(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 348 787**

(51) Int. Cl.:
***D06M 11/32*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05759774 .2**
(96) Fecha de presentación : **09.06.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1766125**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

(54) Título: **Procedimiento nuevo y no agresivo para la conversión de cistina en lantionina en materiales que contienen queratina.**

(30) Prioridad: **10.06.2004 US 578786 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**14.12.2010**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**14.12.2010**

(73) Titular/es: **KERAPLAST TECHNOLOGIES Ltd.**
**19206 Huebner Road, Suite 102**
**San Antonio, Texas 78258, US**

(72) Inventor/es: **Branham, Keith, Edward;**
**English, James, Perry y**
**Cowsar, Donald, R.**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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).



Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

## Descripción

### Antecedentes de la invención

En proteínas tales como queratina, el enlace de cistina que forma un enlace intraproteínico o interproteínico se caracteriza como R-C-S-S-C-R, en la que C-R representa el aminoácido cistina como parte de una proteína-polipéptido y las dos cadenas están unidas por el enlace S-S. Este enlace S-S se puede romper por reducción del azufre a S-H o se puede romper por oxidación para proporcionar un resto de ácido sulfónico, $SO_x$. Otras posibilidades incluyen una sustitución en la cual otro resto que contiene azufre, tal como mercaptoetanol o tioglicolato, se une a uno o a ambos lados del enlace cistina. De éstas, todas excepto la reacción de oxidación son reversibles y se puede volver a formar el disulfuro de cistina. La oxidación del azufre bloquea la formación de nuevo del enlace S-S de la cistina. La lantionización se conoce para uso en tratamientos cosméticos (véanse las patentes estadounidenses 3.908.672 y 3.971.391). Un disulfuro lantionizado pierde uno de los átomos de azufre y se representaría como R-C-S-C-R. Se trata también de una reacción irreversible que permite controlar la cantidad de oxidación posterior del material.

En el caso de proteínas de queratina, a menudo es deseable manipular el carácter de los azufres de la cisteína mediante oxidación parcial del material y, a continuación, neutralización del producto para producir un material bifurcado tipo hidrogel. Controlando el número de azufres oxidados, también se puede controlar las características del material tipo hidrogel.

La lantionización, como se desvela para uso en tratamientos cosméticos, se realizaba en medio acuoso usando una base hidróxido, específicamente LiOH, frecuentemente a temperaturas elevadas y se aplicaba a cabello humano vivo. Horn y sus colaboradores también describen la ebullición de lana en una disolución acuosa de $Na_2CO_3$ [véase Horn y col., Isolation of a New Sulfur-Containing Amino Acid (Lanthionine) from Sodium Carbonate-Treated Wool, J BIOL CHEM. vol. 138, 1941, pág. 141-149, y Horn y col., Isolation of Mesolanthionine from Various Alkali-Treated Proteins, J BIOL CHEM. vol. 144,1942, pág. 87-91].

La presente invención ha descubierto que la aplicación de esta tecnología de cabello vivo a materias primas que contienen queratina y, especialmente, a materiales textiles de lana, producía materiales que eran demasiado frágiles para determinadas aplicaciones o, en determinados casos, completamente degradados. La presente memoria descriptiva amplía el uso de los procesos de lantionización como un medio de preparación de materiales nuevos y mejorados para aplicaciones biomédicas y otras.

### Resumen

La presente memoria descriptiva proporciona nuevos materiales que contienen queratina

y procedimientos de producción de los nuevos materiales que proporcionan numerosas ventajas respecto a otros procedimientos previamente conocidos. Los procedimientos incluyen la lantionización al menos parcial de enlaces disulfuro de cistina de una forma controlada. El proceso se puede usar para lantionizar materias primas de origen animal (por ejemplo, fibras de lana) o cualquier material textil o mezcla de materiales textiles que contengan queratina. El proceso, cuando se usa para tratar un material textil de lana, produce un material textil con mayor elasticidad que el material textil no tratado.

El proceso de lantionización ofrece al menos las siguientes ventajas respecto a la oxidación controlada, incluyendo la realización de la lantionización en condiciones inusualmente suaves, es decir, a temperatura ambiente sin agitación externa, y produciéndose la reacción en condiciones no acuosas o semi-acuosas. El proceso es inusualmente limpio. Los únicos productos de la reacción son lantionina (enlaces tioéter) y $H_2S$ gaseoso. El $H_2S$ residual se elimina mediante lavado con agua y secado al vacío. El proceso proporciona la ventaja adicional de que se puede llevar a cabo de forma continua.

Como se encuentra en la bibliografía, los materiales con queratina, tales como el pelo y la lana, se pueden separar en fracciones hidrosolubles y no hidrosolubles. La porción no hidrosoluble se conoce como β-queratina y se ha denominado "IKP" y la IKF que se ha sometido a un intercambio iónico es denominada "hick" (hydratable keratin protein, proteína queratínica hidratable) por los solicitantes. La fracción hidrosoluble contiene una porción con bajo contenido en azufre y una porción con alto contenido en azufre. La porción con bajo contenido en azufre se conoce como α-queratina o α-queratosa cuando se oxida, y la porción con alto contenido en azufre se conoce como γ-queratina.

A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que el contexto indique lo contrario, la palabra “comprende” o variaciones tales como “comprendiendo” significa “incluye, pero sin limitarse a”, de forma que otros elementos que no se mencionan explícitamente también pueden estar incluidos. Además, a menos que el contexto indique lo contrario, el uso del término “un/una” puede significar un objeto o elemento en singular o puede significar una pluralidad, uno o más de tales objetos o elementos.

**Descripción detallada**

La presente invención implica un procedimiento para el tratamiento de materias primas que contienen queratina procedentes de mamíferos, tales como materias primas que incluyen, pero no se limitan a pelo, lana, piel con pelo, asta, pezuñas o patas, picos y plumas de ave, y cualquier material textil compuesto total o parcialmente por queratina, tanto tejido como no tejido, incluyendo mezclas con otras fibras naturales y sintéticas tales como algodón, nailon, rayón,

seda, poliéster, etc. El tratamiento produce la conversión al menos parcial de los grupos disulfuro (R-S-S-R) de los restos de cistina de la queratina en restos de lantionina (grupos tioéter, R-S-R) en un proceso conocido como lantionización. El tratamiento se realiza en medio no acuoso con una base tal como una base hidróxido que incluye, pero no se limita a, NaOH, KOH, $NH_4OH$ y similares, a temperatura ambiente o inferior a la ambiente en alcoholes tales como etanol, metanol e isopropanol o en cualquier disolvente aprótico polar tal como dimetilformamida (DMF), dimetildisulfóxido (DMSO), N-metilpirrolidona (NMP), hexametilfosforamida (HMPA) y similares. El medio de reacción también puede contener agua en cantidades variables. Se puede controlar la tasa o grado de lantionización ajustando el contenido de agua del medio de reacción.

La sustitución de los restos de cistina por lantionina produce la formación de enlaces tioéter (R-S-R) permanentes (básicamente no reactivos) en lugar de los enlaces disulfuro (R-S-S-R), que se pueden escindir mediante diversos procedimientos. Un importante procedimiento de rotura implica alguna tecnología existente que implica la oxidación de productos de origen animal sin tratar que contienen queratina (pelo, lana, piel con pelo, asta, pezuñas o patas, picos y plumas de ave) para producir un producto con queratina que contiene grupos de ácido sulfónico que es insoluble y se puede usar para producir un material tipo hidrogel (por ejemplo, véase la patente estadounidense 6.316.598 concedida a Keraplast Technologies, Ltd.).

La presente memoria descriptiva ofrece una mejora respecto a los procedimientos previamente desvelados al proporcionar la oportunidad de controlar mejor el número de grupos de ácido sulfónico producidos durante el proceso de oxidación usando la lantionización como pretratamiento. El uso del proceso de lantionización antes de la oxidación también permite la preparación de derivados de queratina de mayor peso molecular (PM) que los producidos usando sólo la oxidación conservando las reticulaciones que se romperían mediante la oxidación. Esto es cierto para los derivados de queratina tanto soluble como insoluble producidos con la oxidación. Por tanto, la presente memoria descriptiva proporciona la capacidad de formar reticulaciones tioéter permanentes que producen productos de mayor PM, a la vez que se controla simultáneamente el número de restos de ácido sulfónico presentes en el material. El uso de los procedimientos desvelados (lantionización) junto con la oxidación proporciona la oportunidad de adaptar biomateriales que contienen queratina a aplicaciones específicas mediante el control del PM, el grado de reticulación permanente y el número de grupos de ácido sulfónico presentes.

**Descripción de realizaciones preferidas del procedimiento**

En una realización de un procedimiento para producir los materiales desvelados, se transfirieron 125 g de fibras de lana a un recipiente de 3,78 l (1 galón estadounidense), mezcladas con 1,5 l de KOH al 1,5% p/v en etanol (EtOH) y se selló con una tapa. Se tuvo

cuidado en garantizar que las fibras de lana estuvieran completamente cubiertas y la mezcla se dejó reposar sin perturbaciones durante aproximadamente 16-18 horas. A continuación, las fibras de lana se aislaron mediante filtración al vacío, se lavaron con dos porciones de 1 l de agua desionizada y se transfirieron a una placa de vidrio forrada con teflón. Las fibras de lana exhibían el olor característico del sulfuro de hidrógeno ($H_2S$) gaseoso. Las fibras de lana lantionizadas se secaron al aire durante aproximadamente 4 horas y, a continuación, se secaron al vacío durante aproximadamente 20 horas para producir el producto final.

En otra realización del procedimiento, se transfirieron quince cuadrados (35,6 g) de material textil, franela de lana envejecida, a un recipiente de vidrio de 1 l, mezclado con 750 ml de KOH/EtOH al 1,5% p/v y se selló con una tapa. Se dejó reaccionar durante aproximadamente 20 horas. A continuación, el tejido se aisló mediante filtración por gravedad y se lavó con dos porciones de 800 ml de agua desionizada, se secó escurriéndolo y se transfirió a una placa de vidrio forrada con teflón. En ese momento, el material textil de lana exhibía el olor característico del $H_2S$. La franela de lana envejecida lantionizada se secó al vacío para producir el producto final. El material textil de lana lantionizado tenía significativamente más elasticidad que el material textil no tratado.

En determinadas realizaciones, la presente memoria descriptiva incluye el uso de materias primas que contienen queratina tales como pelo, lana o plumas, o el uso de materiales con queratina soluble e insoluble aislados de materias primas que contienen queratina. Las materias primas que contienen queratina se pueden fraccionar rompiendo los enlaces disulfuro que forman puentes intramoleculares o intermoleculares usando procesos químicos oxidantes o reductores.

La presente memoria descriptiva proporciona procedimientos para una lantionización controlada de los materiales o proteínas con queratina. La lantionización proporciona diversas ventajas respecto a los procedimientos anteriores de fabricación y uso de estos materiales. Como se ha descrito anteriormente, la lantionización no agresiva del material textil de lana proporciona mayor elasticidad al material textil. En un material textil de lana mixta en el que las fibras de lana discurren en una dirección y las fibras de un material sin queratina discurren en la dirección perpendicular, la elasticidad se puede impartir en una única dirección, por ejemplo.

En determinadas realizaciones preferidas, el proceso de lantionización se puede usar junto con la oxidación en la producción de geles o hidrogeles con queratina. Uno de los objetivos en la producción de estos materiales ha sido la capacidad de controlar el número de restos de cistina que se oxidan. Esto se ha controlado previamente mediante la concentración de oxidante y mediante el tiempo de reacción y la temperatura. La lantionización de una porción de las cistinas bloquea la oxidación adicional de los restos de lantionina en condiciones suaves. El

material con queratina lantionizado se puede oxidar entonces para producir grupos de ácido cisteico de al menos una porción de las cistinas restantes. Un procedimiento preferido de oxidación es colocar el material con queratina en $H_2O_2$ al 2% a 100ºC durante 1,5 horas, seguido de filtración al vacío, lavado en agua destilada desionizada y secado al vacío.

En una realización adicional, el material lantionizado y oxidado se somete a intercambio iónico, o se pone en contacto con una disolución que contiene iones para posibilitar que los iones cargados positivamente, o cationes, sustituyan iones hidrógeno, o que se asocien con regiones cargadas negativamente del material con queratina. El intercambio iónico se puede realizar, preferiblemente, colocando el material con queratina en una disolución que contenga una especie catiónica tal como iones de amonio, sodio, potasio o calcio. Una disolución preferida para el intercambio catiónico de los materiales con queratina es empapar el material en una disolución de $NH_4OH$ 0,1 M durante un periodo de aproximadamente 8-12 horas.

Los materiales con queratina lantionizados/oxidados o lantionizados/oxidados/con intercambio iónico, cuando se secan, o se secan y muelen, son hidratables y forman geles o hidrogeles tras la absorción de agua. Tales materiales hidratados o hidratables son útiles en diversas aplicaciones, incluyendo aplicaciones médicas tales como vendas, sabanas, materiales de expansión tisular, implantes, matrices tisulares celulares, así como aplicaciones cosméticas.

La cualidad hidratable de estos materiales los hace especialmente útiles en el campo de las vendas o materiales absorbentes para colocar sobre una herida. En determinadas realizaciones, por ejemplo, las proteínas con queratina lantionizadas o lantionizadas y oxidadas pueden ser absorbidas en una almohadilla de gasa de algodón para su colocación en una herida. El material con queratina en el algodón mejora la absorbencia de cualquier líquido que sale o supura de la herida. Además, los materiales con queratina se pueden rehidratar con una disolución que contenga sustancias activas tales como antibióticos, analgésicos, citoquinas o factores de crecimiento, para contribuir al proceso de cicatrización. En determinadas realizaciones, se puede formar un hueco entre gasas de algodón y el material con queratina puede alojarse en el hueco de forma que una capa de gasa de algodón se coloca contra la herida y la otra capa se puede colocar contra una capa de soporte impermeable o adhesiva para producir una venda absorbente.

Los materiales desvelados también se pueden usar en la producción de materiales peliculares transparentes, por ejemplo. En una realización, se preparan muestras de 1 gramo de β-queratosa oxidada, seca y molida, o β-queratosa lantionizada y oxidada sobre una lámina de aluminio de 5 pulgadas cuadradas (0,0032 $m^2$). Cualquiera de las muestras se puede someter también a intercambio iónico antes de la producción de las películas. El sólido granular se distribuye tan uniformemente como es posible y se dispone en un cuadrado de aproximadamente

1,5 pulgadas (3,81 cm) en cada lado. A continuación, la muestra de cada sólido se trata con una disolución de plastificante, glicerol al 20% p/p en metanol. La cantidad de disolución de plastificante usada puede variar del 17% hasta aproximadamente el 35% p/p. Las muestras se dejan secar y, a continuación, se prensan en un prensa Carver usando una carga de 8.000 a 8.500 libras (3,63 kg a 3,85 kg) a aproximadamente 130ºC durante 10 minutos. Las películas producidas por este procedimiento son transparentes o semitransparentes y flexibles hasta cierto punto, y tienen la apariencia de la piel. Tales películas son útiles como recubrimiento de heridas o materiales para implantes y también se pueden formar con formas tridimensionales para aplicaciones de materiales para implantes o de relleno.

Se han expuesto numerosas ventajas de las composiciones y procesos desvelados en la descripción anterior, ejemplificada mediante las realizaciones preferidas desveladas. Los expertos en la materia sobreentenderán, sin embargo, que se pueden realizar cambios en los detalles, especialmente en materia de reactivos, concentraciones y orden de las etapas, que no requieren demasiada experimentación. Todos tales cambios en los materiales o procesos se deben interpretar como variantes equivalentes de la memoria descriptiva.

## REIVINDICACIONES

1.- Una composición que comprende un material con queratina aislado en la que del 1% al 50% de los enlaces disulfuro de la cistina del material con queratina aislado se han sustituido por restos de lantionina, en la que los restos de lantionina se han producido en un medio de reacción no acuoso que comprendía una base.

2.- La composición de la reivindicación 1, en la que el material que contiene queratina es pelo o piel humana, lana animal, pelo, piel, pelaje, espina, o pezuñas, plumas, picos o patas aviares.

3.- La composición de la reivindicación 1, en la que el material con queratina aislado es un material textil tejido.

4.- La composición de la reivindicación 3, en la que el material textil es un material textil de lana.

5.- La composición de la reivindicación 3, en la que el material textil es lana mezclada con algodón, poliéster, rayón, seda o nailon.

6.- La composición de la reivindicación 1, en la que aproximadamente el 50% de los enlaces disulfuro de la cistina se han sustituido por restos de lantionina.

7.- La composición de la reivindicación 1, en la que del 5% a aproximadamente el 50% de los enlaces disulfuro de la cistina se han sustituido por restos de lantionina.

8.- La composición de la reivindicación 1, en la que del 10% a aproximadamente el 50% de los enlaces disulfuro de la cistina se han sustituido por restos de lantionina.

9.- La composición de la reivindicación 1, en la que la base es NaOH, KOH, $NH_4OH$, LiOH o $Ca(OH)_2$.

10.- La composición de la reivindicación 9, en la que la base es KOH aproximadamente al 1,5%.

11.- La composición de la reivindicación 1, en la que el medio de reacción comprende un alcohol o un disolvente aprótico.

12.- La composición de la reivindicación 1, en la que el medio de reacción comprende etanol, metanol, isopropanol, dimetilformamida, dimetidisulfóxido, N-metilpirrolidona o hexametilfosforamida.

13.- La composición de la reivindicación 1, en el que los restos de lantionina se han producido en condiciones no hidrolizantes.

14.- La composición de la reivindicación 13, en la que las condiciones no hidrolizantes comprenden una temperatura de 20-30ºC y un medio de reacción no acuoso.

15.- La composición de la reivindicación 1, en la que el material con queratina aislado

comprende proteínas con β-queratina.

16.- La composición de la reivindicación 1, en la que el material con queratina aislado comprende proteínas con α-queratina.

17.- La composición de la reivindicación 1, en la que el material con queratina aislado comprende proteínas con γ-queratina.

18.- Una venda que comprende una capa de material con queratina secado, lantionizado y con intercambio de iones.

19.- La venda de la reivindicación 18, que comprende una capa de gasa de algodón y una capa de material con queratina secado, lantionizado y con intercambio de iones.

20.- La venda de la reivindicación 19, que comprende una segunda capa de gasa de algodón.

21.- La venda de una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, que comprende además un material de soporte.

22.- La venda de una cualquiera de las reivindicaciones 18-21, en la que el material con queratina está oxidado.

23.- Una composición que comprende proteínas de queratina aisladas, que comprenden restos de cistina, en la que una primera porción de los restos de cistina se han transformado en lantionina en un proceso no oxidativo en un medio de reacción no acuoso que comprendía una base y, posteriormente, una segunda porción de los restos de cistina se han transformado en ácido cisteico.

24.- El material de la reivindicación 23, que comprende además cationes asociados con regiones negativamente cargadas de las proteínas.

25.- La composición de la reivindicación 23, en la que las proteínas de queratina aisladas son proteínas con β-queratina insoluble en agua.

26.- Un procedimiento de producción de un material con queratina hidratable que comprende:

(a) incubar un material con proteínas de queratina en una disolución de KOH al 1,5% en un alcohol o disolvente aprótico a una temperatura de 20-30ºC durante un periodo de aproximadamente 18-24 horas y eliminar el disolvente para obtener un material con proteínas de queratina lantionizado; y

(b) incubar el material con proteínas de queratina lantionizado en una disolución de $NH_4OH$ 0,1 M durante un periodo de aproximadamente 8-12 horas y secar el material con proteínas de queratina para obtener un material con proteínas de queratina hidratable.

27.- El procedimiento de la reivindicación 26, en el que el material con proteínas de queratina se produce aislando proteínas de queratina no hidrosolubles a partir de una materia

prima con queratina.

28.- El procedimiento de la reivindicación 26, que comprende además incubar el material con proteínas de queratina en una disolución de $H_2O_2$ al 2% a 100ºC durante 1,5 horas.

29.- El procedimiento de la reivindicación 28, en el que la incubación en $H_2O_2$ al 2% se realiza antes de la etapa (a).