

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 004 567**

(51) Int. Cl.:

A61L 15/46 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2020 PCT/SE2020/051223**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2021 WO21126063**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2020 E 20842349 (1)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024 EP 4076549**

(54) Título: **Dispositivo mejorado para el cuidado de heridas**

(30) Prioridad:

18.12.2019 SE 1951495

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2025

(73) Titular/es:

**AMFERIA AB (100.00%)
Pepparedsleden 1
431 83 Mölndal, SE**

(72) Inventor/es:

**KUMAR RAJESKHARAN, ANAND;
ATEFYKTA, SABA;
ANDERSSON, MARTIN y
BLOMSTRAND, EDVIN**

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 3 004 567 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

Dispositivo mejorado para el cuidado de heridas

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a hidrogeles antimicrobianos. Específicamente, se refiere a una composición de hidrogel anfílico antimicrobiano para su uso en la hemostasia de una herida. El hidrogel antimicrobiano se puede presentar como una dispersión.

10 Antecedentes de la invención

La infección de una herida que afecte a la piel o los tejidos cercanos a una herida, interfiere con el proceso de curación y puede causar enfermedades sistémicas. Hoy en día, la terapia con antibióticos es el tratamiento más común para tratar la infección de heridas. Durante muchos años, dichas rutinas de terapia con antibióticos no solo han demostrado causar efectos secundarios sistémicos en los pacientes, sino que también han provocado un rápido aumento de las infecciones graves causadas por bacterias resistentes a los antibióticos.

La hemostasia o hemostasis es el proceso del cuerpo para prevenir y detener el sangrado. La hemostasia implica la coagulación de la sangre y la formulación de coágulos sanguíneos para detener el sangrado. En el cuidado de las heridas es conocido el uso de hemostáticos de colágeno microfibrilar para acelerar la formación de coágulos sanguíneos. El colágeno microfibrilar está disponible en forma de lámina, polvo y esponja.

Los apó�itos para heridas disponibles en el mercado, tales como Mepilex® o Mepilex-Ag® (comercializados por Mölnlycke Health Care) incorporan capas blandas de apósoito superabsorbentes que comprenden plata como agente antimicrobiano. La plata se libera en la herida y destruye los microbios al dañar la pared celular o inhibir la reproducción del microbio. Muchos otros apósoitos para heridas incorporan moléculas antimicrobianas tales como la clorhexidina, o se utilizan antibióticos convencionales, tales como la penicilina, para prevenir la adhesión o la infección bacteriana en el lugar de la herida. Sin embargo, los compuestos anteriores tienen un uso limitado debido a su espectro de actividad limitado, su citotoxicidad para las células humanas, y la posibilidad de desarrollar resistencia a los antimicrobianos después de solo un breve período. Además, la liberación de plata en el sistema acuático tiene efectos ambientales perjudiciales. Según los desinfectantes alternativos para el agua potable: bromo, yodo y plata. Organización Mundial de la Salud; 2018 “En base al valor medio más bajo de L(E)C₅₀ de los principales organismos ambientales, tanto la sal de plata como las nanopartículas de plata se clasificarían como ‘muy tóxicas para los organismos acuáticos’, según la Directiva 93/67/CEE de la UE (CEC, 1996)”

En general, los dispositivos para el cuidado de heridas, tales como los mencionados anteriormente, que pueden tener características antibacterianas, simplemente recogen o absorben sangre.

El documento WO 2019/074422 A1 (AMFERIA AB) del 18 de abril de 2019, describe un hidrogel anfílico antimicrobiano. El hidrogel del documento WO 2019/074422 A1 se describe como un material sólido singular adecuado para su uso como dispositivo antimicrobiano para el cuidado de heridas, especialmente en infecciones resistentes a los antibióticos. Este documento no se refiere a la hemostasia ni a las heridas sanguíneas. Las composiciones mejoradas y los nuevos usos del material pueden mejorar las alternativas para el cuidado de heridas para el personal médico y los pacientes.

Los dispositivos que tienen un efecto antimicrobiano y hemostático combinado serían ventajosos.

Resumen de la invención

En consecuencia, la presente invención busca preferiblemente mitigar, aliviar o eliminar una o más de las deficiencias identificadas anteriormente en la técnica por separado o en cualquier combinación, y resuelve al menos los problemas mencionados anteriormente, al proporcionar una composición de hidrogel anfílico antimicrobiano para su uso en la hemostasia de una herida, que comprende: un primer componente anfílico reticulado, siendo el primer componente anfílico, en su estado químicamente reticulado, un cristal líquido liotrópico, y teniendo una nanoestructura ordenada de dominios hidrófobos e hidrófilos, comprendiendo el hidrogel un agente antimicrobiano unido covalentemente a los dominios hidrófilos y/o hidrófobos, en donde el agente antimicrobiano es un péptido antimicrobiano que comprende menos de 20 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con RRPRPRPRP.

Sorprendentemente, se ha demostrado que la composición tiene un efecto hemostático.

A diferencia de otros dispositivos hemostáticos antimicrobianos, el hidrogel anfílico no es biodegradable y los agentes antimicrobianos están unidos covalentemente al hidrogel, lo que significa que no lixiviaria en la herida hidrogel y/o agentes antimicrobianos, y es estable a largo plazo. Sorprendentemente, en lugar de modificar un dispositivo de colágeno microfibrilar, los presentes inventores han utilizado un nuevo material que parece tener un efecto antimicrobiano y hemostático combinado. Además, la provisión de un material anfílico antimicrobiano permite que el material absorba sustancias tanto hidrófobas como hidrófilas, tales como las toxinas bacterianas liberadas por las bacterias moribundas. Los dominios pequeños y repetitivos permiten, además, que una mayor densidad de agentes

antimicrobianos se encuentre presente en la superficie del hidrogel. En comparación con los dispositivos hemostáticos antimicrobianos anteriores, el presente hidrogel anfílico es capaz de hincharse significativamente desde un estado húmedo y, por lo tanto, el exudado sanguíneo y la sangre pueden absorberse en el hidrogel.

- 5 Además, se proporciona una composición de hidrogel antimicrobiano para su uso en la hemostasia de una herida, en donde el agente antimicrobiano es un péptido antimicrobiano derivado de una proteína rica en prolina y arginina con repeticiones de leucina en su extremo, PRELP (por sus siglas en inglés), tal como un péptido antimicrobiano con una identidad del 95 % con RRPRPRPRP. Se ha demostrado que tales proteínas son similares a LL-37 derivado de la catelicidina humana, con respecto a varios aspectos, tales como la carga neta y la eficacia antimicrobiana (Malmsten, M. y col., Highly Selective End-Tagged Antimicrobial Peptides Derived from PRELP, PLoS ONE, 2011, 6(1): e16400. doi:10.1371/journal.pone.0016400). Sin embargo, se ha demostrado anteriormente que LL-37 no afecta a la coagulación plasmática (Harm, S. y col., Blood Compatibility: An Important but often forgotten Aspect of the Characterization of Antimicrobial Peptides for Clinical Application, Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 5426; doi:10.3390/ijms20215426).
- 10 15 Se proporciona un péptido antimicrobiano derivado de una proteína rica en prolina y arginina con repeticiones de leucina en su extremo, PRELP, para su uso en la hemostasia de una herida, en donde el agente antimicrobiano es un péptido antimicrobiano que comprende menos de 20 aminoácidos y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con RRPRPRPRP.
- 20 25 Otras realizaciones ventajosas se describen en las reivindicaciones de patente adjuntas y dependientes.

Breve descripción de los dibujos

25 Estos y otros aspectos, características y ventajas de los que es capaz la invención resultarán evidentes y se aclararán a partir de la siguiente descripción de las realizaciones de la presente invención, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que

30 35 La Figura 1 es un esquema de síntesis del copolímero tribloque Pluronic® modificado con diacrilato, en donde X e Y se refieren al número de grupos PEO y PPO.

40 La Figura 2 muestra el esquema de reacción de la unión covalente de péptidos antimicrobianos al copolímero tribloque Pluronic F-127 modificado con diacrilato mediante activación por EDC/NHS.

45 50 La Figura 3 muestra una prueba de inhibición de zona del hidrogel antimicrobiano frente a las muestras de control. La Figura 3a muestra un hidrogel anfílico de control negativo sin AMP; la Figura 3b muestra un hidrogel anfílico con AMP absorbidos solo físicamente; la Figura 3c muestra un hidrogel antimicrobiano anfílico según un aspecto, en donde los AMP están unidos covalentemente al hidrogel anfílico. La zona de inhibición es la región más oscura y se puede ver que se extiende más allá del área del hidrogel (el elemento circular central), mientras que en la Figura 3C la zona de inhibición está directamente debajo del hidrogel, lo que indica que no se ha lixiviado AMP del hidrogel.

55 60 La Figura 4 muestra un esquema de AMP ligado covalentemente a un hidrogel anfílico reticulado químicamente con una nanoestructura hexagonal normal ordenada, repetitiva, alineada e impresa en 3D.

65 70 La Figura 5 muestra los resultados de una prueba de estabilidad de almacenamiento en solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). En la Figura 5a se puede ver la proporción de células muertas (*S. aureus*) para un hidrogel anfílico de control y un hidrogel anfílico antimicrobiano. La Figura 5b muestra la cobertura superficial total encontrada en los hidrogeles. El asterisco (*) indica una diferencia significativa en comparación con la muestra de control, con un nivel de confianza del 95 %.

75 80 La Figura 6 muestra los resultados de una prueba de estabilidad en suero en donde los hidrogeles se expusieron a un 20 % de suero humano. Los hidrogeles se extrajeron del suero en los tiempos indicados en el eje x. La proporción de células muertas (*S. aureus*) en la superficie de los hidrogeles se determinó mediante la tinción de vivas/muertas y se encuentra en el eje y. En cada punto temporal, excepto a los 5 días, hubo una diferencia significativa con un nivel de confianza del 95 % entre las superficies activadas en comparación con el control. Cada barra está compuesta de imágenes tomadas de cuatro muestras.

85 90 La Figura 7 muestra el resultado del experimento de coagulación sanguínea (Experimento 1). La figura muestra, para dos donantes, el número de plaquetas después de la incubación de sangre entera a 37° durante 60 minutos para; sangre inicial, sangre incubada sin contacto con el hidrogel, contacto con el hidrogel anfílico, sangre incubada con el hidrogel anfílico antimicrobiano. Los datos representan la media ± el error estándar de la media para n = 4.

95 100 La Figura 8 muestra partículas de control y activadas por AMP colocadas sobre placas de agar esparcidas con *S. aureus* y cultivadas durante la noche (aproximadamente 15 horas). La región A es la región de control (hidrogel sin AMP) y la región B son las partículas de hidrogel activadas por AMP.

La Figura 9 muestra un diagrama esquemático de un dispositivo de pulverización según un aspecto.

5 La Figura 10 muestra una imagen de las pruebas de coagulación sanguínea (Experimento 1) con sangre humana en hidrogeles anfíflicos con y sin AMP. De izquierda a derecha: sangre del donante 1 en hidrogel sin AMP, sangre del donante 1 en hidrogel con AMP, sangre del donante 2 en hidrogel sin AMP, sangre del donante 2 en hidrogel con AMP. La sangre coagulada se puede ver claramente en los dos hidrogeles con muestras de AMP.

Descripción detallada

10 La siguiente descripción de la presente invención describe hidrogeles anfíflicos antimicrobianos, usos de hidrogeles anfíflicos antimicrobianos en el cuidado de heridas, y composiciones que comprenden dichos hidrogeles anfíflicos antimicrobianos. El hidrogel antimicrobiano comprende un primer componente anfíflico reticulado. En su estado reticulado, el componente anfíflico da como resultado un hidrogel que comprende una estructura ordenada de dominios hidrófilos e hidrófobos. El hidrogel antimicrobiano comprende, además, un agente antimicrobiano ligado covalentemente a los dominios hidrófilos y/o hidrófobos repetitivos del hidrogel reticulado. Los detalles sobre los métodos de fabricación del hidrogel anfíflico y sus beneficios se detallan en el documento WO 2019/074422 A1.

15 La nanoestructura ordenada repetitiva del hidrogel anfíflico comprende dominios hidrófobos-hidrófilos repetitivos y alternos. La morfología y la estructura específica de los dominios hidrófobos-hidrófilos se discuten a continuación. El hidrogel comprende una nanoestructura ordenada y repetitiva en todo el hidrogel, es decir, no solo en la superficie del hidrogel. El hidrogel reticulado es sólido. La reticulación intermolecular bloquea irreversiblemente la estructura ordenada y da como resultado un hidrogel que tiene una alta integridad y es mecánicamente resistente.

20 El hidrogel antimicrobiano es especialmente adecuado para aplicaciones de cuidado de heridas debido a la nanoestructura ordenada y repetitiva que conduce a una provisión ordenada y repetitiva de agentes antimicrobianos en la piel o la superficie de la herida. Además, los agentes antimicrobianos se inmovilizan mejor, lo que conduce a un mejor rendimiento a largo plazo.

25 Se puede considerar que el hidrogel forma un sustrato sobre el que pueden inmovilizarse agentes antimicrobianos. El hidrogel es, en su estado reticulado, autoportante y tridimensional. En general, el hidrogel es sustancialmente no degradante en condiciones fisiológicas. Es decir, el hidrogel no es biodegradable, sustancialmente no se degrada por las condiciones químicas o enzimáticas que se encuentran en las condiciones *in vitro* e *in vivo* relevantes. Por ejemplo, el hidrogel no se degrada en presencia de sangre, sudor, orina u otros fluidos biológicos. Además, el hidrogel es sustancialmente no degradante, es decir, es estable y permanece sólido en entornos de un pH relativamente bajo o alto.

30 35 El hidrogel puede formar una primera capa sustancialmente uniforme a la que se unen covalentemente los agentes antimicrobianos. Los agentes antimicrobianos pueden unirse covalentemente a al menos los dominios hidrófilos repetitivos del hidrogel en toda la capa. Pueden proporcionarse dentro de la capa, y no solo en la superficie del hidrogel. Esta es una mejora significativa en comparación con las técnicas de modificación de la superficie de un hidrogel u otro sustrato, que conducen solo a la inmovilización de la superficie de los agentes antimicrobianos. Los dominios pequeños y repetitivos permiten, además, que una mayor densidad de agentes antimicrobianos esté presente en la superficie del hidrogel.

40 45 La estructura repetitiva y ordenada de los dominios hidrófilos e hidrófobos se ordena al menos a nanoscala y, como se analizará más adelante, se puede ordenar a mayor escala, micro o macroescala, en función de las técnicas de producción. Los términos “ordenado” y “repetitivo” se refieren al hidrogel con una periodicidad definida. A diferencia de los hidrogeles basados en carbohidratos, polisacáridos u otras moléculas no anfíflicas, la nanoestructura del hidrogel, tal como se describe en la presente memoria, tiene una nanoestructura ordenada y repetitiva, y no está reticulada al azar. El hidrogel es anfíflico. Tras la reticulación, el hidrogel anfíflico es un hidrogel anfíflico químicamente reticulado.

50 55 La nanoestructura ordenada y repetitiva da como resultado agentes antimicrobianos ligados covalentemente al hidrogel con una orientación definida. Si los propios agentes antimicrobianos son anfíflicos, entonces el agente antimicrobiano se inmoviliza adicionalmente de manera más eficaz en la superficie y dentro del hidrogel. La anfífilicidad del hidrogel también permite la absorción tanto de soluciones acuosas como no acuosas.

60 65 Como se indicó anteriormente, a diferencia de un hidrogel con un tratamiento de superficie para definir una química de superficie, el hidrogel de la presente descripción tiene una nanoestructura repetitiva y ordenada tanto en la superficie como dentro del volumen del hidrogel. Esto conduce a una mejor inmovilización de los agentes antimicrobianos tanto en la superficie como dentro del hidrogel.

70 75 El hidrogel antimicrobiano puede formarse mediante la reticulación química de materiales anfíflicos orgánicos, tales como copolímeros reticulables, surfactantes reticulables, proteínas reticulables, péptidos reticulables y lípidos reticulables. “Reticulable”, tal como se usa en la presente memoria, se refiere al enlace covalente de moléculas entre sí usando grupos químicos reactivos presentes en las moléculas. El proceso de reticulación química se puede catalizar utilizando luz, tal como luz ultravioleta, calor u otros catalizadores químicos tales como enzimas. La reticulación covalente del hidrogel no es reversible. La reticulación covalente no se degradará ni se desintegrará a temperaturas elevadas. La reticulación covalente también es estable frente a las variaciones de pH.

- El primer componente anfifílico del hidrogel puede ser un polímero anfifílico reticulable. Un material anfifílico típico y adecuado es un poloxámero modificado con diacrilato, tal como óxido de polietileno-óxido de polipropileno-óxido de polietileno (DA-PEO_x-PPO_y-PEO_x, donde x e y se refieren al número de grupos PEO y PPO presentes respectivamente), como se describe en la sección experimental a continuación. Específicamente, el material anfifílico puede ser los copolímeros tribloque anfifílicos, óxido de polietileno(100)-óxido de polipropileno(70)-óxido de polietileno(100) (Pluronic® F127 - BASF Corporation), óxido de polietileno(30)-óxido de polipropileno(70)-óxido de polietileno(30) (Pluronic® P123 - BASF Corporation).
- Como se indicó anteriormente, el componente anfifílico puede ser un derivado de diacrilato de un copolímero tribloque, permitiendo así que el copolímero se reticle químicamente. En la sección experimental que sigue se proporciona un proceso para la modificación del diacrilato. La modificación se puede realizar mediante la reacción de un copolímero anfifílico tribloque con cloruro de acriloilo para formar un derivado de diacrilato. Pueden ser posibles otros métodos para formar polímeros anfifílicos reticulables, tales como la formación de derivados de metacrilato o mediante puentes carboxílico-amino.
- El polímero anfifílico reticulable puede, en presencia de agua, autoensamblarse para formar nanoestructuras ordenadas, denominadas cristales líquidos liotrópicos (LLC, por sus siglas en inglés). En su forma reticulada, es decir, después de la reticulación, el hidrogel puede considerarse un cristal líquido liotrópico (LLC) químicamente reticulado. Se puede considerar que la reticulación del polímero anfifílico forma un cristal líquido liotrópico polimerizado (PLLC, por sus siglas en inglés) con una estructura bien definida.
- Un hidrogel reticulado no sólido puede tener una estructura de agregados micelares esféricos en un rango de tamaño de 2 a 100 nm dispuestos aleatoriamente a lo largo del hidrogel, denominado sistema micelar normal, denominado en forma abreviada, Li. Dicho hidrogel micelar normal puede comprender de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 19 % (% en peso) de polímero anfifílico, y de aproximadamente el 99 % a aproximadamente el 81 % (% en peso) de agua. Generalmente, este sistema no forma un gel sólido reticulado, sin embargo, en ciertos casos, tales como entre el rango del 15 al 19 % (% en peso) de concentración de polímero anfifílico, el sistema puede existir como un sólido reticulado con características mecánicas muy blandas y flexibles.
- El hidrogel puede tener una estructura de agregados micelares esféricos en el rango de tamaño de 2 a 100 nm, dispuestos en una disposición ordenada y de cristal líquido liotrópico de forma cúbica, conocida como sistema cúbico micelar normal, denominado en forma abreviada I_1 , con una disposición primitiva (P...) o una disposición centrada en el cuerpo (B...) o una disposición centrada en la cara (F...) de estructuras micelares en una red cúbica. Un ejemplo de una estructura cúbica micelar normal con una simetría cristalina $Im\bar{3}m$ puede comprender de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 65 % (% en peso) de polímero anfifílico, y de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 35 % (% en peso) de agua. Otro ejemplo de composición para obtener un sistema cúbico micelar normal con una disposición primitiva de las estructuras micelares en una red cúbica es el 65 % (% en peso) de agua, el 10 % (% en peso) de butanol, y el 25 % (% en peso) de polímero anfifílico.
- El hidrogel puede tener una estructura de agregados micelares esféricos en el rango de tamaño de 2 a 100 nm, dispuestos en una disposición ordenada de cristal líquido liotrópico, de forma cúbica bicontinua, conocida como sistema cúbico micelar con una estructura cristalina $Pn\bar{3}m$. Dicho sistema cúbico micelar bicontinuo con una estructura cristalina $Pn\bar{3}m$ puede comprender de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 65 % (% en peso) de polímero anfifílico, y de aproximadamente el 75 % a aproximadamente el 35 % (% en peso) de agua. Otro ejemplo de composición para obtener una estructura de LLC de este tipo, es entre el 33 y el 38 % (% en peso) de agua, y el resto compuesto por una especie anfifílica o un polímero anfifílico.
- El hidrogel puede tener una estructura de agregados micelares esféricos en el rango de tamaño de 2 a 100 nm, dispuestos en una disposición ordenada de cristal líquido liotrópico, de forma cúbica bicontinua, conocida como sistema cúbico micelar con una estructura cristalina $la\bar{3}d$. Un ejemplo de composición para obtener una estructura de LLC de este tipo es del 13 al 32 % (% en peso) de agua, y el resto compuesto por la especie anfifílica o el polímero anfifílico.
- El hidrogel puede tener una estructura de agregados micelares cilíndricos con un diámetro de cilindros en el rango de tamaño de 2 a 100 nm, dispuestos en un cristal líquido liotrópico ordenado, de geometría hexagonal, denominado sistema hexagonal normal. En un sistema hexagonal normal de este tipo, el polímero anfifílico puede estar presente en de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 80 % (% en peso), y el agua puede estar presente en de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 20 % (% en peso), con o sin cantidades menores de disolventes orgánicos. Dicho sistema micelar hexagonal normal puede comprender de aproximadamente el 35 % a aproximadamente el 40 % (% en peso) de polímero anfifílico, aproximadamente el 50 % (% en peso) de agua, y de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 15 % (% en peso) de disolvente orgánico.
- El hidrogel antimicrobiano también puede tener una nanoestructura ordenada y reticulada químicamente de las siguientes estructuras, con una geometría neutra y curvatura cero; los agregados micelares en forma de lámina con una distancia entre láminas adyacentes están en el rango de 2 a 100 nm, dispuestos como cristal líquido liotrópico, geometría laminar denominada sistema laminar. Dicho sistema laminar puede comprender entre el 20 y el 80 % (% en peso) de moléculas anfifílicas, entre el 15 y el 60 % (% en peso) de una solución acuosa, y entre el 0 y el 25 % (% en peso) de disolventes

orgánicos, tales como el butanol. Un ejemplo de composición para obtener una LLC lamelar es un 20 % de polímero anfílico, un 55 % (% en peso) de agua, y un 25 % (% en peso) de disolvente orgánico, tal como butanol.

5 Las nanoestructuras de cristal líquido micelares y liotrópicas del hidrogel antimicrobiano pueden comprender líquidos acuosos tales como agua como dominio continuo y partes hidrófobas confinadas dentro de los agregados micelares. La nanoestructura de cristal líquido micelar y liotrópico puede comprender un líquido acuoso tal como agua confinada dentro de los agregados micelares y un dominio continuo hidrófobo. Los líquidos acuosos incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, sangre, sudor y otros posibles fluidos biológicos. En su estado completamente húmedo, también conocido como hinchado, el hidrogel antimicrobiano puede absorber de hasta 3 a 4 veces su propio peso de líquidos acuosos. Un estado completamente húmedo/hinchado se refiere a la concentración original (en peso) del hidrogel de una solución acuosa al 20-90 %, y de un 10-80 % de moléculas orgánicas anfílicas, en función del tipo de estructura de LLC reticulada que posean los hidrogeles. En su estado completamente seco, el hidrogel contiene uniformemente menos del 10 % en peso de solución acuosa y, más habitualmente, menos del 5 % de solución acuosa en peso, en cuyo caso puede absorber de hasta 8 a 10 veces la solución acuosa de su propio peso. Tras la absorción del líquido, el hidrogel antimicrobiano se hincha y cambia de tamaño. Sin embargo, la forma y la geometría de los hidrogeles se mantienen sustancialmente.

10 Debido a la anfílisis del hidrogel antimicrobiano, también puede absorber líquidos hidrófobos. En presencia del disolvente hidrófobo cloroformo, el hidrogel completamente seco puede absorber un líquido hidrófobo, tal como cloroformo, hasta de 20 a 30 veces su propio peso. Como anteriormente, un estado completamente seco se refiere a la concentración del hidrogel de menos del 5 % de solución acuosa, y más del 95 % de moléculas orgánicas anfílicas en peso. El estado completamente seco no se refiere a una red polimérica liofilizada, que no puede considerarse un hidrogel.

15 Las propiedades de absorción de líquidos de los hidrogeles se pueden adaptar para absorber más o menos agua o líquidos hidrófobos. Esto se puede lograr mediante el uso de moléculas anfílicas de diferentes longitudes de cadena en grupos hidrófilos e hidrófobos para formar el hidrogel. Por ejemplo, los grupos del copolímero de bloques anfílicos DA-PEO_x-PPO_y-PEO_x-DA, donde x e y se refieren al número de PEO y PPO, pueden poseer más o menos grupos PEO o PPO. Cantidad más alta de grupos PEO que de grupos PPO pueden dar como resultado un hidrogel con una alta capacidad de absorción de agua, de hasta 3 a 8 veces su propio peso inicial. Por el contrario, un hidrogel con más grupos PPO que grupos PEO absorbe menos agua, aproximadamente de 0,5 a 1,5 veces su peso inicial.

20 30 El agente antimicrobiano está ligado covalentemente a los dominios hidrófilos y/o hidrófobos repetitivos. En el hidrogel antimicrobiano, hay una pluralidad de moléculas antimicrobianas, cada una de las cuales está ligada covalentemente a al menos una parte de los dominios hidrófilos y/o hidrófobos periódicos y repetitivos.

25 35 Más del 10 %, tal como más del 50 %, o más del 90 % del agente antimicrobiano presente en el hidrogel puede unirse covalentemente al hidrogel. Esto da como resultado una mayor estabilidad y una reducción de la lixiviación del agente antimicrobiano del hidrogel.

40 45 El agente antimicrobiano puede ser un agente antimicrobiano anfílico. Es decir, la molécula antimicrobiana puede tener una región hidrófila y una región hidrófoba. El agente antimicrobiano se puede seleccionar de manera que rompa la pared celular bacteriana mediante fuerzas electrostáticas. El agente antimicrobiano puede ser una molécula polimérica antimicrobiana, tal como biocidas poliméricos o un péptido antimicrobiano (AMP, por sus siglas en inglés). Los AMP generalmente interrumpen o inhiben el crecimiento y la proliferación microbianos, al dañar las membranas celulares de los microbios. Los AMP son generalmente anfílicos. Los AMP son generalmente péptidos de cadena corta, es decir, que consisten en 1 a 50 aminoácidos y pesos moleculares entre 1 y 50 kDa. Los AMP pueden ser AMP de cadena lineal, AMP ramificados y/o AMP cíclicos. Generalmente, poseen una carga neta positiva y poseen regiones tanto hidrófilas como hidrófobas. Se sabe que la estructura anfílica cargada positivamente de los AMP permite que el péptido penetre en la membrana bacteriana cargada negativamente. La pared celular comprometida conduce a la muerte celular. La naturaleza anfílica de los AMP, en combinación con la nanoestructura ordenada y repetitiva del hidrogel, conduce a la orientación y a una mayor inmovilización de los AMP. Es decir, los AMP no se separan ni se liberan del hidrogel subyacente. Esto da como resultado que el hidrogel antimicrobiano sea un sustrato no lixiviable para los agentes antimicrobianos. Un AMP puede estar unido covalentemente tanto a un dominio hidrófilo como a un dominio hidrófobo del hidrogel anfílico. Un AMP puede estar unido covalentemente a dominios hidrófilos e hidrófobos adyacentes. El extremo N de un AMP puede estar unido covalentemente a los dominios hidrófobos del hidrogel. El extremo C de un AMP puede estar unido covalentemente a los dominios hidrófilos del hidrogel.

50 55 Un AMP puede estar tanto unido covalentemente al hidrogel anfílico como absorbido físicamente en el hidrogel. Como se muestra en la imagen situada más a la derecha en la Figura 3B del documento WO 2019/074422 A1, incluso tras 3 semanas de lavado con etanol al 50 %, el hidrogel anfílico no libera todo el AMP marcado con fluorescencia absorbido físicamente. Esto se debe a la anfílisis del hidrogel y a la interacción del AMP con los dominios hidrófilos e hidrófobos del hidrogel. Esto da como resultado un mayor rendimiento antimicrobiano y una estabilidad a largo plazo durante el uso.

60 65 El agente antimicrobiano puede ser plata (Ag). Por ejemplo, el agente antimicrobiano puede ser una nanopartícula de plata inmovilizada dentro o sobre los dominios hidrófilos y/o hidrófobos repetitivos y ordenados del hidrogel. Se sabe que la plata tiene la desventaja de aumentar la toxicidad para las células mamíferas y tiene efectos ambientales perjudiciales si, por ejemplo, se libera en el sistema acuático; sin embargo, también es generalmente un agente antimicrobiano de menor coste en comparación con un AMP.

No sería evidente para el experto en la técnica que los grupos carboxilo estuvieran presentes en el hidrogel anfíflico. Por lo tanto, no hay ninguna razón como tal para intentar unir covalentemente un AMP al hidrogel anfíflico, sin modificaciones adicionales al hidrogel.

5 La inmovilización se logra generalmente mediante los enlaces covalentes entre los grupos carboxilo en los dominios hidrófilos del hidrogel. En el caso de que el agente antimicrobiano sea un péptido antimicrobiano, se forman fuertes enlaces amida entre el AMP y los dominios hidrófilos repetitivos del hidrogel. El AMP puede ligarse covalentemente al hidrogel mediante la activación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiímidas (EDC)-N-hidroxisuccinimida (NHS) de los grupos carboxilo presentes en los dominios hidrófilos del hidrogel. El esquema de reacción para dicha unión covalente de los AMP mediante la activación de EDC/NHS se puede ver en la Figura 2. Además, los AMP u otros agentes antimicrobianos pueden absorberse físicamente en el hidrogel, sin embargo, en tal caso, no hay un enlace covalente del agente antimicrobiano a las regiones hidrófilas o hidrófobas del hidrogel. Sin embargo, los agentes antimicrobianos ligados de forma no covalente son propensos a una degradación y a una lixiviación/liberación relativamente más rápidas del hidrogel. En la prueba de inhibición de zona mostrada en la Figura 3, se puede observar que los AMP absorbidos físicamente tienden a lixiviarse/liberarse del hidrogel, mientras que los AMP ligados o unidos covalentemente no se lixivian.

20 El AMP, u otro agente antimicrobiano anfíflico, tiene una región hidrófoba que interactúa con las regiones hidrófobas ordenadas y repetitivas del hidrogel. Esto conduce a una mejor orientación y a una mejor inmovilización del agente antimicrobiano. De este modo, la estabilidad y la resistencia a la degradación de los AMP aumentan, al tiempo que se disminuye o se elimina la liberación de los AMP al entorno circundante, debido a que el hidrogel tiene dominios hidrófilos e hidrófobos ordenados y repetitivos. Se afirma que dicha arquitectura mejora la estabilidad y la actividad de los AMP.

25 Como se muestra en la sección de experimentación a continuación, el hidrogel antimicrobiano es capaz de destruir hasta el 99,99 % de las bacterias. Sin pretender imponer ninguna teoría, otro beneficio es que los dominios hidrófilos del hidrogel antimicrobiano son capaces de atraer las bacterias cargadas negativamente y, por lo tanto, destruirlas eficazmente. En las aplicaciones para el cuidado de heridas, esto también puede conducir a la eliminación de bacterias muertas y/o adheridas mediante la extracción de un apósito para heridas que contenga el hidrogel antimicrobiano. Los resultados experimentales para bacterias grampositivas y gramnegativas sugieren que el hidrogel antimicrobiano también es capaz de destruir las cepas de bacterias resistentes a los fármacos, tal como el SARM y la *E. coli* multirresistente a los fármacos (MDR).

30 Como se muestra en la sección experimental, el péptido antimicrobiano puede ser uno o más de los siguientes; RRRPRPRPRPWWWW-NH2 (RRP9W4N, Red Glead Discovery AB, Lund, Suecia), RRPRPRPRPRP-NH2 (RRP9N, Red Glead Discovery AB, Lund, Suecia), RRPRPRPRPWWRP-NH2 (RRP7W4RPN, Red Glead Discovery AB, Lund, Suecia), RRRPRPRPRPWWRP-NH2 (RRP5W2RPW2RPN, Red Glead Discovery AB, Lund, Suecia). Las secuencias para RRP9W4N, RRP9N, se proporcionan en el documento WO 2012/033450 A1. Las secuencias para RRP7W4RPN y RRP5W2RPW2RPN se proporcionan en el documento WO 2019/074422 A1. El péptido antimicrobiano es un péptido antimicrobiano que comprende menos de 20 aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 %, opcionalmente el 95 %, de identidad con la secuencia de aminoácidos RRRPRPRPRP (secuencia proporcionada en el documento WO 2012/033450 A1) y, opcionalmente, un tramo de al menos tres residuos consecutivos de triptófano o fenilalcalina adjuntos al extremo C o N, o entre ellos. El péptido antimicrobiano puede comprender una amidación en el extremo N. El péptido antimicrobiano puede ser un péptido antimicrobiano que comprenda un tramo de al menos uno, tal como al menos tres, aminoácidos hidrófobos, tales como fenilalanina o residuos de triptófano, que formen una región hidrófoba. La región hidrófoba permite la interacción con las regiones hidrófobas del hidrogel. Sin embargo, otros péptidos antimicrobianos pueden ser adecuados para su uso como agente antimicrobiano.

35 El agente antimicrobiano puede ser un AMP derivado sintéticamente como los del párrafo anterior, o derivado biológicamente. Los AMP derivados biológicamente pueden derivarse de proteínas cincinógenas, de una proteína rica en prolina y arginina con repeticiones de leucina en su extremo (PRELP), proteínas del factor de crecimiento, proteínas del sistema de coagulación, factor de complemento C3a, factor von Willebrand, vitronectina, superóxido dismutasa, proteínas prionómicas, inhibidor de la proteína C, fibronectina, laminina, quimiocinas y glicoproteína rica en histidina. Algunos ejemplos de AMP derivados biológicamente son el péptido LL-37 derivado de catelicidina humana y el pentahidrocloruro de omiganán. Todos estos péptidos pueden potencialmente incorporarse al hidrogel unidos covalentemente o absorbidos físicamente. Por sí solos o junto con otros péptidos. El agente antimicrobiano puede ser un derivado de LL-37 con menos de 37 aminoácidos, es decir, una longitud inferior a la del LL-37 de tipo silvestre. El agente antimicrobiano es preferiblemente un péptido derivado de una proteína rica en prolina y arginina con repeticiones de leucina en su extremo (PRELP). Preferiblemente, el agente antimicrobiano es comparable a LL-37 en cuanto a su carga y eficacia antimicrobiana. Como se describe en la sección experimental, el agente antimicrobiano es preferiblemente RRP9W4, que es un péptido derivado de PRELP, comparable a LL-37 con respecto a la eficacia antimicrobiana y la carga neta.

40 60 El agente antimicrobiano se puede unir al hidrogel mediante una variedad de procesos. Como se muestra en la sección experimental, el agente antimicrobiano se puede unir mediante la inmersión del hidrogel en una solución que comprenda el agente antimicrobiano. Se puede aplicar un agente antimicrobiano sustancialmente a la superficie del hidrogel mediante un proceso de aplicación superficial, en lugar de por inmersión. Una solución que comprende el agente antimicrobiano puede depositarse sobre la superficie del hidrogel. Se puede rociar sobre el hidrogel una solución que comprenda el agente antimicrobiano. Como se muestra en la sección experimental, la cantidad de

65

agente antimicrobiano requerida para la activación antimicrobiana de la superficie, generalmente se reduce significativamente mediante la deposición y la pulverización, en comparación con la inmersión. Esto se debe a que la mayor parte del hidrogel no se activa con un agente antimicrobiano.

- 5 Además del agente antimicrobiano, el hidrogel puede comprender al menos un agente terapéutico. Debido a los dominios hidrófilos e hidrófobos ordenados y repetitivos del hidrogel, el agente terapéutico puede ser hidrófobo, hidrófilo o anfífilico, polar o no polar. El hidrogel antimicrobiano puede alojar un agente o agentes terapéuticos hidrófobos en el dominio hidrófobo, mientras que los dominios hidrófilos alojarán un agente o agentes terapéuticos hidrófilos. Un agente terapéutico puede ser, pero no se limita a, moléculas de fármacos o biomoléculas pequeñas, tales como péptidos o proteínas con propiedades antiinflamatorias, antibióticas o anticancerígenas. Esta propiedad de liberación selectiva de agentes terapéuticos a partir de los hidrogeles antimicrobianos puede usarse, además de sus propiedades antimicrobianas, en dispositivos médicos, tales como para el cuidado y la curación de heridas, u otras aplicaciones antimicrobianas o de liberación de fármacos. Al menos un agente terapéutico puede estar unido covalentemente o absorbido físicamente a los dominios hidrófobos y/o hidrófilos del hidrogel antimicrobiano. Se puede proporcionar una pluralidad de agentes terapéuticos al hidrogel. En tales casos, un primer agente terapéutico puede unirse covalentemente al hidrogel, y un segundo, tercer, etc. agente terapéutico puede absorberse físicamente. A diferencia del agente antimicrobiano, no es necesario que el al menos un agente terapéutico esté inmovilizado sobre o dentro del hidrogel, sino que puede libremente lixiviarse sustancialmente de la superficie.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- El hidrogel antimicrobiano no se adhiere ni se pega a superficies biológicas como la piel o el lecho de una herida. Esto conduce a un rendimiento mejorado en una variedad de aplicaciones. Un artículo para el cuidado de heridas, como un apósito para heridas, debe ser blando y poder absorber el exceso de exudado de la herida, con el fin de contener la infección y evitar que el entorno de la herida albergue microbios. El hidrogel antimicrobiano se puede utilizar como apósito para heridas para absorber los exudados incontrolables liberados por una piel comprometida. Los exudados de las heridas pueden contener pus, sangre, agua y sudor. Debido a las altas y versátiles propiedades de absorción del hidrogel antimicrobiano en combinación con las propiedades antimicrobianas, es especialmente adecuado como artículo para el cuidado de heridas. El hidrogel antimicrobiano absorbe sustancialmente la misma cantidad de agua en comparación con un hidrogel que comprende un componente anfílico, pero sin un agente antimicrobiano ligado covalentemente al mismo. Por lo tanto, el hidrogel antimicrobiano tiene suficiente capacidad de absorción del exudado de la herida, incluso cuando comprende un agente antimicrobiano. Además, la anfílisis del hidrogel antimicrobiano permite que el material absorba sustancias tanto hidrófobas como hidrófilas, tales como las toxinas bacterianas liberadas por las bacterias moribundas.
- El hidrogel anfílico antimicrobiano se puede preparar como una dispersión de partículas en un medio continuo, ya que las partículas pueden estar presentes como una suspensión de partículas en una solución. El hidrogel anfílico reticulado sólido se puede procesar mediante trituración o similares, para obtener una colección de partículas de hidrogel anfílico. Las partículas pueden tener un diámetro de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 0,5 mm. Como las partículas pueden formarse, por ejemplo, mediante un proceso de trituración, no es necesario que sean partículas esféricas regulares, sino que pueden ser irregulares. Las partículas que sean más pequeñas que el rango identificado anteriormente, también pueden obtenerse mediante otros métodos de producción. Por ejemplo, es posible obtener partículas en el rango de tamaño de 10 nm a 1 µm de diámetro, mediante un método de dispersión, tal como mediante sonicación.
- Un proceso adicional para obtener las partículas es dispersar primero el polímero no reticulado en una solución, antes de la reticulación. Por ejemplo, el polímero anfílico no reticulado se puede proporcionar a una solución, p. ej., agua que forme un LLC. El hidrogel LLC formado en el agua, puede entonces dispersarse rápidamente en una solución, p. ej., mediante mezcla con palas y, posteriormente, reticularse por UV. En resumen, el tamaño de las partículas puede oscilar de 10 nm a 0,5 mm, en función del proceso utilizado para formar las partículas.
- Las partículas pueden estar presentes en forma seca o pueden hincharse con, por ejemplo, una solución acuosa. Las partículas de hidrogel anfílico pueden funcionalizarse posteriormente con un agente antimicrobiano, tal como un AMP. Como se describió anteriormente, el agente antimicrobiano puede unirse covalentemente a al menos las regiones hidrófilas del hidrogel. El agente antimicrobiano puede ser un agente antimicrobiano anfílico unido a una región tanto hidrófila como hidrófoba del hidrogel. Las partículas de hidrogel anfílico que están funcionalizadas con un agente antimicrobiano, tienen una mayor área superficial y se considera que son, p. ej., agentes antibacterianos más eficaces, ya que pueden exponer una película bacteriana a una mayor parte de agente antimicrobiano que un hidrogel sólido plano.
- Las partículas de hidrogel anfílico pueden dispersarse en una solución tal como una solución acuosa. Por ejemplo, las partículas de hidrogel anfílico pueden dispersarse en una solución salina. Como puede verse en la Figura 5, el rendimiento del hidrogel antimicrobiano ha consistido en seguir teniendo un efecto antimicrobiano tras 10 semanas en PBS. Las partículas de hidrogel anfílico pueden dispersarse en un tampón biocompatible, es decir, un tampón que no sea tóxico para las células. A diferencia de muchos hidrogeles, debido a la anfílisis del hidrogel, las partículas de hidrogel pueden dispersarse en una solución no acuosa, tal como un disolvente no polar, tal como sistemas basados en aceites esenciales y en combinación con alcohol.
- Las partículas de la dispersión están hinchadas, es decir, han absorbido la solución. Sin embargo, a diferencia de otras dispersiones de hidrogel, son realmente una suspensión de partículas de hidrogel discretas en una solución, y no simplemente un hidrogel. Un hidrogel a veces puede describirse en sí mismo como una dispersión o suspensión en sí misma, ya que algunos hidrogeles comprenden partículas discretas que se hinchan y forman en ellas el

hidrogel. En este caso, la composición comprende una pluralidad de partículas de hidrogel reticuladas separadas entre sí, y separadas del medio continuo, p. ej., una solución acuosa.

La solución y las partículas dispersas en una solución se pueden pulverizar. Un dispositivo de pulverización puede comprender un mecanismo de pulverización, tal como una bomba de pulverización manual, y una solución que comprenda una pluralidad de partículas de hidrogel anfífilicas como se describió anteriormente, en donde un agente antimicrobiano, tal como un péptido antimicrobiano, se une covalentemente a las regiones hidrófilas y/o hidrófobas de las partículas.

Un dispositivo de pulverización se muestra esquemáticamente en la Figura 9. El dispositivo comprende una solución 100, por ejemplo, una solución acuosa, tal como una solución salina. El dispositivo comprende, además, una membrana 200 que separa la solución de una pluralidad de partículas 300 de hidrogel antimicrobiano. Antes de un primer uso, un proceso 500 de agitación, tal como agitar el dispositivo, hace que la membrana 200 se desintegre y que las partículas de hidrogel se propaguen en la solución 100, formando una suspensión de partículas 300 de hidrogel. Un dispositivo de este tipo tiene una estabilidad de almacenamiento mejorada, ya que las partículas 300 de hidrogel no se almacenan en suspensión, sino que se mantienen por separado hasta que el dispositivo esté listo para su uso.

La pulverización del hidrogel anfílico tiene ventajas en comparación con la colocación de una pieza sólida de hidrogel sobre una herida. La cobertura se mejora, ya que las partículas pulverizadas pueden cubrir mejor una superficie irregular que un material sólido. Además, el aerosol se puede utilizar para cubrir rápidamente una región 20 de la herida sin que se mantenga en su lugar mediante vendajes adicionales, etc. Por lo tanto, el pulverizador puede ser ideal para su uso como tratamiento de heridas agudas.

La composición pulverizable de partículas de hidrogel anfílico antimicrobiano es además un medio de recubrimiento ideal para dispositivos quirúrgicos o médicos, como un stent, un catéter, un injerto de piel, una lente de contacto, artículos 25 de higiene personal, pañales, un apósito para heridas, un apósito para ostomía, una placa base para ostomía, una película para incisiones, una manta quirúrgica, un parche, un vendaje, una tiritita, un esparadrapo, un adhesivo, una cinta adhesiva, un apósito adhesivo, un esparadrapo adhesivo y un apósito medicinal, o cualquier combinación de los mismos. Un proceso de fabricación o tratamiento para cualquiera de los dispositivos enumerados anteriormente puede comprender una etapa de pulverizar las partículas de hidrogel anfílico antimicrobiano sobre la superficie del dispositivo, y puede incluir tratamientos posteriores, tales como secado, lavado o limpieza. La superficie pulverizada con las partículas puede 30 ser una superficie destinada a entrar en contacto con el cuerpo humano o con los fluidos corporales.

Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que el hidrogel anfílico antimicrobiano puede utilizarse para inducir y/o mejorar la hemostasia de una herida. Por lo tanto, el hidrogel antimicrobiano puede utilizarse para aumentar y/o acelerar la coagulación sanguínea y/o la formación de coágulos sanguíneos en una herida. Como se describe en la sección experimental, y se muestra en la Figura 10, el hidrogel antimicrobiano formó coágulos 35 claramente visibles en comparación con las muestras de control. La aceleración de la hemostasia puede darse en mamíferos, por ejemplo, la hemostasia de la sangre humana, como se muestra en el Experimento 1, puede acelerarse.

Como se describe en la sección de antecedentes, se conoce un hidrogel anfílico antimicrobiano a partir del documento WO 2019/074422 A1. Sin embargo, ese documento no menciona nada con respecto a los usos adicionales del hidrogel anfílico, más allá del tratamiento antimicrobiano de las heridas. No hay ninguna sugerencia de que el hidrogel antimicrobiano pueda utilizarse para acelerar el proceso de hemostasia. Además, no todas las heridas sangran de manera que se produzca la hemostasia. Las heridas, como las quemaduras y las úlceras por presión, no sangran, pero son susceptibles a infecciones bacterianas y otras infecciones microbianas. Esta distinción no parece tenerse en cuenta en el documento de referencia, ya que no se refiere a las heridas sangrantes. Por lo tanto, la aplicación terapéutica conocida del documento WO 2019/074422 A1, es decir, la prevención o el 45 tratamiento de infecciones, no solo es diferente a la mejora o aceleración de la hemostasia, sino que se refiere a una población general de pacientes con heridas, más que a la población objetivo específica de heridas que sangran.

El hidrogel anfílico antimicrobiano puede ser especialmente útil para inducir o acelerar la hemostasia en pacientes con una coagulopatía, es decir, un trastorno hemorrágico en el que la capacidad de coagulación de la sangre esté alterada.

Como se muestra en la Figura 7, la acción hemostática del hidrogel antimicrobiano es, de hecho, una interacción bioquímica con el cuerpo. El hidrogel por sí solo no provocó una reducción significativa ni sustancial en el recuento de plaquetas en la muestra medida.

El hidrogel anfílico antimicrobiano se puede utilizar para inducir simultáneamente la hemostasia e inhibir el crecimiento de bacterias en y/o dentro de una herida. La combinación de las características confirmadas experimentalmente de estabilidad sérica y un efecto hemostático mejorado, hacen del hidrogel anfílico antimicrobiano un apósito ideal para inducir la hemostasia en una herida.

Un método para tratar una herida sangrante puede comprender: colocar sobre una herida sangrante un hidrogel anfílico antimicrobiano según la presente descripción; formando así un coágulo de sangre en la interfaz entre el hidrogel anfílico antimicrobiano y la sangre; y, por lo tanto, limitando o dificultando sustancialmente el crecimiento de bacterias en la herida.

La dispersión pulverizable de partículas de hidrogel anfílico antimicrobiano puede utilizarse idealmente para un tratamiento antimicrobiano y hemostático combinado. Es decir, la dispersión pulverizable es ideal para su uso como una composición combinada antimicrobiana y hemostática para el cuidado de heridas. Como las partículas de hidrogel tienen una cobertura superficial mejorada de formas irregulares, lo cual es común en una herida, se espera que las partículas de hidrogel tengan efectos antimicrobianos y hemostáticos mejorados en comparación con una lámina sustancialmente plana de hidrogel anfílico. Además, el hidrogel no es biodegradable y los agentes antimicrobianos pueden mantener su efecto durante varios días, como se muestra en la Figura 6. Esto es especialmente relevante en un dispositivo para su uso en la hemostasia de una herida sanguínea, en donde el dispositivo estará inherentemente expuesto a una mayor cantidad de contacto con los fluidos corporales que con el tratamiento de una herida no sanguínea.

Los resultados proporcionados en la presente memoria sugieren que un péptido antimicrobiano derivado de una proteína rica en prolina y arginina con repeticiones de leucina en su extremo, PRELP, es sorprendentemente útil en la hemostasia de una herida. Por ejemplo, como se muestra en la sección de resultados, se ha demostrado que RRP9W4 tiene un efecto hemostático. El péptido antimicrobiano derivado de PRELP se puede aplicar a un sustrato.

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente haciendo referencia a realizaciones específicas, no se pretende que se limite a la forma específica expuesta en la presente memoria. Más bien, la invención está limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

En las reivindicaciones, el término “comprende/que comprende” no excluye la presencia de otros elementos o etapas. Además, aunque se pueden incluir características individuales en diferentes reivindicaciones, es posible que estas se combinen ventajosamente, y la inclusión en diferentes reivindicaciones no implica que una combinación de características no sea factible y/o ventajosa. Además, las referencias singulares no excluyen una pluralidad. Los términos “un”, “una”, “primero/a”, “segundo/a”, etc. no excluyen una pluralidad. Los signos de referencia en las reivindicaciones se proporcionan meramente como un ejemplo aclaratorio y no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de las reivindicaciones.

Sección experimental

Los siguientes ejemplos son meros ejemplos y no deben interpretarse en modo alguno como que limitan el alcance de la invención. Más bien, la invención está limitada solo por las reivindicaciones adjuntas.

Experimento 1

Fabricación de hidrogeles anfílicos

Los hidrogeles anfílicos reticulados se prepararon según el método del Experimento 1 en el documento WO 2019/074422 A1 para Pluronic® F127. El esquema de reacción se muestra en la Figura 1. En resumen, se preparó una mezcla de Pluronic F-127 (30 % en peso) y agua (70 % en peso), para formar una fase cristalina líquida cúbica micelar. Se añadió Irgacure 2959 a la mezcla de Pluronic F-127 (2 % en peso) como fotoiniciador. La mezcla se realizó manualmente en viales de vidrio de 20 ml utilizando una espátula hasta que se formó un gel espeso y homogéneo. Los geles se esparcieron sobre portaobjetos de vidrio y se mantuvieron en un recipiente sellado durante la noche para solidificarse en la fase correlativa. A continuación, los geles se polimerizaron por UV (90 W, $\lambda = 252$ nm) durante 10 minutos para formar un hidrogel polimérico flexible con un grosor de 4 a 5 mm. Los geles se cortaron en las formas deseadas y se lavaron en agua Mili-Q durante 48 h para eliminar los subproductos no deseados y obtener su forma completamente hinchada, antes de analizarlos posteriormente y la unión del AMP.

El Pluronic F127 ($EO_{100}PO_{70}EO_{100}$) se funcionalizó químicamente con grupos terminales diacrilato polimerizables, como se muestra en el Experimento 1 del documento WO 2019/074422 A1, y el polímero modificado se utilizó para fabricar hidrogeles F127 reticulados para la modificación del AMP.

Inmovilización de AMP en hidrogeles anfílicos

Los AMP se inmovilizaron covalentemente en los hidrogeles según el método de inmersión descrito en el Experimento 1 en el documento WO 2019/074422 A1. Se preparó un hidrogel anfílico de control sin ningún AMP. El esquema de reacción se muestra en la Figura 2. En resumen, se preparó una solución de péptido antimicrobiano (AMP) RRP9W4N (Red Glead Discovery AB, Lund, Suecia) en agua esterilizada hasta una concentración de 200 μ M. Para la unión covalente del AMP a los hidrogeles, antes de la modificación del AMP, los hidrogeles limpios se sumergieron en una solución de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) mezclados en tampón MES (pH 6) a una concentración final de 2 mg/ml, y se dejaron reaccionar durante 30 minutos con agitación lenta a temperatura ambiente. A continuación, los hidrogeles se lavaron 3 veces en PBS (pH 7,4) y se suspendieron en 1 ml de solución de AMP 200 μ M en agua esterilizada durante 2 horas a temperatura ambiente. Las superficies se lavaron 3 veces con agua esterilizada para eliminar los péptidos sin reaccionar y se utilizaron para todas las pruebas realizadas en este trabajo.

Prueba de coagulación sanguínea

Los tubos Eppendorf para recoger sangre, las puntas de las pipetas y los tubos de lazo para extraer la sangre se heparinizaron para evitar la activación sanguínea no deseada. La heparinización se realizó según el método Corline (Corline Biomedical AB, Uppsala, Suecia), que se realiza mediante un método de ensamblaje capa a capa con incubación alterna con una amina polimérica y un conjugado de heparina, para obtener una capa de heparina de doble recubrimiento.

5 Se recogió sangre fresca de 2 voluntarios sanos en tubos heparinizados que contenían 1 UI/ml de solución de heparina (Leo Pharma A/S, Ballerup, Dinamarca). La sangre se utilizó de manera fresca después del muestreo. Se recogió 1 ml de sangre en un tubo Eppendorf con EDTA 4 mM para utilizarlo como punto de referencia (denominado inicial).

10 Las muestras se acondicionaron añadiendo 1 ml de PBS, y se agitaron a 600 rpm durante 30 minutos antes del experimento. Los hidrogeles (control y modificados con AMP) se colocaron en tubos de muestra Eppendorf. Se añadieron 100 µL de PBS a fin de empapar las muestras. Y, a continuación, se agrega 1 ml de sangre fresca a cada tubo. A continuación, los tubos se hicieron girar verticalmente durante 60 minutos en una incubadora a 37 °C. Como controles en blanco, se añadió 1 ml de sangre a un tubo Eppendorf sin hidrogeles, y se trató en las mismas condiciones. Tras los experimentos, la sangre se recogió cuidadosamente de los tubos y se mezcló con EDTA, dando una concentración final de 4 nM. El número de plaquetas se determinó utilizando un analizador hematológico Sysmex XP-300 (Kobe, Japón) directamente después del experimento. Las muestras se analizaron por duplicado con sangre de cada donante.

20 Resultados y análisis

Una de las características más destacadas de una gestión adecuada de una herida, es controlar el sangrado. La coagulación sanguínea implica la formación de un coágulo de fibrina en presencia de la herida, que puede atrapar las plaquetas y liberar quimiocinas inflamatorias. Esta etapa creará respuestas laterales para activar las respuestas inflamatorias y la posterior cicatrización de la herida. Por lo tanto, investigamos cómo la presencia de AMP en los hidrogeles puede afectar a la coagulación sanguínea. Realizamos un análisis completo de sangre con sangre fresca de 2 donantes diferentes, y cuantificamos el número de plaquetas antes y después de 1 hora de exposición a la sangre. Se observó una formación de coágulos muy visible en el hidrogel de AMP, en comparación con los que no tenían AMP. Como se esperaba de las observaciones, los resultados del recuento de plaquetas (mostrados en la Figura 7) mostraron un número significativamente menor de plaquetas en presencia de AMP. Los sorprendentes resultados sugieren que el uso de hidrogel AMP como parche para heridas puede acelerar la coagulación sanguínea y la formación de coágulos en una herida sangrante. Esto puede considerarse como una propiedad adicional deseada introducida por los hidrogeles AMP, aparte del efecto antibacteriano superior.

35 El efecto de coagulación de la sangre es especialmente sorprendente, ya que RRP9W4N es una proteína rica en prolina y arginina con repeticiones de leucina en su extremo, PRELP, derivada del péptido antimicrobiano, y similar en muchos aspectos a LL-37, mientras que se ha demostrado que LL-37 no afecta a la coagulación plasmática (Harm, S. y col., Blood Compatibility - An Important but Often Forgotten Aspect of the Characterization of Antimicrobial Peptides for Clinical Application, Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 5426; doi: 10.3390/ijms2015426).

40 Experimento 2

Dispersión pulverizable de hidrogel anfifílico

45 Se preparó una formulación pulverizable de hidrogel granulado según el siguiente procedimiento.

Se sintetizó DA-F127 según el Experimento 1 en el documento WO 2019/074422 A1, para el Pluronic® F127; se mezcló DA-F127 con agua con la composición de un 30 % en peso de Pluronic® y un 70 % en peso de agua. Tras mezclar, se añadió el iniciador Irgacure® 2959 (1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propano-1-ona) al gel formado con una cantidad correspondiente al 0,5 % en peso del Pluronic® en el gel. El gel se colocó en una nevera durante al menos dos días. Tras el almacenamiento en frío, el gel se reticuló a 365 nm durante 6 minutos. Los hidrogeles ahora reticulados se lavaron en agua durante al menos dos días.

55 Tras el lavado, los hidrogeles se trituraron con mortero y maja hasta obtener una pasta rugosa. La pasta se colocó luego en agua y se utilizó un dispersor Ultra-Turrax® para obtener un tamaño y una distribución de partículas más finas. La solución obtenida fue entonces estable para que los experimentos se realizaran según convenga.

60 Se obtuvo un peso conocido de las partículas (en su forma hinchada) mediante filtración por succión, y a continuación colocando los gránulos en un tubo Falcon de 15 ml. Normalmente, esto era de alrededor de 2 gramos. Con el fin de activar las partículas, se añadieron al tubo Falcon 10 ml de EDC/NHS recién preparado (2 mg/ml) en tampón MES. El tubo se sonicó durante unos minutos, y a continuación se colocó en una placa de agitación durante 30 minutos. Despues, la solución se filtró por succión y se lavó con agua para separar las partículas y eliminar el exceso de EDC/NHS. A continuación, se pesaron los gránulos para registrar cualquier pérdida, y seguidamente se añadieron 10 ml de AMP 400 µM (disuelto en PBS) a los gránulos. Esto también se sonicó rápidamente, y seguidamente se puso en una placa de agitación durante aproximadamente 2 horas.

65

La solución se filtró de nuevo por succión y se lavó con 30 ml de agua, aunque esta vez la solución de lavado se recuperó a fin de medir la cantidad de péptido que aún quedaba tras la activación. Los gránulos ahora están activados y se pueden pesar y poner en una solución para obtener una concentración conocida para experimentos adicionales.

5 Efecto antibacteriano contra *S. aureus* en placas de agar

Se colocaron 200 mg de tanto los gránulos de control (sin activación) como de los gránulos activados por AMP, en tubos Eppendorf separados (4 por ronda), y se añadieron 180 µl de solución de PBS a cada tubo. A continuación, los tubos se centrifugaron brevemente para introducir todas las partículas en la solución, lo que fue seguido de 10 sonicación en un baño de agua para redistribuir las partículas.

Las placas de agar se esparcieron con un cultivo de *S. aureus* a una concentración de 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias)/ml, y se dejaron secar durante algunos minutos. A continuación, las soluciones de los tubos Eppendorf se colocaron en la parte superior de las placas de agar con una versión de control y una versión activada por AMP en cada placa de agar. La solución se esparció suavemente sobre las placas de agar para obtener cada 15 vez una dispersión y un grosor relativamente uniformes de las soluciones. Las placas de agar se dejaron abiertas para que se secaran al aire durante algunos minutos hasta que no se observó líquido alrededor de los gránulos, de modo que la solución permaneció en su lugar sobre el agar después de la inversión. A continuación, las placas de agar se incubaron boca abajo durante la noche (~15 horas).

20 Al día siguiente, se realizaron experimentos con la UFC tomando una punción para biopsia en el centro de cada “esparcimiento”, que se colocó en tubos Eppendorf que contenían 1 ml de PBS. Los tubos se agitaron mediante 25 vórtex durante al menos 10 minutos. A continuación, se realizó una dilución en serie de etapas de 10, y 10 µl de gotas de diluciones adecuadas se pusieron en placas de agar y se incubaron durante aproximadamente 15 horas (hasta que las colonias fueron fáciles de contar).

Resultados y análisis

30 La Figura 8 muestra un ejemplo del aspecto de las placas tras la incubación durante la noche. Lo más probable es que la diferencia de color y textura se deba a que hay muchas menos bacterias presentes en/debajo de los gránulos activados por AMP. La diferencia de color visible en el archivo de preconversión. Los dibujos en blanco y negro tal como se publicaron muestran las diferentes texturas. También es fácil ver que las bacterias han crecido en los 35 lugares donde la cobertura era mala para las partículas activadas por AMP, es decir, donde las partículas pulverizables no estaban esparcidas sobre la placa.

35 Tabla 1: Recuento de CFU/ml de los estudios en agar con *S. aureus*. n = 12

Tipo	CFU/ml	Eficiencia de activados por AMP
Control	$2,51 \pm 1,03 \times 10^8$	99,9993 % menos bacterias en activados por AMP en comparación con el control
Activados por AMP	$1,67 \pm 2,42 \times 10^4$	

45 Los resultados de la CFU se presentan en la Tabla 1. Donde la CFU corresponde al número de bacterias en el 1 ml de PBS con el que se lavaron las biopsias. Los resultados muestran claramente una reducción significativa de aproximadamente el 99,993 % cuando se aplican los gránulos activados por AMP, en comparación con los gránulos de control.

50 Las mediciones UV-Vis de los residuos de AMP después del lavado de los gránulos, mostraron que 1,7 gramos de las partículas absorbieron aproximadamente 5,7 mg de péptidos. Esto se compara con 0,07 mg de péptidos para 0,07 g de hidrogel anfífilico formado en lámina sólida. Las partículas absorbieron aproximadamente 3,35 veces más péptido en comparación con el hidrogel sólido en forma sin partículas/granular.

55 Para mostrar la prueba de concepto, las partículas que se disolvieron en PBS se colocaron en una botella pulverizadora mecánica simple, y se pulverizaron sobre una superficie. Las partículas se pudieron pulverizar y cubrieron un área superficial de aproximadamente 25 cm² de una forma rápida y relativamente uniforme. La uniformidad del espesor se inspeccionó visualmente.

Experimento 3

60 Coagulación sanguínea en muestras de hidrogel con diferentes péptidos

Los hidrogeles se funcionalizaron con 4 tipos diferentes de péptidos antimicrobianos (AMP). Los AMP utilizados fueron PGLa, LL-37, Temporin B y RRP9W4. Como control, se utilizaron hidrogeles sin ningún AMP adjunto.

Se adquirió sangre fresca de caballo citratada, en Håtunab AB, Suecia, y se utilizó para demostrar si la presencia de AMP puede inducir la coagulación. En un tubo Eppendorf, se añadió 1 ml de sangre con 0,1 ml de cloruro de calcio 250 mM (para revertir el anticoagulante de citrato) y se mezcló.

5 Las muestras se colocaron en una placa de 24 pocillos y se acondicionaron añadiendo a los hidrogeles 1 ml de PBS. Tras 15 minutos, las muestras se transfirieron a los tubos Eppendorf que contenían la sangre. A continuación, los tubos se colocaron en un agitador y se incubaron durante 60 minutos a 37 °C.

10 Como controles en blanco, se añadió 1 ml de sangre a un tubo Eppendorf sin hidrogeles, y se trató en las mismas condiciones. Tras los experimentos, se recogió cuidadosamente la sangre de los tubos y se sacaron los hidrogeles del tubo con cuidado con una pinza (en este momento se observó algo de coagulación en los lados de las paredes del tubo de ensayo). Los hidrogeles se lavaron tres veces con PBS de lavado para eliminar los coágulos sueltos y otras células sanguíneas, antes de obtener la imagen. Las muestras se analizaron por duplicado.

15 Resultados y análisis

20 Esta prueba se realizó para investigar cómo la presencia de AMP en los hidrogeles afecta a la coagulación sanguínea. Aquí, se realizó un análisis de sangre entera de caballo para ver si se puede formar algún coágulo observable en hidrogeles con diferentes péptidos unidos covalentemente a él. Se observó un gran coágulo visible en los hidrogeles con RRP9W4, mientras que no se observó formación de coágulos en los hidrogeles con los otros AMP (PGLa, LL-37 y Temporin B) y los hidrogeles de control sin ningún AMP.

25 En esta prueba, solo los coágulos que estaban firmemente unidos a las superficies de los hidrogeles se consideraron coágulos inducidos por el contacto entre el hidrogel y la sangre. Otros coágulos formados durante esta prueba se unieron principalmente a las paredes del tubo de ensayo, o se separaron fácilmente de la superficie; véase la tabla siguiente, donde un * indica la formación de un coágulo fijado al hidrogel.

Hidrogeles AMP	Observaciones
RRP9W4*	Gran coágulo con fijación firme a la superficie No se soltó al lavar con PBS y no se puede retirar mecánicamente con una pinza.
PGLa	No se observó ningún coágulo visible.
LL-37	No se observó ningún coágulo visible.
Temporin B	Pequeños coágulos fijados débilmente y eliminados al lavar con PBS.
Control: sin AMP	No se observó ningún coágulo visible.

40 Debido a la naturaleza simple y cualitativa del Experimento 3, los resultados anteriores no se consideran concluyentes. Sin embargo, dado que PGLA, LL-37 y Temporin B, todos los cuales son similares al RRP9W4 en términos de estructura lineal, carga neta e hidrofobicidad, no formaron un coágulo fuerte en la superficie del hidrogel, esto respalda la naturaleza sorprendente del resultado de RRP9W4. En particular, se observó que Temporin B y RRP9W4 tienen la misma longitud (13 aminoácidos) y una hidrofobicidad similar (4,22 kcal/mol y 9,15 kcal/mol, respectivamente), aunque mostraron diferentes resultados de coagulación en el hidrogel. Además, la carga neta de RRP9W4 y LL-37 (+6 y +6, respectivamente) es similar, aunque según los resultados anteriores, LL-37 no mostró ningún efecto de coagulación, mientras que RRP9W4 continuó mostrando un sorprendente efecto de coagulación.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Una composición de hidrogel anfílico antimicrobiano para su uso en la hemostasia de una herida, que comprende:

5 -un primer componente anfílico reticulable, siendo el primer componente anfílico, en su estado químicamente reticulado, un cristal líquido liotrópico y con una nanoestructura ordenada de dominios hidrófobos e hidrófilos, comprendiendo el hidrogel un agente antimicrobiano unido covalentemente a los dominios hidrófilos y/o hidrófobos, en donde el agente antimicrobiano es un péptido antimicrobiano que comprende menos de 20 aminoácidos, y comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con RRPRPRP.

10 2. La composición de hidrogel anfílico antimicrobiano para su uso según la reivindicación 1, en donde el péptido antimicrobiano comprende una secuencia con al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos RRPRPRPRP.

15 3. La composición de hidrogel anfílico antimicrobiano para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el péptido antimicrobiano es RRPRPRPRPW-NH₂.

20 4. La composición de hidrogel anfílico antimicrobiano para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición es una suspensión de partículas de hidrogel anfílico en una solución.

5. La composición de hidrogel anfílico antimicrobiano para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en la hemostasia de una herida en pacientes que padecen una coagulopatía.

25 6. Un péptido antimicrobiano derivado de una proteína rica en prolina y arginina con repeticiones de leucina en su extremo (PRELP) para su uso en la hemostasia de una herida, comprendiendo el péptido antimicrobiano menos de 20 aminoácidos, y comprendiendo una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con RRPRPRPRP.

30 7. El péptido antimicrobiano para su uso según la reivindicación 6, en donde el péptido antimicrobiano comprende una secuencia con al menos un 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos RRPRPRPRP.

8. El péptido antimicrobiano para su uso según las reivindicaciones 6 o 7, en donde el péptido antimicrobiano es RRPRPRPRPRPWWWW-NH₂.

35 9. El péptido antimicrobiano para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el péptido se recubre, se pinta, se pulveriza o se aplica de otro modo a un sustrato, tal como un apósito para heridas, un apósito para ostomía, una placa base para ostomía, una película para incisiones, una manta quirúrgica, un parche, un vendaje, una tiritas, un esparadrapo, un adhesivo, una cinta adhesiva, un apósito adhesivo, un esparadrapo adhesivo, y un apósito medicinal, o cualquier combinación de los mismos.

45

50

55

60

65

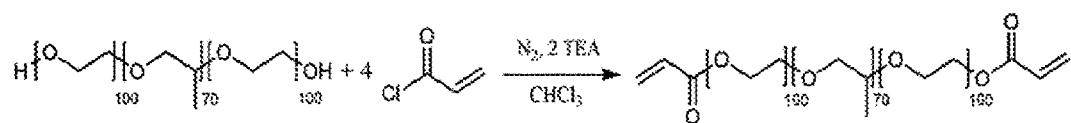


Figura 1

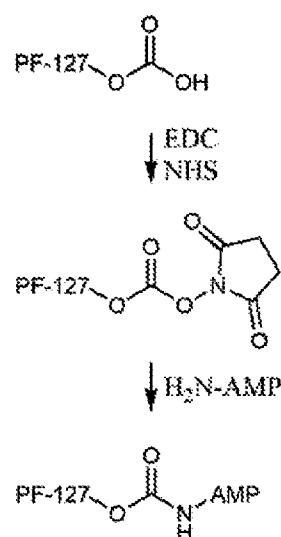


Figura 2

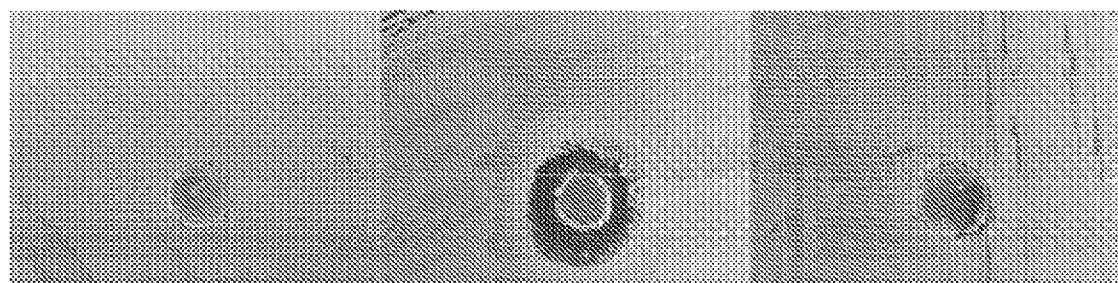


Figura 3A

Figura 3B

Figura 3C

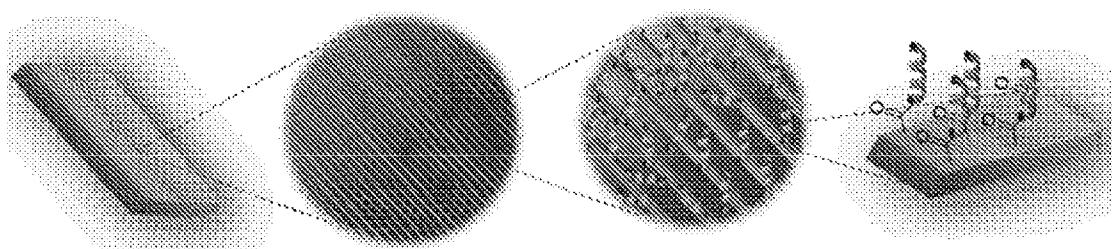


Figura 4

Figura 5A

10 semanas en PBS

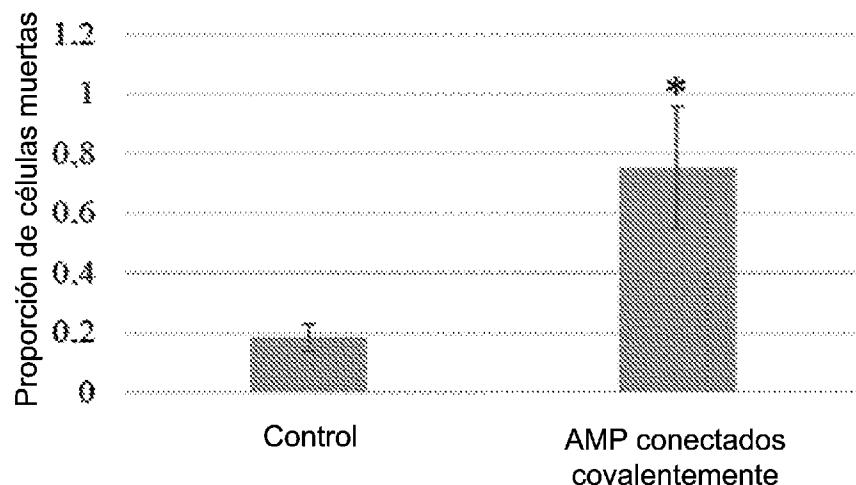
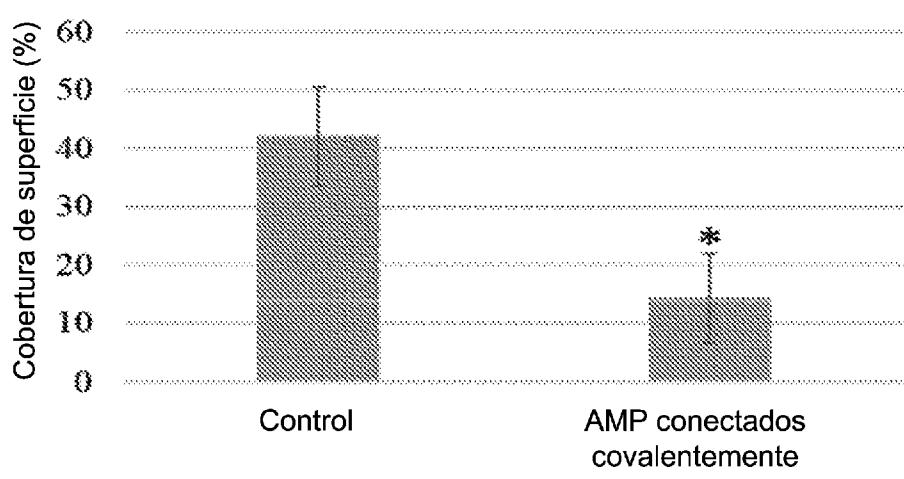


Figura 5B

Superficie cubierta



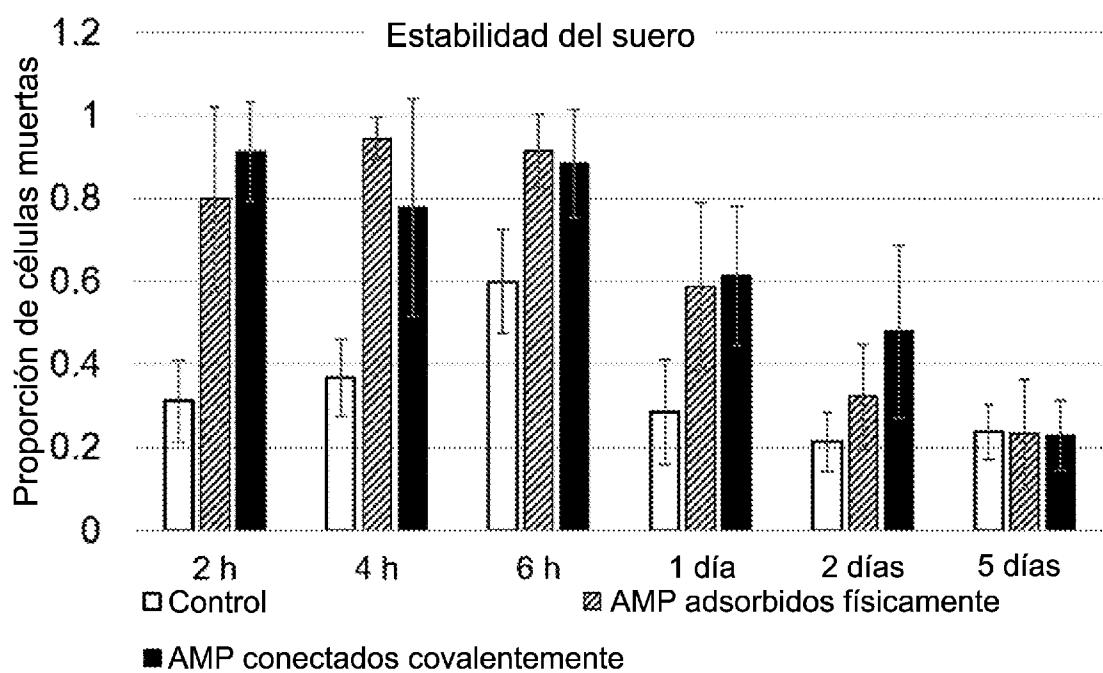


Figura 6

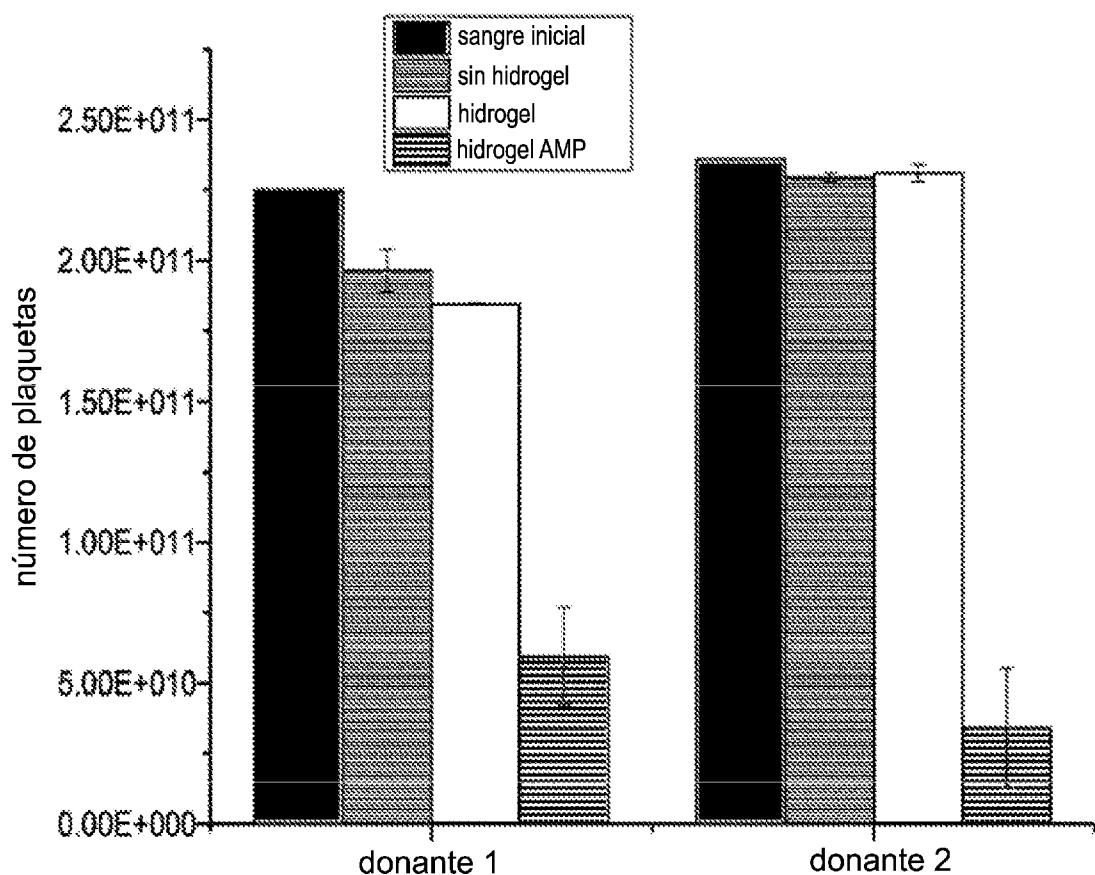


Figura 7

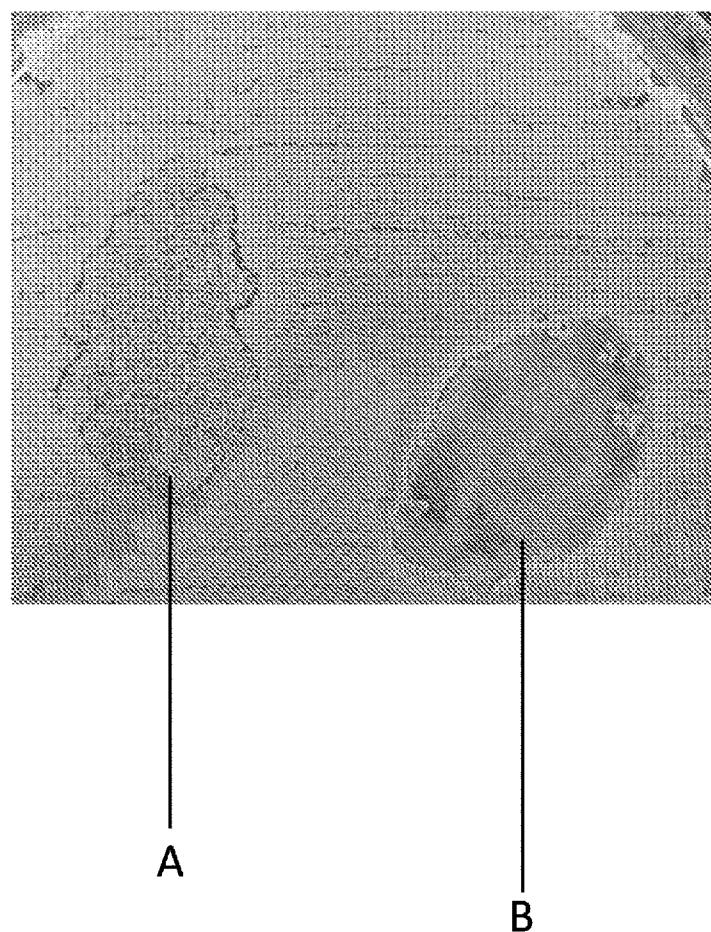


Figura 8

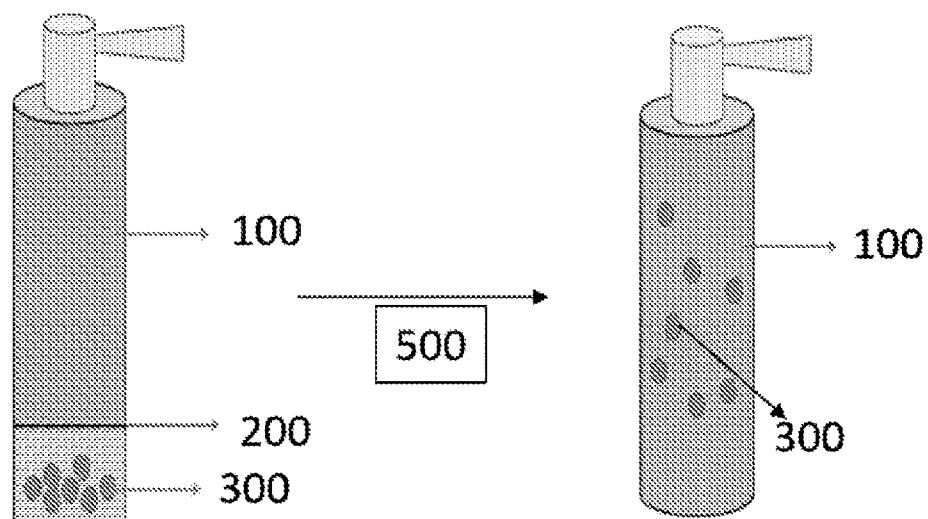


Figura 9

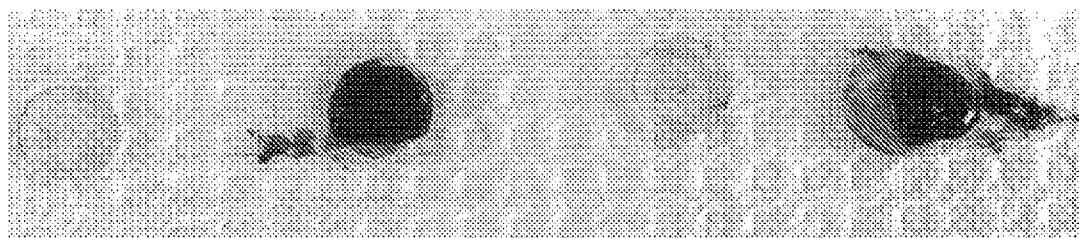


Figura 10