente pueden incorporarse en una cantidad de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 10% en la etapa de formulación inicial, o de aproximadamente un 1,0% hasta aproximadamente un 25% después del secado. En otro aspecto, la matriz liofilizada puede sumergirse en una solución del agente farmacéutico, químico y/u otro agente deseado, y después la matriz puede ser re-liofilizada. Los agentes deseables para su uso en conjunto con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, iones de plata, plata metálica o una sal de plata, clorhexidina, triclosán, povidona yodada, otros metales antimicrobianos tales como cobre, platino, oro, compuestos a base de bismuto, anestésicos tales como lidocaína, antibióticos, inmunosupresores, agentes anti-proliferativos, agentes antiinflamatorios, antivirales y combinaciones de los mismos. La selección del agente para su uso con la matriz de la invención dependerá de su uso final. Por ejemplo, si se utiliza para el tratamiento de condiciones
35 relacionadas con la edad, puede proporcionarse un agente anti-envejecimiento a la matriz antes y/o después de la liofilización. Un agente anti-envejecimiento de este tipo puede seleccionarse para tratar por ejemplo líneas de expresión, arrugas y decoloraciones de la piel. En este aspecto, un agente anti-envejecimiento adecuado puede seleccionarse de exfoliantes, Vitamina A, Vitamina C, etc. Si se utiliza para tratar manchas oscuras o decoloración, un agente tal como la hidroquinona puede resultar adecuado para su incorporación en la matriz.

40 La matriz elástica de gelatina no adhesiva de la invención puede ser fabricada en una variedad de formas tales como una película, lámina, tubo o esponja. La matriz de la invención puede utilizarse, por ejemplo, pero sin limitarse a ello, como barrera para heridas, apósito para heridas, vendaje vascular y combinaciones de los mismos. La matriz de la invención puede además ser utilizada para reducir la inflamación crónica, absorber exudados y/o promover un entorno húmedo de la herida. La matriz de la invención puede además fabricarse como un dispositivo en conjunto con otros materiales tales como, pero sin limitarse a los mismos, láminas poliméricas, películas, filamentos, membranas o mallas de silicona, poliuretano, polietileno, Dacron™, nailon, seda, celulosa y combinaciones de los mismos. Esto puede llevarse a cabo modificando químicamente la superficie de estos otros materiales mediante

métodos de irradiación gamma, tratamiento con plasma o descarga por efecto corona y/o mediante luz UV, de manera que los grupos reactivos se introduzcan en la superficie del material. Los grupos reactivos pueden entonces enlazarse de forma covalente con grupos reactivos complementarios presentes en la matriz elástica no adhesiva de la presente invención mediante métodos según lo descrito en la solicitud Internacional del solicitante con N° PCT CA02/00246.

La revelación anterior describe en general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa mediante la referencia a los siguientes Ejemplos específicos. Estos Ejemplos se describen únicamente con propósitos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se contemplan cambios en la forma y la sustitución de equivalentes según puedan sugerir las circunstancias o según resulte conveniente de acuerdo a las mismas. Aunque se han empleado términos específicos en la presente patente, tales términos se entienden en sentido descriptivo y no con propósitos de limitación.

Ejemplos

Sin la intención de limitarse en su alcance, los siguientes ejemplos se utilizan para ilustrar diversas realizaciones de la invención.

15 Materiales

La gelatina fue adquirida de Vyse Gelatin Company (5010 North Rose St., Schiller Park, IL60176). La gelatina (300 Bloom) fue obtenida mediante la hidrólisis parcial de colágeno de origen porcino: piel, tejidos conjuntivos blancos y huesos de los animales, y procesado para producir una gelatina de calidad farmacéutica. Se adquirió alginato de sodio (sal de sodio) de *Macrocystis pyrifera* (elevada viscosidad, solución al 2% a 25°C aprox. 14.000 cps), de Sigma Co. (St. Louis, MO). Se adquirió Polietilenglicol (Media Mn = 3.400), hidrocioruro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) y lactato de plata de Aldrich Co. (Milwaukee, WI53201).

Ejemplo 1 – Apósito de (Gelatina + Alginato + PEG 3400)

Soluciones madre:

Gelatina: 20% (p/v)

Alginato: 3,12% (p/v)

PEG 3400: 63% (p/v)

EDC/NHS: 40% (p/v) y 6 % (p/v), respectivamente, (relación molar: 4/1)

Composición de la matriz saturada con agua:

Gelatina: 10% (p/p)

Alginato: 1,1 % (p/p)

PEG: 7,2% (p/p)

Síntesis de la matriz (por ejemplo, para formar aproximadamente 200 ml de gel):

Se mezclaron soluciones de Gelatina (100 mL) y alginato (71,2 mL) y se incubaron a 55°C durante 30 min. A continuación se añadieron y mezclaron 30 mL de una solución de PEG 3400. Después, se añadió a la mezcla 5 mL de una solución fresca de EDC/NHS durante el mezclado, durante 30 segundos. Los aproximadamente 200 ml de gel se vertieron en un molde y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min, y posteriormente se enfrió a 4°C durante 30 min. La matriz se lavó en agua durante la noche para eliminar los componentes solubles tales como el PEG y el agente reticulante. Finalmente, la matriz fue liofilizada. Habitualmente, 0,32 ml de la mezcla de gel produce 1 cm² del área de superficie de la matriz.

Ejemplo 2 – Apósito de (Gelatina + Alginato + PEG 3400 + Glicerol)

Solución madre:

Gelatina: 20% (p/v)

Alginato: 3,12% (p/v)

PEG 3400: 63% (p/v)

5 EDC/NHS: 40% (p/v) y 6 % (p/v), respectivamente, (relación molar: 4/1)

Glicerol: 10% (p/v)

Composición de la matriz saturada con agua:

Gelatina: 10% (p/p)

Alginato: 1,1 % (p/p)

10 PEG: 7,2% (p/p)

Poli-Lisina: 0,1% (p/p)

Síntesis de la matriz (por ejemplo, 200 ml de gel)

15 Se mezclaron soluciones de Gelatina (100 mL) y alginato (71,2 mL) y se incubaron a 55°C durante 30 min. A continuación se añadieron y mezclaron 30 mL de una solución de PEG 3400. Después, se añadió a la mezcla 5 mL de una solución fresca de EDC/NHS durante el mezclado, durante 30 segundos. Los aproximadamente 200 ml de gel se vertieron en un molde y se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min, y posteriormente se enfrió a 4°C durante 30 min. La matriz se lavó en agua durante la noche para eliminar los componentes solubles tales como el PEG y el agente reticulante. Habitualmente, 0,32 ml de la mezcla de gel produce 1 cm² del área de superficie de la matriz. La matriz se sumergió en 2,85 l de glicerol al 10% (4,4 ml de glicerol por 1 cm² de gel). Finalmente, la matriz fue liofilizada.

20

Ejemplo 3 – Apósito de (Gelatina + Alginato + PEG 3400 + Poli-L-lisina)

Solución madre:

Gelatina: 20% (p/v)

Alginato: 3,12% (p/v)

25 PEG 3400: 63% (p/v)

Poli-L-lisina: 2% (p/v)

EDC/NHS: 40% (p/v) y 6 % (p/v), respectivamente, (relación molar: 4/1)

Composición de la matriz saturada con agua:

30 Gelatina: 10% (p/p)

Alginato: 1,1 % (p/p)

PEG: 7,2% (p/p)

Poli-Lisina: 0,1% (p/p)

Síntesis de la matriz

Se mezclaron soluciones de gelatina y alginato, como en los ejemplos anteriores. A continuación, se añadió 10 ml de poli-L-lisina al 2% con mezclado. Se añadieron 30 ml de PEG 3400 a la mezcla y se mezcló. Los procedimientos restantes para producir la matriz final fueron idénticos a los ejemplos anteriores.

5 **Ejemplo 4 – Apósito de (Gelatina + Alginato + PEG 3400 + Poli-L-lisina + Glicerol)**

Solución madre:

Gelatina: 20% (p/v)

Alginato: 3,12% (p/v)

PEG 3400: 63% (p/v)

10 Poli-L-lisina: 2% (p/v)

EDC/NHS: 40% (p/v) y 6 % (p/v), respectivamente, (relación molar: 4/1)

Glicerol: 10% (p/v)

Composición de la matriz saturada con agua:

Gelatina: 10% (p/p)

15 Alginato: 1,1 % (p/p)

PEG: 7,2% (p/p)

Poli-L-lisina: 0,1% (p/p)

Síntesis de la matriz

20 Se mezclaron soluciones de gelatina y alginato como en los ejemplos anteriores. A continuación, se añadió 10 ml de poli-L-lisina al 2% con mezclado. Se añadieron 30 ml de PEG 3400 a la mezcla y se mezcló. Los procedimientos restantes para producir la matriz hidratada y lavada fueron idénticos a los ejemplos anteriores. Finalmente, la matriz se sumergió en 2,85 l de glicerol al 10% (4,4 ml de glicerol por 1 cm² de gel) y a continuación se liofilizó.

Ejemplo 5 – Apósito de (Gelatina + Alginato)

Solución madre:

25 Gelatina: 1% (p/v)

Alginato: 1% (p/v)

EDC/NHS: 40% (p/v) y 6 % (p/v), respectivamente, (relación molar: 4/1)

Composición de la matriz saturada con agua:

Gelatina: 0,9% (p/p)

30 Alginato: 0,1 % (p/p)

Síntesis de la matriz (por ejemplo, 200 ml de gel)

35 Se mezclaron soluciones de gelatina (180 mL) y alginato (20 mL) y se incubaron a 55°C durante 30 min. Después se añadió 1,4 ml de solución fresca de EDC/NHS a la mezcla con mezclado durante 1 minuto. La mezcla se vertió en un molde (10 ml por área de 20 cm²), y a continuación se congeló a -20°C durante la noche. Finalmente, la matriz fue liofilizada.

Las diversas matrices, como en los Ejemplos 1-5, pueden ser vertidas (previamente a la etapa inicial de enfriamiento/congelación) directamente sobre otros materiales (sin modificación tal como se detalla anteriormente), tales como, pero sin limitarse a los mismos, láminas poliméricas, películas, filamentos, membranas o mallas de silicona, poliuretano, polietileno, Dacron™, nailon, seda, celulosa y combinaciones de los mismos, que pueden o no contener agentes añadidos, tales como agentes terapéuticos, materiales que contienen plata u otros medicamentos para insertar la malla, red o fibras en el interior de las matrices de los ejemplos 1-5.

Ejemplo 6 – Degradación *In vitro* de la degradación de la esponja de gelatina por Colagenasa

La degradación de materiales a base de gelatina reticulante se estudió utilizando colagenasa bacteriana. La colagenasa utilizada en este estudio procedía de *Clostridium* (EC 3.4.24.3) y tenía una actividad de 362 U/mg sólido. Se incubaron muestras (50 mg) a 37 °C en 10 mL de solución de colagenasa con una concentración de 15,35 U/mg en tampón de 0,1 M Tris-HCl (pH = 7,4) que contenía 0,005 M de CaCl₂ y 0,05 mg/mL de azida de sodio. Después de cada intervalo de incubación, la muestra se lavó cuidadosamente tres veces con agua desionizada y se liofilizó durante la noche. El grado de degradación fue expresado como el porcentaje en peso que queda tras la degradación.

La biodegradación de los apósitos a base de gelatina de acuerdo con la presente invención, fue rápida en presencia de colagenasa, tal como sería de esperar. Para casi todas las matrices, aproximadamente un 80% de la esponja de gelatina se degradó en las primeras 24 horas. La matriz de gelatina que contenía gelatina y alginato se mostró menos afectada por la acción de la colagenasa (Tabla 1).

Tabla 1. Biodegradación de apósitos de gelatina en tiempos específicos (expresada como % del peso restante) en presencia de colagenasa

Matriz de muestra	0 h	24 h	48 h	72 h
1% Gelatina + Alginato	100	96,1	75,9	65,4
10% Gelatina + PEG + Alginato	100	21,0	22,2	17,4
10% Gelatina + PEG + Alginato + Glicerol	100	23,3	12,8	21,8
10% Gelatina + PEG + Alginato + Glicerol + Poli-L-Lisina	100	18,4	14,3	14,4
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina	100	16,5	14,8	12,6

Ejemplo 7 – Determinación de la capacidad de absorción de agua

Para determinar la capacidad de absorción de agua del apósito, aproximadamente 40 mg del apósito se colocó en un vial de cristal de 20 ml al que se añadió 15 ml de agua o PBS (0,01M, pH =7,4). La muestra se pesó después de la hidratación durante 5 min a temperatura ambiente y a continuación se incubó a 37°C durante 4 h y 24 h. La muestra se pesó en ambos intervalos de incubación. La capacidad de absorción de agua se expresa como la relación de agua absorbida con respecto al apósito seco (Tabla 2). Las matrices, particularmente sin plastificante, son todas muy absorbentes y pueden empaparse hasta aproximadamente 30-35 veces su peso en agua en aproximadamente 24 horas.

Tabla 2. Absorción de agua en tiempos específicos, gramos de agua/gramos de matriz (g/g)

Matriz de muestra	5 min (g/g)	4 h (g/g)	24 h
1% Gelatina + Alginato	31,6	-	28,7
10% Gelatina + PEG + Alginato	16,2	27,3	32,1
10% Gelatina + PEG + Alginato + Glicerol	2,5	10,8	11,7
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina	9,0	29,9	34,6
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina + Glicerol	1,8	9,6	10,5

*los valores son en una relación valor:1.

Ejemplo 8 – Determinación de la solubilidad en agua

Para determinar la solubilidad en agua del apósito, se colocó una muestra con un peso conocido en un vial de cristal al que se añadió 15 ml de agua. Este se incubó a 40°C durante 24 h y a continuación se eliminó el agua y la muestra se lavó dos veces con agua. La muestra se secó a continuación en un horno a 100°C a un peso constante y a continuación se volvió a pesar. La solubilidad en agua se expresa habitualmente como el porcentaje de peso perdido

después del tratamiento con agua (Tabla 3). Las matrices mostraron una buena solubilidad en agua proporcionando una indicación de su longevidad clínica. Una solubilidad menor dio como resultado una matriz más estable a la temperatura corporal. Por tanto, tales matrices pueden ser eliminadas de una herida, por ejemplo, como una única lámina después de 24 horas o más con la mínima molestia para el paciente. Mientras que todas las matrices mostraron una buena estabilidad, las que no tenían plastificantes resultaron incluso más estables.

Tabla 3. Estabilidad de materiales a base de gelatina al 10% después de su incubación en agua a 40°C durante 24h.

Matriz de muestra	P1 (g)	P2 (g)	Peso restante (%)	Solubilidad en agua (%)
1% Gelatina + Alginato	0,0315	0,0260	83,4	16,6
10% Gelatina + PEG + Alginato	0,0335	0,0261	77,9	22,1
10% Gelatina + PEG + Alginato	0,0308	0,0235	76,3	23,7
10% Gelatina + PEG + Alginato + Glicerol	0,0448	0,0107	23,9	76,1
10% Gelatina + PEG + Alginato + Glicerol	0,0443	0,0108	24,4	75,6
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina	0,0364	0,0305	83,8	16,2
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina	0,0361	0,0294	81,4	18,6
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina + Glicerol	0,0504	0,0115	22,82	77,2
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina + Glicerol	0,0507	0,0124	24,5	75,5

Observar: P1: peso de la muestra original

P2: peso de la muestra seca después del tratamiento

$$\text{Peso restante} = (P2/P1) \times 100\%$$

$$\text{Solubilidad en agua} = (1 - P2/P1) \times 100\%$$

Ejemplo 9 – Determinación de las propiedades mecánicas

Se determinaron las propiedades mecánicas para la resistencia a la tracción y elongación de ruptura de las matrices de gelatina hidratadas (4,5 cm x 1 cm), que se habían sumergido en una solución tampón de 0,01M, pH = 7,4 PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se utilizó una célula de carga de 0,5 kg con una tasa de extensión de 5 mm/min (Tabla 4). Este ejemplo demuestra que la resistencia a la tracción y la elasticidad de las matrices pueden ajustarse a través de la variación de la cantidad y combinación de componentes de la matriz. Este hecho es valioso para proporcionar matrices para una variedad de aplicaciones clínicas, tales como piel artificial o apósito para heridas.

Tabla 4. Propiedades mecánicas de los apósitos a base de gelatina

Nº de muestra	Resistencia a la tracción (g/cm ²)	Elongación de ruptura (%)
1% Gelatina + Alginato	25,5	53,0
10% Gelatina + PEG	30,5	126,8
10% Gelatina + PEG + Alginato	73,8	174,9
10% Gelatina + PEG + Alginato + Glicerol	83,8	155,4
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina	111,4	176,3
10% Gelatina + PEG + Alginato + Poli-L-Lisina + Glicerol	148,8	193,3

Ejemplo 10 – Adición de Sirolimus a apósitos a base de gelatina

Los ejemplos 1-5 están dirigidos a la fabricación de un rango de materiales que pueden ser utilizados como soportes para diversos medicamentos, tales como el fármaco antiproliferativo y antiinflamatorio Sirolimus (Rapamicina) para su administración en la superficie de tejidos y órganos. Mientras que el fármaco Sirolimus se utiliza en este ejemplo, se observa que otros fármacos pueden utilizarse tanto solos como en combinación para ser administrados en la superficie de tejidos y órganos.

Solución madre

Gelatina: 1% con respecto a agua

Alginato: 1% con respecto a 0,05N de NaOH

EDC/NHS: 400mg/60 mg por 1 ml de 10 mM de solución salina de Mes (pH=4,5)

5 Glicerol: 1% (en agua).

La formulación en la matriz:

Gelatina: 0,9% (p/v)

Alginato: 0,1% (p/v)

Agua

10 Procedimiento

Preparación de soluciones madre

Solución 1: se añadieron 2g de gelatina a 180ml de agua; después de que la gelatina se hidratara completamente en agua, la mezcla se incubó a 50 °C para disolver la gelatina.

Solución 2: se añadió 0,2 g de alginato en 20ml de 0,05 N NaOH, y se incubó a 50°C para disolver el alginato.

15 Solución 3: se añadió 400mg de EDC + 60 mg de NHS en 1ml de 10 mM de una solución salina de Mes (pH = 4,5).

Solución 4: se añadió 2g de glicerol en 200 ml de agua.

Síntesis de la matriz (por ejemplo, 200 ml de gel)

20 1. La solución 1 y la solución 2 se mezclaron y se incubaron a 55°C durante 30 min. Después, se añadió a la mezcla 1,379ml de una solución fresca de EDC/NHS con mezclado durante 1 minuto. La mezcla se vertió en un molde (9 ml por 20 cm² a, a continuación se congeló a -20 grados °C durante la noche.

2. El gel reticulado se lavó con agua Milli-Q 4 veces con 500ml por matriz (se refresca el agua cada 1 h); la matriz se somete a recongelación a temperatura ambiente, se sumerge en 9 ml de glicerol al 1% por 20 cm² de gel. A continuación, el gel se congela nuevamente a -20°C y se liofiliza. La matriz puede prepararse como una película fina.

Carga de sirolimus de las matrices:

25 La anterior matriz (o cualquiera de las matrices de los ejemplos 1-5), se cortó en un cuadrado de 1 x 4 cm. Después de esto, se añadió 80 ul de solución del fármaco (1mg/80ul de etanol) en la superficie del material, o el material se sumergió en una solución del fármaco. Después de la carga del fármaco en la película, la película se dejó secar y la película con el fármaco cargado se expuso a radiación gamma durante 8 h (25 KGy).

Estudio de liberación del fármaco in vitro

30 Procedimiento:

1. Preparación de muestras

1) Una matriz (1 x 4 cm) se cortó en 3 piezas iguales.

2) Se disuelve 1 mg de fármaco en 90 ul de etanol.

3) Se añade 30ul de fármaco en cada pieza de la matriz de la etapa 1.

35 4) Se evapora el Etanol.

ES 2 581 558 T3

2. Estudio de liberación del fármaco

1) Colocar las muestras en tubos de ensayo Falcon de 15 ml.

2) Añadir 5 ml de PBS (10mM, pH=7) a cada tubo.

3) Incubar los tubos a 37°C durante 10 días.

5 4) Tomar muestras de 2,5 ml en intervalos de 3 h, 1 día, 3 días, 5 días, 7día, 9 días, y se reemplazó 2,5 ml de PBS fresco para las muestras tomadas,

5) Realizar análisis mediante HPLC de las muestras.

Columna: Hypersil ODS, 100 x 2,1 mm

Tasa de flujo: 0,2 ml/min

10 Detección: UV, 278nm

Fase móvil: 600ml de acetonitrilo y 400 ml de agua

Temperatura: 50°C

Volumen de inyección: 10µl

Estándares de Sirolimus: 0ug/ml, 1ug/ml, 2,5ug/ml, 5ug/ml 10ug/ml

15 Análisis: Cada muestra fue inyectada dos veces para su análisis.

Cada punto de datos es la media de 6 réplicas de ensayos.

REIVINDICACIONES

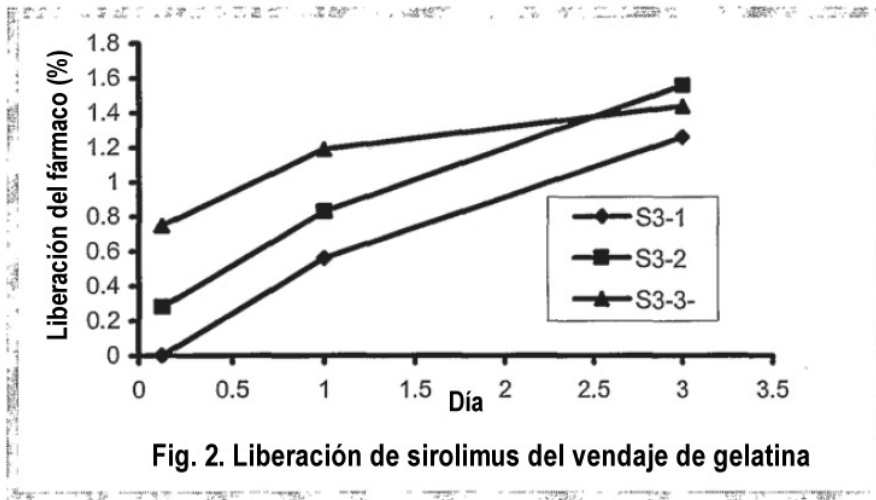
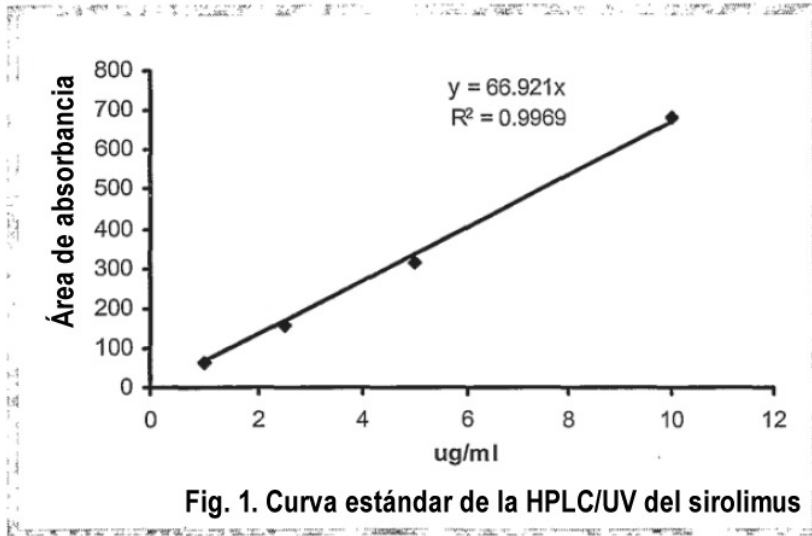
1. Matriz elástica de proteína que comprende;
 - (a) 50-90% en peso de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en colágeno, colágeno desnaturalizado, y mezclas de los mismos;
 - 5 (b) hasta un 40% en peso de uno o más polímeros biocompatibles seleccionados del grupo que consiste en polietilenglicol, poli-L-lisina, alginato, chitosán, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, y mezclas de los mismos; y
 - (c) 0,5-5% en peso de uno o más agentes reticulantes,

en donde dicha matriz se liofiliza a partir de los componentes (a) a (c) para obtener una matriz que sea no adhesiva para heridas, tejidos, y órganos; y

10 en donde dicha matriz contiene menos del 10% de contenido húmedo.
2. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicha matriz adicionalmente comprende uno o más plastificantes.
3. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicho agente reticulante se selecciona del grupo que consiste en 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), formaldehído, glutaraldehído, poliaziridinas, diglicidil éteres y mezclas de los mismos.
- 15 4. Matriz según la reivindicación 3, en donde dicho agente reticulante es una mezcla de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS).
5. Matriz según la reivindicación 3, en donde dicho agente reticulante es diglicil éter.
6. Matriz según la reivindicación 2, en donde dicho plastificante se proporciona en una cantidad de hasta el 10% en peso de dicha matriz.
- 20 7. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicha matriz comprende adicionalmente uno o más agentes farmacéuticos o químicos.
8. Matriz según la reivindicación 7, en donde dichos uno o más agentes farmacéuticos o químicos se seleccionan del grupo que consiste en un antibiótico, antiviral, clorhexidina, triclosán, povidona yodada, metales antimicrobianos, compuestos a base de bismuto, inmunosupresores, agentes antiproliferativos, agentes antiinflamatorios, anestésicos, agentes anti-envejecimiento y mezclas de los mismos.
- 25 9. Matriz según la reivindicación 8, en donde dicho metal antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en iones de plata, plata metálica, sal de plata, cobre, platino, oro y mezclas de los mismos.
10. Matriz según la reivindicación 8, en donde dicho anestésico es lidocaína.
- 30 11. Matriz según la reivindicación 7, en donde dichos uno o más agentes farmacéuticos o químicos se proporciona en una cantidad del 1% al 25% en peso de dicha matriz.
12. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicha matriz se proporciona como una película, lámina, tubo o esponja.
13. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicha matriz se proporciona junto con un material seleccionado del grupo que consiste en láminas poliméricas, películas poliméricas, membranas de silicona, poliuretano, polietileno, tereftalato de polietileno, nailon, seda, celulosa y combinaciones de los mismos.
- 35 14. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicha matriz se proporciona como un apósito para heridas, barrera para heridas, recubrimiento de tejidos y/o recubrimiento vascular.
15. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicha matriz es para reducir la inflamación crónica.
- 40 16. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicha matriz es para absorber exudados.

17. Matriz según la reivindicación 1, en donde dicha matriz es para promover un entorno húmedo.
18. Matriz según la reivindicación 8, en donde dicho agente farmacéutico es sirolimus.
19. Método para la realización de una matriz elástica de gelatina no adhesiva, donde el método comprende:
- 5 (a) mezclar colágeno, colágeno desnaturalizado, o una combinación de los mismos en una solución y calentar dicha solución;
- (b) añadir uno o más polímeros biocompatibles a (a);
- (c) añadir al menos un agente reticulante a (b);
- (d) enfriar (c); y
- (e) liofilizar el resultado de (d) para formar la matriz de proteína elástica no adhesiva.
- 10 20. Método según la reivindicación 19, en donde uno o más polímeros biocompatibles se seleccionan del grupo que consiste en polietilenglicol, poli-L-lisina, alginato, chitosán, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, y una combinación de los mismos.
- 15 21. Método según la reivindicación 19 o 20, en donde al menos un agente reticulante se selecciona del grupo que consiste en 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), formaldehído, glutaraldehído, una poliaziridina, un diglicidil éter, y una combinación de los mismos.
22. Método según la reivindicación 21, en donde dicho al menos un agente reticulante es diglicidil éter.
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en donde la composición pre-liofilizada (d) comprende un 0,5-30% en peso de colágeno o colágeno desnaturalizado; hasta un 10% en peso de uno o más polímeros biocompatibles; 0,1-2% en peso de dichos uno o más agentes reticulantes; y de un 50% a un 99% en peso de disolvente.
- 20 24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en donde la matriz de proteína elástica no adhesiva comprende:
- un 50-90% en peso de colágeno, colágeno desnaturalizado, o una combinación de los mismos;
- 25 - hasta un 40% en peso de polietilenglicol, poli-L-lisina, alginato, chitosán, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, o una combinación de los mismos; y
- un 0,5-5% en peso de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida (EDC), N-hidroxisuccinimida (NHS), formaldehído, glutaraldehído, una poliaziridina, un diglicidil éter, o una combinación de los mismos.
25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en donde uno o más plastificantes se añade a (b) y/o a (c).
- 30 26. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, en donde uno o más agentes farmacéuticos o químicos puede añadirse antes y/o después de la etapa (c).
- 35 27. Método según la reivindicación 26, en donde dichos uno o más agentes farmacéuticos o químicos se selecciona del grupo que consiste en un antibiótico, antiviral, clorhexidina, triclosán, povidona yodada, metales antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, agentes antiproliferativos, compuestos a base de bismuto, inmunosupresores, anestésicos, agentes anti-envejecimiento y mezclas de los mismos.
28. Método según la reivindicación 27, en donde dicho metal antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en iones de plata, plata metálica, sal de plata, cobre, platino, oro y mezclas de los mismos.
29. Método según la reivindicación 27, en donde dicho anestésico es lidocaína.
30. Método según la reivindicación 27, en donde dicho agente farmacéutico es sirolimus.

31. Método según la reivindicación 26, en donde dichos uno o más agentes farmacéuticos o químicos se proporcionan en una cantidad del 0,1% al 10% en peso de dicha matriz.



Nota: S3-1, S3-2 y S3-3 son experimentos por triplicado de las muestras. Y cada punto es la media del análisis mediante HPLC duplicado.

