

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 222**

51 Int. Cl.:

C01B 32/182 (2007.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
C01B 32/18 (2007.01)
C01B 32/198 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2019** **PCT/EP2019/069288**
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2020** **WO20016324**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2019** **E 19742032 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.10.2023** **EP 3823928**

54 Título: **Producto de grafeno y usos terapéuticos del mismo**

30 Prioridad:

17.07.2018 EP 18382531

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2024

73 Titular/es:

GRAPHENANO MEDICAL CARE, S.L. (100.0%)
C/ Serrano, 67 - planta 2
28006 Madrid, ES

72 Inventor/es:

MARTÍNEZ ROVIRA, MARTÍN;
MARTÍNEZ ROVIRA, JOSÉ ANTONIO;
LAVÍN LÓPEZ, MARÍA DEL PRADO;
ROMERO IZQUIERDO, AMAYA;
RODRÍGUEZ PUYOL, MANUEL;
RODRÍGUEZ PUYOL, DIEGO;
DE FRUTOS GARCÍA, SERGIO;
GRIERA MERINO, MERCEDES;
HATEM VAQUERO, MARCO ANTONIO y
OROZCO AGUDO, ANA ISABEL

74 Agente/Representante:

PADIMA TEAM, S.L.P.

ES 2 964 222 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

Producto de grafeno y usos terapéuticos del mismo

5 Campo de la invención

La invención se refiere a nuevos productos de grafeno, a sus composiciones y a su uso en terapia.

Antecedentes de la invención

10 La familia de materiales a base de grafeno o relacionados con el grafeno recientemente saltó a la palestra después del Premio Nobel de Física de 2010 y la posterior explosión en el desarrollo de numerosas aplicaciones para estos materiales en los campos de la energía, la electrónica, los sensores, el procesamiento de la luz, la medicina y el medio ambiente. El grafeno, el miembro "fundador" de esta familia, es un material bidimensional elaborado de átomos de carbono con hibridación sp² dispuestos en una red cristalina hexagonal en forma de panal.

15 La familia ampliada de materiales relacionados con el grafeno incluye grafeno (de capa simple o múltiple), grafito, hidrocarburos aromáticos policíclicos, nanotubos de carbono, fullerenos, diversas nanoestructuras de grafeno de diferentes dimensionalidades (por ejemplo, nanofibras de grafeno, nanopartículas de grafeno, puntos cuánticos de grafeno, nanocintas de grafeno, nanomallas de grafeno, nanodiscos de grafeno, espumas de grafeno, nanopilares de grafeno), cualquier combinación de otros materiales relacionados con el grafeno, materiales relacionados con el grafeno sustituidos (por ejemplo, la sustitución de átomos de carbono por N, B, P, S, Si u otros) y materiales relacionados con el grafeno funcionalizados con grupos funcionales reactivos (por ejemplo, grupos carboxilo, ésteres, amidas, tioles, grupos hidroxilo, grupos diol, grupos cetona, grupos sulfonato, grupos carbonilo, grupos arilo, grupos epoxi, grupos fenol, ácidos fosfónicos, grupos amina, porfirina, piridina, polímeros y combinaciones de los mismos).

Varias publicaciones describen el uso de materiales de grafeno para aplicaciones médicas.

30 El documento US2006/0134096 describe composiciones y métodos para uso médico de composiciones que contienen grafeno, en particular carbono no poroso, distinto de fullereno o nanotubos, que comprenden grafeno. Se usan por vía tópica en heridas, como sorbentes de toxinas o en hemodiálisis.

35 El documento EP313353 da a conocer composiciones farmacéuticas basadas en nanoestructuras de grafeno para prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas. La nanoestructura de grafeno inhibe la formación de fibrillas provocada por el mal plegamiento de las proteínas.

40 El documento US2014/0120081 da a conocer el uso de nanomateriales de carbono para tratar el estrés oxidativo en un sujeto reduciendo el nivel de especies reactivas de oxígeno. El nanomaterial de carbono se selecciona de nanotubos, grafeno, nanocintas de grafeno, grafito, óxido de grafito, etc., que pueden estar funcionalizados.

45 El documento GB2532449 describe un nanomaterial funcionalizado para su uso en el tratamiento, la profilaxis o la prevención del cáncer mediante la inhibición de la proliferación de células madre cancerosas, en el que el nanomaterial es grafeno monocapa, grafeno de pocas capas, nanografito, nanotubos de carbono de pared simple o de pared múltiple, fullerenos, nanocuernos de carbono, nanofibras de carbono o nanocarbonos amorfos o parcialmente amorfizados, o mezclas de los mismos. Se prefiere el óxido de grafeno.

50 Guranathan S. y Kim J-H. en International Journal of Nanomedicine, 2016:11, páginas 1927-1945 revisan la síntesis, la toxicidad, la biocompatibilidad y las aplicaciones biomédicas del grafeno y de materiales relacionados con el grafeno. Tal como se comenta en este documento, muchos de estos productos todavía presentan problemas de toxicidad asociada y biocompatibilidad. El efecto tóxico del grafeno puede verse influenciado por propiedades fisicoquímicas tales como el tamaño y la distribución, la carga superficial, el área de superficie, el número de capas, las dimensiones laterales, la química de la superficie, la pureza, el estado de las partículas, los grupos funcionales de la superficie y la forma. Entre las aplicaciones biomédicas mencionadas en esta revisión se encuentran la terapia contra el cáncer, la terapia fototérmica, la administración de fármacos, la transfección génica, la biodetección, la obtención de imágenes y la ingeniería de tejidos.

55 Todavía existe la necesidad de nuevos materiales a base de grafeno con baja o nula toxicidad, buena biocompatibilidad y que puedan proporcionar un efecto biológico útil y aplicaciones en terapia.

Breve descripción de la invención

60 Ahora se han encontrado nuevos productos de grafeno que tienen propiedades notables, con una toxicidad muy baja o nula y que son útiles en terapia.

65 En un primer aspecto, la invención se refiere a un nanomaterial de grafeno seleccionado de nanofibras de grafeno,

en el que el nanomaterial de grafeno tiene una distribución de tamaño de partícula que tiene un $dn(90)$ de $0,60\ \mu\text{m}$ o más pequeño en número de partículas y un $dv(90)$ de $80,00\ \mu\text{m}$ o más pequeño en volumen de partículas, tal como se mide mediante un analizador de partículas por difracción láser.

- 5 Preferiblemente, el área de superficie específica BET del nanomaterial de grafeno está comprendida entre 100 y $500\ \text{m}^2/\text{g}$, más preferiblemente entre 300 - $350\ \text{m}^2/\text{g}$.

En otra realización, el volumen de poros del nanomaterial de grafeno está entre $0,35$ - $0,40\ \text{cm}^3/\text{g}$.

- 10 También se prefiere que las impurezas en el nanomaterial de grafeno sean de menos del $0,01\ \%$ en peso.

En otro aspecto, la invención se refiere a un nanomaterial de grafeno tal como se definió anteriormente para su uso como medicamento. En una realización, el medicamento es para el tratamiento de heridas, eccema, psoriasis, cicatrices, úlceras y otras afecciones que dan como resultado una alteración de la integridad de la piel.

- 15 En otro aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el nanomaterial de grafeno definido anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso del nanomaterial de grafeno definido anteriormente en terapia.

20

Figuras

Figura 1.- Espectroscopia Raman de GMC-1.

- 25 Figura 2.- Adsorción - desorción en N_2 de GMC-1.

Figura 3A.- Difracción de rayos X de materia prima de las GNF.

Figura 3B.- Difracción de rayos X de GMC-1.

30

Figura 4A.- Comparación de la distribución de tamaño de partícula en número de partículas para la materia prima de las GNF y GMC-1.

- 35 Figura 4B.- Comparación de la distribución de tamaño de partícula según el porcentaje de partículas en volumen de partículas para la materia prima de las GNF y GMC-1.

Figura 5.- Ensayos de toxicidad en células Hep-G2 cultivadas tratadas durante 24 horas con GMC-1. A) Viabilidad determinada por exclusión celular con azul de tripano y B) metabolismo celular determinado por MTT con vehículo de concentración $1\times$ y $10\times$ de GMC-1. Los valores se representan como media \pm EEM.

40

Figura 6.- Modelo de roedor de cicatrización de heridas dérmicas (*Rattus norvegicus*), basado en biopsias realizadas en la zona dorsal, tratadas por vía tópica cada 2 días con una formulación que incluye $2\times$ GMC-1 o no (CT). A) Evolución temporal del cierre del área de la herida, B) regeneración dérmica (colagenización y reepitelización) y C) infiltrado inflamatorio agudo al 4º día. Los valores se expresan en porcentaje frente a la herida de control interna por animal (no tratado con ninguna formulación) y se representan como media \pm EEM. $*$ = $P < 0,05$ frente a CT, valor considerado estadísticamente significativo.

45

Figura 7.- Análisis bioquímico sistémico de un modelo de roedor de cicatrización de heridas dérmicas (*Rattus norvegicus*), basado en biopsias realizadas en la zona dorsal, tratadas por vía tópica cada 2 días con una formulación que incluye $2\times$ GMC-1 o no (CT). Al 4º día y después del sacrificio, se determinaron A) creatinina, B) aspartato aminotransferasa (AST) y C) wrCRP (proteína C reactiva de amplio intervalo) en plasma. D) En células mononucleares de sangre periférica (PBMC), el cambio en veces de la expresión del ARNm se determinó mediante RT-qPCR para la expresión del marcador inflamatorio sistémico interleucina 1-beta (IL-1-beta). Los valores se representan como media \pm EEM.

50

Descripción detallada de la invención

Materias primas de grafeno

- 60 En la presente invención, el término "grafeno" se refiere a un material que forma una molécula aromática policíclica con múltiples átomos de carbono unidos covalentemente entre sí. Los átomos de carbono unidos covalentemente forman un anillo de seis miembros como unidad de repetición.

- 65 El término "nanofibras de grafeno" (GNF) se refiere a nanoestructuras cilíndricas con capas de grafeno dispuestas como conos, copas o placas apilados. La superficie plana del grafeno está inclinada desde el eje de la fibra, lo que expone los bordes planos presentes en las superficies interior y exterior de las nanofibras de carbono.

El producto de la invención es un nanomaterial a base de carbono derivado a partir de GNF que se somete a una serie de purificaciones y tratamientos para obtener un material de calidad médica que tiene propiedades biológicas inesperadas.

El nanomaterial de carbono de partida es un material a base de grafeno (nanofibras de grafeno). En una realización, las nanofibras de grafeno usadas para preparar el producto de la invención tienen una distribución de tamaño de partícula $dn(90)$ de 4,0 μm o más pequeño para el número de partículas y un $dv(90)$ de 105,00 μm o más pequeño para el volumen de partículas. Preferiblemente tienen un área de superficie de aproximadamente 250-400 m^2/g .

Las materias primas usadas para obtener el producto de la invención pueden sintetizarse siguiendo una amplia variedad de métodos, tales como crecimiento epitaxial sobre carburo de silicio, deposición química en fase de vapor, exfoliación micromecánica o mecánica de grafito, oxidación química de grafito, reducción de óxido de grafito usando reducción térmica, química o multietapa, descomposición por catálisis de hidrocarburos sobre catalizador metálico, desenrollado de nanotubos de carbono, electrohilado, etc.

El crecimiento epitaxial sobre carburo de silicio es un método en el que pueden sintetizarse monocapas aisladas a partir de grafeno sobre un cristal de carburo de silicio (SiC) monocristalino, que se usa como sustrato. Este método consiste en calentar obleas de SiC hasta altas temperaturas ($>1100\text{ }^\circ\text{C}$) y alto vacío. En las condiciones mencionadas, los átomos de silicio se subliman obteniendo el crecimiento epitaxial del grafeno en su superficie (los átomos de carbono se reordenan formando grafeno) [Sutter, P., Epitaxial Graphene: How silicon leaves the scene. *Nature Materials*, 2009. 8(3): págs. 171-172].

En el método de descomposición química en fase de vapor, una fuente de carbono se desintegra catalíticamente sobre un sustrato catalítico. La superficie catalítica provoca, después de la descomposición térmica de los hidrocarburos, la disolución de los átomos de carbono generados en el interior del metal [Jacobberger, R.M., *et al.*, Simple Graphene Synthesis via Chemical Vapor Deposition. *Journal of Chemical Education*, 2015. 92(11): págs. 1903-1907, Lavin-Lopez, M.P., *et al.*, Thickness control of graphene deposited over polycrystalline nickel. *New Journal of Chemistry*, 2015. 39(6): págs. 4414-4423].

La exfoliación micromecánica del grafito consiste en la separación de la capa más externa de dicho sólido en escamas mediante un raspado fino, usando un objeto de superficie sólida o cinta adhesiva [Geim, A.K. y K.S. Novoselov, The rise of graphene. *Nature Materials*, 2007. 6(3): págs. 183-191]. La exfoliación mecánica permite separar las láminas que forman el grafito suspendido en disolventes orgánicos o acuosos mediante ondas de ultrasonidos. El material obtenido es de gran calidad, sin embargo, no presenta gran interés industrial dado su bajo rendimiento y su elevado coste de producción [Lotya, M., *et al.*, Liquid phase production of graphene by exfoliation of graphite in surfactant/water solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 2009. 131 (10): págs. 3611-3620].

También puede usarse una amplia variedad de métodos para sintetizar nanofibras de grafeno (GNF), que son especialmente preferidos para preparar el producto de la invención. Por ejemplo, el método de deposición química en fase de vapor para nanofibras de carbono es un método catalítico en el que una fuente carbonosa se descompone en presencia de un catalizador para generar GNF. Como catalizador se usan partículas catalíticas de metales de transición tales como hierro, níquel, cobalto y cobre. El procedimiento de CVD se lleva a cabo a temperaturas que oscilan entre 500 y 1200 $^\circ\text{C}$ [Martin-Gullon, I., *et al.*, Differences between carbon nanofibers produced using Fe and Ni catalysts in a floating catalyst reactor. *Carbon*, 2006. 44(8): págs. 572-1580]. El electrohilado es un método de producción alternativo de GNF. En este método se usa el procedimiento sol-gel necesitando una aguja con punta fina. Para ello, se aplica un alto voltaje a la gota de la aguja, haciendo que la disolución salga de la aguja hacia un objetivo. Cuando la tensión superficial es lo suficientemente alta para la disolución, se evita que entre una gota fina, puede extraerse una estructura fibrosa y recogerla en el objetivo [Zhang, L., *et al.*, A review: Carbon nanofibers from electrospun polyacrylonitrile and their applications. *Journal of Materials Science*, 2014. 49(2): págs. 463-480].

Los diámetros y las longitudes promedio del material grafitico poroso que se usan para preparar el material compuesto de la invención se miden mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Purificación y tratamiento

Un nanomaterial de grafeno sintetizado siguiendo los métodos notificados anteriormente se usa como materia prima para sintetizar el material de calidad médica a base de grafeno de la invención. Luego, el nanomaterial de grafeno en bruto se somete a un procedimiento de purificación, preferiblemente usando un ácido fuerte (H_2SO_4 , HCl , HF , HNO_3 , HBr , etc.), para retirar cualquier metal o impureza introducido en la estructura del nanomaterial de grafeno durante el procedimiento de síntesis. Puede usarse cualquier procedimiento que pueda retirar impurezas sin afectar a las propiedades del material de grafeno. Entre los ácidos, se prefieren especialmente el ácido clorhídrico o fluorhídrico, pero el experto seleccionará el ácido y las condiciones dependiendo de la cantidad y el tipo de impurezas presentes. El procedimiento de purificación se realiza preferiblemente a bajas temperaturas (20-50 $^\circ\text{C}$) durante varias horas (12-24 horas). Si se usa una disolución para el procedimiento de purificación, el nanomaterial

de grafeno purificado puede lavarse entonces con agua Millipore hasta un pH neutro y luego secarse, por ejemplo, secarse a vacío.

El nanomaterial de grafeno purificado también se trata para lograr una distribución de tamaño de partícula reducida, lo que hace que el producto sea adecuado para usos médicos y cosméticos. El nanomaterial de grafeno purificado se somete, por ejemplo, a un procedimiento para reducir su tamaño y modificar sus propiedades. En una realización, se somete a un procedimiento de exfoliación a temperatura ambiente, por ejemplo, a través de ultrasonidos, molienda en húmedo o procedimientos híbridos. Se prefieren especialmente los ultrasonidos debido a la simplicidad del procedimiento, que además puede monitorizarse a través de muestras para verificar si se logra la distribución de tamaño de partícula deseada. Posteriormente, se lleva a cabo un procedimiento de delimitación opcional para controlar el tamaño de partícula entre 10-100 μm . El experto determinará fácilmente la técnica requerida para seleccionar la distribución de tamaño de partícula. Por ejemplo, esta etapa puede lograrse mediante filtración o centrifugación, preferiblemente filtración a vacío, por ejemplo, a través de un filtro de vidrio sinterizado. Dicha etapa de delimitación puede conducir ventajosamente a partículas que tienen un $\text{dn}(90)$ de 0,60 μm o más pequeño en número de partículas y un $\text{dv}(90)$ de 80,00 μm o más pequeño en volumen de partículas.

Finalmente, para controlar que el material de calidad no arrastre trazas de otros compuestos tóxicos, incluyendo contaminación bacteriológica o endotoxinas, y para mantener las condiciones de asepsia y esterilidad, el material también puede someterse a un procedimiento convencional de despirogenización por calor, preferiblemente a 200-500 $^{\circ}\text{C}$ durante 10-60 min.

La distribución de tamaño de partícula resultante puede determinarse mediante medios habituales en el campo, tales como un analizador de tamaño de partícula, por ejemplo, un dispositivo Mastersizer 2000 de Malvern Pananalytical tal como se usa en los ejemplos.

Por tanto, un objeto adicional de la invención es un método para preparar el producto de la invención a partir de nanofibras de grafeno en bruto, que comprende las siguientes etapas:

a) purificar el material de grafeno en bruto, preferiblemente usando un ácido fuerte, para retirar cualquier metal o impureza presente en el material de grafeno en bruto,

b) reducir el tamaño de partícula del nanomaterial de grafeno purificado, preferiblemente a través de un procedimiento de exfoliación, a una distribución de tamaño de partícula que tiene un $\text{dn}(90)$ de 0,60 μm o más pequeño en número de partículas y un $\text{dv}(90)$ de 80,00 μm o más pequeño en volumen de partículas, tal como se mide mediante un analizador de partículas por difracción láser,

c) opcionalmente someter el producto obtenido a un procedimiento de despirogenización.

La etapa (b) puede comprender además la etapa de delimitar las partículas según el tamaño de partícula antes de la etapa (c). En una realización, la etapa de delimitación se logra mediante filtración o centrifugación, preferiblemente filtración a vacío.

En el contexto de la presente invención, puede obtenerse una distribución de tamaño de partícula que tiene un $\text{dn}(90)$ de 0,60 μm o más pequeño en número de partículas y un $\text{dv}(90)$ de 80,00 μm o más pequeño en volumen de partículas tras la etapa (b), incluyendo la etapa de delimitación adicional, de manera opcional y preferible, una etapa de filtración. Preferiblemente, la filtración es filtración a vacío con un filtro de vidrio sinterizado con un tamaño de poro comprendido entre 1 y 20 μm , preferiblemente entre 4 y 20 μm , más preferiblemente entre 5 y 16 μm .

Producto

El producto de la invención es un nanomaterial de grafeno purificado con una distribución de tamaño de partícula que tiene un $\text{dn}(90)$ de alrededor de 0,60 μm o más pequeño en número de partículas y un $\text{dv}(90)$ de 80,00 μm o más pequeño, preferiblemente 70,00 μm o más pequeño, en volumen de partículas.

La distribución de tamaño de partícula se mide mediante un analizador de tamaño de partícula por difracción láser. Una distribución de tamaño de partícula D50 es el valor del diámetro de partícula al 50 % en la distribución acumulativa. Si D50 tiene un valor determinado, entonces el 50 % de las partículas en la muestra son más grandes que este valor y el 50 % son más pequeñas. La distribución de tamaño de partícula es el número de partículas que se encuentran en cada uno de los distintos intervalos de tamaño dado como porcentaje del número total de todos los tamaños en la muestra de interés. El método más ampliamente usado para describir las distribuciones de tamaño de partícula son los valores d (d_{10} , d_{50} y d_{90}), que son las intersecciones para el 10 %, el 50 % y el 90 % de la masa acumulada.

Estos valores pueden considerarse como el diámetro del material que divide la masa de las muestras en un porcentaje específico cuando las partículas se organizan en forma ascendente. El d_{10} es el diámetro en el que el

10 % de la masa de la muestra está compuesto por partículas con un diámetro menor que este valor. El d50 es el diámetro de partícula en el que el 50 % de la masa de una muestra es más pequeño y el 50 % de la masa de una muestra es más grande. El d90 es el diámetro en el que el 90 % de la masa de una muestra está compuesto de partículas con un diámetro menor que este valor. Estos valores pueden aplicarse para el número de partículas (dn) y el volumen de partículas (dv).

Una distribución que tiene un dn(90) en número de partículas significa el punto en la distribución de tamaño hasta el cual e inclusive está contenido el 90 % del número total de material en la muestra.

Una distribución que tiene un dv(90) en volumen de partículas significa el punto en la distribución de tamaño hasta el cual e inclusive está contenido el 90 % del volumen total de material en la muestra.

La distribución de tamaño de partícula del producto de la invención se mide con un dispositivo Mastersizer 3000 de Malvern Panalytical.

En el contexto de la presente invención, el término “área de superficie específica (SSA)” se refiere al área de superficie total de un material por unidad de masa.

Las propiedades de porosidad y área de superficie específica descritas en la presente solicitud se miden usando métodos de Brunauer-Emmett-Teller (“BET”), aplicados en una técnica de adsorción física usando nitrógeno como material adsorbente, que es bien conocida por el experto en la técnica.

En una realización de la invención, el área de superficie BET del producto de la invención está entre 300-350 m²/g.

En otra realización, el volumen de poros del producto de la invención está entre 0,35-0,40 cm³/g.

En una realización preferida, el producto de la invención tiene un área de superficie BET entre 300-350 m²/g y un volumen de poros entre 0,35-0,40 cm³/g.

El producto de la invención se presenta en forma de nanofibras de grafeno.

Composición

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el producto de grafeno de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

“Composición farmacéutica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a composiciones y entidades moleculares que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o una reacción desfavorable similar como trastornos gástricos, mareos y similares, cuando se administra a un ser humano o un animal. Preferiblemente, el término “farmacéuticamente aceptable” significa que está aprobado por una agencia reguladora de un gobierno estatal o federal y/o está incluido en la Farmacopea Europea, de EE.UU. y/u otras farmacopeas generalmente reconocidas para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

El término “excipiente” se refiere a un vehículo, diluyente o adyuvante que se administra con el principio activo. Tales excipientes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención es adecuada para administración tópica en la piel, tal como, por ejemplo, cremas, lociones, pomadas, microemulsiones, pomadas grasas, geles, emulsiones-geles, pastas, espumas, tinturas, disoluciones, parches, vendajes y sistemas terapéuticos transdérmicos. Los más preferidos son las cremas o las emulsiones-geles.

Las cremas o lociones son emulsiones de aceite en agua. Como bases oleosas pueden usarse alcoholes grasos, especialmente los que contienen desde 12 hasta 18 átomos de carbono, por ejemplo, alcohol laurílico, cetílico o estearílico, ácidos grasos, especialmente los que contienen desde 10 hasta 18 átomos de carbono, por ejemplo, ácido palmítico o esteárico, ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, tricaprilocaprato de glicerilo (aceite neutro) o palmitato de cetilo, ceras líquidas a sólidas, por ejemplo, miristato de isopropilo, cera de lana o cera de abejas, y/o hidrocarburos, especialmente sustancias líquidas, semisólidas o sólidas o mezclas de las mismas, por ejemplo, vaselina (petrolato, Vaseline) o aceite de parafina. Emulsionantes adecuados son sustancias tensioactivas con propiedades predominantemente hidrófilas, como los correspondientes emulsionantes no iónicos, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de polialcoholes y/o aductos de óxido de etileno de los mismos, en particular ésteres de ácidos grasos correspondientes con (poli)etilenglicol, (poli)propilenglicol o sorbitol, conteniendo la fracción de ácido graso especialmente desde 10 hasta 18 átomos de carbono, especialmente ésteres parciales de ácidos grasos de glicerol o ésteres parciales de ácidos grasos de polihidroxietilensorbitano, tales como ésteres de ácidos grasos de poliglicerol o ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano (Tweens), así como ésteres de ácidos grasos o

éteres de alcoholes grasos de polioxietileno, conteniendo la fracción de alcohol graso especialmente desde 12 hasta 18 átomos de carbono y la fracción de ácido graso especialmente desde 10 hasta 18 átomos de carbono, tales como éster de ácido graso de polihidroxietilenglicerol (por ejemplo, Tagat S), o los correspondientes emulsionantes iónicos, tales como sales de metales alcalinos de sulfatos de alcoholes grasos, teniendo especialmente desde 12 hasta 18 átomos de carbono en la fracción de alcohol graso, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, cetilsulfato de sodio o estearilsulfato de sodio, que se usan habitualmente en presencia de alcoholes grasos, por ejemplo, alcohol cetílico o alcohol estearílico. Los aditivos para la fase acuosa son, entre otros, agentes que evitan que las cremas se sequen, por ejemplo, humectantes, tales como polialcoholes, tales como glicerina, sorbitol, propilenglicol y/o polietilenglicoles, así como conservantes, perfumes, gelificantes, etc.

Las pomadas son emulsiones de agua en aceite que contienen hasta el 70 %, pero preferiblemente desde aproximadamente el 20 % hasta aproximadamente el 50 %, de agua o fase acuosa. Como fase grasa son adecuados especialmente los hidrocarburos, por ejemplo, vaselina, aceite de parafina y/o parafinas duras, que contienen preferiblemente compuestos hidroxilados adecuados, tales como alcoholes grasos o ésteres de los mismos, por ejemplo, alcohol cetílico, o cera de lana o cera de abejas, para mejorar la capacidad de retención de agua. Los emulsionantes son sustancias lipófilas correspondientes, por ejemplo, del tipo indicado anteriormente, tales como, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de sorbitano (Spans), por ejemplo, oleato de sorbitano y/o isoestearato de sorbitano. Los aditivos para la fase acuosa son, entre otros, humectantes, tales como polialcoholes, por ejemplo, glicerina, propilenglicol, sorbitol y/o polietilenglicol, así como conservantes, perfumes, etc.

Las microemulsiones son sistemas isotrópicos basados en los cuatro componentes siguientes: agua, un tensioactivo, por ejemplo, un surfactante, un lípido, tal como un aceite polar o apolar, por ejemplo, aceite de parafina, aceites naturales tales como el aceite de oliva o de maíz, y un alcohol o polialcohol que contiene grupos lipófilos, por ejemplo, 2-octildodecanol o glicerol etoxalado o ésteres de poliglicerol. Si se desea, pueden añadirse otros aditivos a las microemulsiones. Las microemulsiones tienen micelas o partículas con tamaños inferiores a 200 nm y son sistemas transparentes o translúcidos, se forman espontáneamente y son estables. Las pomadas grasas carecen de agua y contienen como base especialmente hidrocarburos, por ejemplo, parafina, vaselina y/o parafinas líquidas, también grasas naturales o parcialmente sintéticas, tales como ésteres de ácidos grasos de glicerol, por ejemplo, triglicéridos de ácidos grasos de coco, o preferiblemente aceites endurecidos, por ejemplo, aceite de cacahuete hidrogenado, aceite de ricino o ceras, también ésteres parciales de ácidos grasos de glicerol, por ejemplo, mono y diestearato de glicerol, así como, por ejemplo, alcoholes grasos que aumentan la capacidad de absorción de agua, emulsionantes y/o aditivos mencionados en relación con las pomadas.

En relación con los geles, se distingue entre geles acuosos, geles que carecen de agua y geles con un bajo contenido de agua, que consisten en materiales gelificantes hinchables. Se usan hidrogeles especialmente transparentes basados en macromoléculas inorgánicas u orgánicas. Los componentes inorgánicos de alto peso molecular con propiedades gelificantes son predominantemente silicatos que contienen agua, tales como, por ejemplo, silicatos de aluminio, por ejemplo, bentonita, silicatos de magnesio y aluminio, por ejemplo, Veegum, o ácido silícico coloidal, por ejemplo, Aerosil. Como sustancias orgánicas de alto peso molecular se usan, por ejemplo, macromoléculas naturales, semisintéticas o sintéticas. Los polímeros naturales y semisintéticos se derivan, por ejemplo, de polisacáridos que contienen una gran variedad de componentes de hidratos de carbono, tales como celulosas, almidones, tragacanto, goma arábiga y agar-agar, y gelatina, ácido alginico y sales del mismo, por ejemplo, alginato de sodio, y derivados de los mismos, tales como alquilcelulosas inferiores, por ejemplo, metil o etilcelulosa, carboxi o hidroxi(alquil inferior)celulosas, por ejemplo carboximetil o hidroxietilcelulosa. Los componentes de macromoléculas gelificantes sintéticas son, por ejemplo, compuestos alifáticos insaturados adecuadamente sustituidos, tales como alcohol vinílico, vinilpirrolidina, ácido acrílico o metacrílico.

Las emulsiones-geles, también llamadas "emulgeles", representan composiciones tópicas que combinan las propiedades de un gel con las de una emulsión de aceite en agua. A diferencia de los geles, contienen una fase lipídica que, gracias a sus propiedades regeneradoras de grasa, permite masajear la formulación y, al mismo tiempo, experimentar la absorción directa en la piel como una propiedad agradable. Además, puede observarse una mayor solubilidad de los principios activos lipófilos. Una ventaja de las emulsiones-geles con respecto a las emulsiones de aceite en agua reside en el efecto refrescante mejorado que se produce por el frío debido a la evaporación del componente alcohólico adicional, si está presente.

Las espumas se administran, por ejemplo, desde recipientes presurizados y son emulsiones líquidas de aceite en agua en forma de aerosol; como propulsor se usan hidrocarburos no sustituidos, tales como alcanos, por ejemplo, propano y/o butano. Como fase oleosa se usan, entre otros, hidrocarburos, por ejemplo, aceite de parafina, alcoholes grasos, por ejemplo, alcohol cetílico, ésteres de ácidos grasos, por ejemplo, miristato de isopropilo, y/u otras ceras. Como emulsionantes se usan, entre otros, mezclas de emulsionantes con propiedades predominantemente hidrófilas, tales como ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano (Tweens), y emulsionantes con propiedades predominantemente lipófilas, tales como ésteres de ácidos grasos de sorbitano (Spans). También se añaden aditivos habituales, tales como, por ejemplo, conservantes, etc. Las tinturas y disoluciones tienen generalmente una base etanólica, a la que puede añadirse agua y a la que se añaden, entre otros, polialcoholes, por ejemplo, glicerol, glicoles y/o polietilenglicol, como humectantes para reducir la evaporación, así como sustancias restauradoras de grasa, tales como ésteres de ácidos grasos con polietilenglicoles de bajo peso

molecular, propilenglicol o glicerol, es decir, sustancias lipófilas solubles en la mezcla acuosa, como sustituto de las sustancias grasas eliminadas de la piel por el etanol y, en caso necesario, otros complementos y aditivos. Las tinturas o disoluciones adecuadas también pueden aplicarse en forma de pulverización mediante dispositivos adecuados.

Los sistemas terapéuticos transdérmicos con, en particular, administración local del producto de grafeno de la invención contienen una cantidad eficaz del producto de grafeno opcionalmente junto con un portador. Los portadores útiles comprenden disolventes farmacológicos absorbibles adecuados para ayudar al paso del principio activo a través de la piel. Los sistemas de administración transdérmica tienen, por ejemplo, la forma de un parche que comprende (a) un sustrato (= capa o película de refuerzo), (b) una matriz que contiene el principio activo, opcionalmente portadores y opcionalmente (pero preferiblemente) un adhesivo especial para fijar el sistema a la piel y, normalmente, (c) una lámina protectora (= revestimiento antiadherente). La matriz (b) está presente normalmente como una mezcla de todos los componentes o puede consistir en capas separadas.

Las membranas y matrices que comprenden el producto de grafeno de la invención también son adecuadas para la aplicación tópica del producto, ya sea por sí mismas o como parte de un producto más complejo, tal como un apósito para heridas, un vendaje, etc. Ejemplos de tales membranas o matrices son polímeros naturales tales como polisacáridos (alginatos, quitina, quitosano, heparina, condroitina, carragenano), proteoglicanos y proteínas (colágeno, gelatina, fibrina, queratina, fibroína de seda, membrana de cáscara de huevo); polímeros sintéticos tales como hidrogeles o fibras biomiméticas de matriz extracelular a micro/nanoescala a base de poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(ácido acrílico), poli-E-caprolactona, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, etc.

Todos estos sistemas son bien conocidos por el experto en la técnica. La fabricación de la preparación farmacéutica administrable por vía tópica se realiza de una manera conocida por sí misma, por ejemplo, suspendiendo el producto de grafeno de la invención en la base o, si es necesario, en una porción de la misma.

Las composiciones según la invención también pueden comprender aditivos y adyuvantes convencionales para aplicaciones dermatológicas, tales como conservantes, especialmente ésteres de parabeno como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, o compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, o donadores de formaldehído como imidazonidinilurea, o alcoholes como alcohol bencílico, fenoxietanol, o ácidos como ácido benzoico, ácido sórbico; ácidos o bases usados como excipientes reguladores de pH; antioxidantes, especialmente antioxidantes fenólicos como hidroquinona, tocoferol y derivados de los mismos, así como flavonoides o antioxidantes diversos como ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo; perfumes; cargas tales como caolín o almidón; pigmentos o colorantes; agentes de protección UV; hidratantes, especialmente glicerina, butilenglicol, hexilenglicol, urea, ácido hialurónico o derivados de los mismos; agentes antirradicales libres tales como vitamina E o derivados de la misma; potenciadores de la penetración, especialmente propilenglicol; etanol; isopropanol; dimetilsulfóxido; N-metil-2-pirrolidona; ácidos/alcoholes grasos tales como ácido oleico, alcohol oleílico; terpenos tales como limoneno, mentol, 1-8 cineol; ésteres alquílicos tales como acetato de etilo, acetato de butilo; agentes de emparejamiento iónico tales como ácido salicílico.

Pueden obtenerse detalles adicionales sobre las formulaciones tópicas adecuadas por referencia a libros de texto convencionales tales como Remington "The Science and practice of pharmacy" 22ª edición (2012).

La cantidad del producto de nanomaterial de grafeno de la invención en la formulación puede estar en el intervalo del 0,01 % al 10 % p/p, preferiblemente del 0,01 % al 5 % p/p, más preferiblemente del 0,1 % al 3 % p/p.

Efectos beneficiosos y usos

Tal como resulta evidente por los ejemplos a continuación, el producto de la invención no es tóxico, ni siquiera cuando se aplica por vía tópica, y tiene buena biocompatibilidad.

Además, y sorprendentemente, el producto de la invención ha demostrado ser eficaz en la reparación de la piel y cicatrización de heridas, tal como se muestra en los ejemplos.

Por tanto, el producto de grafeno de la invención y las composiciones que lo contienen son útiles como medicamento en terapia.

Se entiende que el término "terapia" o "terapéutico" significa tratar o prevenir una enfermedad en seres humanos o animales y restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas en seres humanos o animales.

Muchas afecciones pueden comprometer la integridad de la piel y la función dérmica, tales como diabetes mellitus, traumatismos, enfermedades inflamatorias, anomalías metabólicas, trastornos hemorrágicos, enfermedades autoinmunitarias tales como la psoriasis, entre otras. Por tanto, es de suma importancia promover la cicatrización de las lesiones cutáneas, independientemente de la naturaleza del agente causal. Después de una lesión en la piel, el cierre de la herida es impulsado por la formación de nuevo epitelio mediante la proliferación y migración direccional

de diferentes tipos de células, tales como queratinocitos o fibroblastos, hacia los bordes de la herida [Bennet NT *et al.*, Am J Surg 1993;166:74-81.; Wong VW *et al.*, J Biomed Biotechnol. 2011:969618].

El producto de grafeno de la invención ha demostrado ser eficaz en la reparación de heridas en un modelo de rata y ser inofensivo en cuanto a cambios sistémicos de marcadores renales, hepáticos o inflamatorios *in vivo*.

Por tanto, es útil en el tratamiento de cualquier afección que dé como resultado una alteración de la integridad de la piel, tales como heridas, cicatrices, quemaduras, úlceras, psoriasis, cortes o piel de mamíferos traumatizada de otro modo. Tales lesiones pueden estar provocadas por un amplio espectro de acontecimientos y/o pueden estar asociadas con otras enfermedades. Las lesiones que van a tratarse incluyen aquellas asociadas con incisión, laceración, abrasión, ampolla, hematoma, punción, penetración, electricidad, irradiación, química, traumatismo, aplastamiento, mordedura, quemadura, congelamiento, cirugía, cáncer primario o metástasis, tumor benigno, acné, infecciones tales como infecciones bacterianas (que pueden combinarse con infecciones fúngicas o virales o parasitarias), lesiones asociadas con una disminución de la circulación sanguínea, tales como úlceras en las piernas y úlceras en los pies asociadas con insuficiencia venosa o arterial, úlceras de decúbito, escaras o llagas por presión y lesiones asociadas con diabetes mellitus o psoriasis.

Modo de administración

La composición usada en el presente método se aplica preferiblemente por vía tópica.

La dosificación diaria de la formulación tópica que comprende el producto de grafeno de la invención puede depender de diversos factores, tales como el sexo, la edad, el peso y la afección individual del paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1:

PREPARACIÓN DE GMC-1 Y CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA

Materias primas

Las características texturales, el grado de grafitización y las principales propiedades fisicoquímicas y térmicas de las materias primas que pueden usarse para preparar los nanomateriales de grafeno de la invención se presentan en la tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de GNF en bruto

Características	Propiedad	GNF
Textura	Área de superficie (m ² /g)	250-400
Grado de grafitización	DRX: npg ^a (npg de grafito; ≈95)	6-10
	RAMAN: I_D/I_G (I_D/I_G de grafito; ≈0,6) ^b	1,0-1,4
Físicas y químicas	Olor, color y aspecto	Sin olor, polvo negro, esponjoso
	Contenido de sólidos	100 %
	Solubilidad	
	Conductividad térmica (W/mK)	1400-1600
	Temperatura de oxidación (°C)	680
Térmicas	Productos de descomposición/oxidación térmica	Principalmente CO y CO ₂
^a número de planos de grafeno en el cristal (npg = Lc/d); d es el intervalo de interlaminado; Lc es el tamaño promedio del cristal en la muestra, en dirección perpendicular a los planos basales del grafeno. ^b : I_D/I_G : cociente entre las intensidades de las bandas D y G en el espectro RAMAN.		

En el presente ejemplo, se han usado nanofibras de grafeno (GNF) para preparar un material según la invención.

El nanomaterial de carbono a base de grafeno en bruto (GNF) se somete a un procedimiento de purificación usando HF para retirar el metal y las impurezas introducidos en la estructura de las GNF durante el procedimiento de síntesis. El procedimiento de purificación se realiza a bajas temperaturas (20-50 °C) durante varias horas (12-24 horas). Después de eso, el nanomaterial de carbono purificado se seca a vacío y se lava con agua Millipore hasta un pH neutro.

Luego, las GNF purificadas se sometieron a un procedimiento de exfoliación durante varias horas (2-5 h) a temperatura ambiente en una disolución con agua u otros disolventes. Finalmente, el material se sometió a un procedimiento convencional de despirogenización por calor (200-500 °C durante 10-60 min).

5 El producto resultante (GMC-1) se ha caracterizado tal como sigue:

Análisis elemental de GMC-1

10 La principal diferencia entre GMC-1 y las materias primas puede observarse en su análisis elemental (tabla 2). En comparación con las GNF en bruto, el GMC-1 sólo se compone de carbono y oxígeno. No contiene trazas de impurezas que puedan ser perjudiciales para la salud humana, tal como lo confirman los experimentos de toxicología.

15 Tabla 2: Análisis elemental de GNF en bruto y GMC-1

Elemento	GNF	GMC-1
C	80-90	92-95
O	10-15	5-6
Trazas de impurezas (metales, soporte de catalizador, etc.)	0,5-1,5	0,0-0,01

Espectroscopia Raman de GMC-1

20 El espectro Raman de GMC-1 se obtuvo usando un láser de 512 nm. Muestra (figura 1) los picos característicos de los materiales de carbón. Pico D, 1332 cm⁻¹ y pico G, 1580 cm⁻¹. La banda G corresponde a las redes de átomos de carbono, es decir, a la estructura gráfica ideal, mientras que la banda D se debe a la existencia de defectos, tanto en el plano basal como en los bordes. Las nanofibras de grafeno tienen una banda D de gran intensidad, mayor que la banda G. Un pico D grande puede aparecer en materiales gráficos si contienen una gran cantidad de bordes, como es el caso de estas nanofibras. El hecho de que tanto el pico D como el G no tengan un ancho de banda
25 demasiado alto también demuestra la cristalinidad de las nanofibras.

Análisis por absorción-desorción de nitrógeno de GMC-1

30 La base para medir el área de superficie total de un sólido mediante fisisorción de un gas es detectar el número de moléculas de gas necesarias para cubrir la superficie del sólido. Una vez conocida el área ocupada por la molécula, puede estimarse el área de superficie del sólido a partir del número de moléculas de gas absorbidas, que se mide volumétrica o gravimétricamente (Brunauer, Emmett y Teller).

35 El área de superficie total se calculó mediante la ecuación BET multipunto, mientras que el volumen total de poros se determinó mediante la cantidad de vapor adsorbido a una presión relativa $P/P_0 = 0,99$, suponiendo que los poros se llenan posteriormente con adsorbato líquido. El tamaño promedio de los poros, que se supone que es cilíndrico, se estimó a partir del valor del volumen total de poros y el área de superficie, suponiendo que los poros que no se llenaron a presiones relativas inferiores a 1 no contribuyeron al volumen ni al área de superficie de la muestra de
40 poros.

Los análisis de área de superficie, volumen de poros y área de poros se realizaron mediante adsorción-desorción de N₂ a 77 K, usando un modelo QUANTACHROM modelo QUADRASORB SI, con seis puertos de desgasificación y tres puertos de análisis, controlado con un software (QUADRAWIN) que recoge los valores de presión relativa para cada volumen de N₂ dosificado. La figura 2 muestra el área de superficie, el volumen de poros y el tamaño de poros
45 de GMC-1.

Área de superficie BET: 300-350 m²/g

Volumen de poros: 0,35-0,4 cm³/g

50 Tamaño de poro: 5-6 nm

Difracción de rayos X de GMC-1

55 Se realizó un difractograma de rayos X correspondiente a una muestra de GNF (figura 3A). Tal como se observa, presenta un pico en torno a 25,9° que corresponde a la distancia entre planos 002 del grafito, o distancia entre las láminas de grafeno. En el grafito altamente cristalino, la distancia interlaminar es de 0,334 nm. En este caso, las nanofibras tienen una distancia ligeramente mayor, 0,343 nm, lo que es indicativo de que tienen una cristalinidad de corto alcance y son turboestráticas. El tamaño del cristal en la dirección perpendicular al plano 002 (L_c) es de
60 4,64 nm, indicativo del hecho mencionado anteriormente.

La figura 3B muestra el difractograma correspondiente a una muestra del material según la invención GMC-1. Las GNF y GMC-1 presentaron los mismos picos, sin embargo, en GMC-1 estos picos presentaron un valor más bajo de 2θ .

La tabla 3 muestra los parámetros cristalográficos característicos de las GNF y GMC-1:

Espacio interlaminar (d_{002})

Altura de la pila de cristales (L_c)

Tamaño de cristalito en el plano (L_a)

Número de capas de grafeno en el cristal (npg)

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot \sin \theta_1} ; L_c = \frac{k_1 \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos \theta_1} ; L_a(nm) = \frac{k_2 \cdot \lambda}{FWHM \cdot \cos \theta_2} ; npg = \frac{L_c}{d}$$

donde:

λ , longitud de onda de radiación ($\lambda = 0,15404$ nm)

θ_1 , posición del pico de difracción ($^\circ$)

θ_2 , posición del pico de difracción ($^\circ$)

k_1 , factor de forma ($k=0,9$)

k_2 , constante del factor de forma de Warren ($k=1,84$)

FWHM, ancho a media altura del pico de difracción correspondiente (rad)

Tabla 3: Parámetros de difracción de rayos X de las GNF y GMC-1

	L_c (nm)	L_a (nm)	d (nm)	npg
GNF	2,19	2,99	0,341740	6,4
GMC-1	2,08	2,8	0,344338	6,05

Cuando las GNF se transforman en GMC-1, la estructura cristalina del material cambia. De esta manera, se observa en GMC-1 una disminución de la altura de la pila de cristales (L_c), el tamaño del cristalito en el plano (L_a) y el número de capas de grafeno en el cristal (npg) debido al procedimiento de purificación, limpieza y exfoliación al que se ha sometido el material. El espacio interlaminar en GMC-1 aumenta debido al procedimiento de exfoliación experimentado en el material. La altura de la pila de cristales (L_c) y el tamaño de los cristalitos en el plano (L_a) experimentan una disminución debido al procedimiento de purificación y exfoliación.

Distribución de tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula para la materia prima de las GNF y el producto según la invención GMC-1 se midió con un dispositivo Mastersizer 3000 de Malvern Panalytical. El dispositivo Mastersizer 3000 usa la técnica de difracción láser para medir el tamaño de las partículas. Lo hace midiendo la intensidad de la luz dispersada cuando un rayo láser pasa a través de una muestra de partículas dispersas. Luego, estos datos se analizan para calcular el tamaño de las partículas que crearon el patrón de dispersión.

La figura 4A muestra la comparación de la distribución de tamaño de partícula en número de partículas para las GNF y GMC-1.

La figura 4B muestra la comparación de la distribución de tamaño de partícula según el porcentaje de partículas en volumen de partículas para las GNF y GMC-1.

En las figuras pueden observarse los parámetros $d(0,1)$, $d(0,5)$ y $d(0,9)$, d_n se refiere al número de partículas y d_v se refiere al volumen en las partículas.

Para las GNF, el parámetro $d_n(10)$ significa que el 10 % del número de partículas tiene un tamaño de $1,121 \mu m$ o

más pequeño, el parámetro dn(50) significa que el 50 % del número de partículas tiene un tamaño de 1,573 µm o más pequeño y el parámetro dn(90) significa que el 90 % del número de partículas tiene un tamaño de 3,909 µm o más pequeño. Para las GNF, el parámetro dv(10) significa que el 10 % del volumen de la muestra está ocupado por partículas con un tamaño de 19,764 µm o más pequeño, el parámetro dv(50) significa que el 50 % del volumen de la muestra está ocupado por partículas con un tamaño de 57,711 µm o más pequeño y el parámetro dv(90) significa que el 90 % de la muestra está ocupado por partículas con un tamaño de 103,114 µm o más pequeño.

En el caso de GMC-1, el parámetro dn(10) significa que el 10 % del número de partículas tiene un tamaño de 0,313 µm o más pequeño, el parámetro dn(50) significa que el 50 % del número de partículas tiene un tamaño de 0,394 µm o más pequeño y el parámetro dn(90) significa que el 90 % del número de partículas tiene un tamaño de 0,577 µm o más pequeño. Para GMC-1, el parámetro dv(10) significa que el 10 % del volumen de la muestra está ocupado por partículas con un tamaño de 10,549 µm o más pequeño, el parámetro dv(50) significa que el 50 % del volumen de la muestra está ocupado por partículas con un tamaño de 39,693 µm o más pequeño y el parámetro dv(90) significa que el 90 % de la muestra está ocupado por partículas con un tamaño de 69,576 µm o más pequeño.

La comparación de la distribución de tamaño de partícula en número y volumen entre las GNF y GMC-1 muestra que GMC-1 tiene una distribución de tamaño de partícula más baja. En resumen, dn(90) para las GNF tiene un tamaño de 3,909 µm o más pequeño para el número de partículas y un dv(90) de 103,114 µm o más pequeño en volumen de partículas, mientras que dn(90) de GMC-1 tiene un tamaño de 0,577 µm o más pequeño en número de partículas y un dv(90) de 69,576 µm o más pequeño en volumen de partículas. Las figuras 4A y 4B muestran claramente esta reducción en el número y volumen de partículas en GMC-1 en comparación con la materia prima usada (GNF).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Estadística

Los datos mostrados se representan como las medias \pm EEM de un número variable de experimentos.

Se usó la prueba de la t de Student para 2 muestras y se usó un análisis de varianza de 1 ó 2 vías para >2 muestras (ANOVA), con un diseño de datos emparejados o datos independientes, seguido de una prueba de comparaciones múltiples. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Ejemplo 2: ENSAYOS DE TOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES HEP-G2

Se han realizado pruebas con GMC-1 sobre células cultivadas (línea de hepatocitos Hep-G2) usadas en estudios farmacológicos y toxicológicos.

En placas de cultivo de 6 pocillos, se sembraron 300.000 células por pocillo y se hicieron crecer con medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal al 10 % (por defecto, DMEM). Las células se mantuvieron en condiciones de incubadora controladas de 37 °C, el 5 % de CO₂ y humedad. Una vez que alcanzaron la confluencia, se les privó del suero durante 16 horas. El producto se añadió como suspensión, a diferentes concentraciones, manteniendo el mismo volumen final durante 24 horas en las mismas condiciones de mantenimiento controladas. Posteriormente, las células se procesaron y la viabilidad/toxicidad se sometieron a prueba complementariamente mediante dos pruebas indicadas en la norma ISO anteriormente mencionada:

a) exclusión con azul de tripano, que diferencia células vivas/muertas, y

b) actividad metabólica mediante tinción celular con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Los resultados se muestran en la figura 5. Los datos muestran que GMC-1 no es tóxico en la línea celular Hep-G2 cultivada.

Ejemplo 3: CICATRIZACIÓN DE HERIDAS EN MODELO ANIMAL

La cicatrización de heridas cutáneas es un procedimiento regenerativo universal para cerrar la herida y reconstruir la barrera epitelial y el tejido conjuntivo subyacente.

Muchos factores y afecciones sistémicas son agentes causales que comprometen la función dérmica. Después de una lesión en la piel, debe formarse un nuevo epitelio para cerrar la herida.

La cicatrización de heridas incluye la migración, proliferación y diferenciación celulares y la formación de matriz extracelular. Las heridas crónicas tales como las úlceras venosas, de pie diabético o por presión se caracterizan por procesos de cicatrización no resueltos, que incluyen una mayor colonización y/o infección bacterianas, y están provocadas por otras afecciones y enfermedades, tales como diabetes mellitus, traumatismos, enfermedades

inflamatorias, anomalías metabólicas, trastornos hemorrágicos, tabaquismo, inmunodepresión, desnutrición y obesidad.

5 Se realizaron ensayos de regeneración dérmica en un modelo de roedor de cicatrización de heridas. La formulación de GMC-1 se basó en un hidrogel con gelatina como componente excipiente principal [X.J. Yang *et al.*, Polym. Int. 44 (1997) 448-452].

10 El modelo animal usado es *Rattus norvegicus*, macho o hembra, de 3-8 meses de edad (entre 300-500 g de peso corporal al inicio de los experimentos, n=18). Las ratas se dividieron en 2 grupos, tratadas con una formulación que contiene el producto o la misma formulación sin el mismo. Los animales se anestesiaron con isoflurano y se les afeitó la piel dorsal. Después de desinfectar con etanol al 70 %, se crearon heridas con un grosor de 5 en la piel dorsal usando punzones de biopsia dérmica de 4 mm de diámetro. 4 de las heridas se trataron con un parche basado en una formulación que comprende o no GMC-1 (control). La 5ª biopsia se dejó descubierta como control de cierre. La formulación se aplica cada dos días. El cierre de la herida se monitorizó a lo largo del tiempo mediante medición planimétrica, en la que se tomaron fotografías de cada herida, usando una cámara digital (PowerShot Pro1, Canon), a los 0-2 y 4 días después de la lesión. Se analizó el área de la herida (Jimage, NIH). El porcentaje de cierre de la herida en cada momento se obtuvo mediante la siguiente fórmula: $(1 - [\text{tamaño de la herida actual} / \text{tamaño de la herida inicial}]) \times 100$. Este valor es un porcentaje frente al valor de cierre de la 5ª biopsia (control interno del animal).

20 Al 4º día, los animales fueron sacrificados y se extirpó el área de la herida cicatrizada, se fijó en formaldehído neutralizado al 10 % durante 24 h y se incrustó en parafina. Se desparafinaron cortes de tres µm de grosor en xileno y se rehidrataron mediante sucesivas inmersiones en concentraciones descendentes de etanol y se realizaron determinaciones histopatológicas (reepitelización, colagenización e infiltración inflamatoria aguda). La epitelización de cada herida se calificó basándose en las puntuaciones individuales determinadas por el análisis histopatológico comentado anteriormente.

Los resultados se muestran en la figura 6. El GMC-1 aplicado por vía tópica regenera la dermis *in vivo*.

30 Después del sacrificio, se conservaron y estudiaron los plasmas y las células mononucleares de sangre periférica (la principal población de leucocitos que circulan en la sangre). Se realizó una bioquímica general de los plasmas y se estudiaron diferentes marcadores renales, hepáticos e inflamatorios (creatinina, transaminasas y proteína C reactiva de amplio intervalo, entre otros). Las PBMC se manipularon para estudiar la expresión del marcador proinflamatorio interleucina 1-beta. Este cambio de expresión se determinó usando reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR). Se amplificaron 100 ng de ADN convertido (ADNc) del ARNm original extraído de las diferentes muestras con ensayos de expresión génica comerciales (TaqMan, Life Technologies). Los valores se normalizaron frente a un control endógeno (beta-actina) y luego se realizó el cambio en veces de la expresión usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

40 Los resultados se muestran en la figura 7. El GMC-1 aplicado por vía tópica sobre un área de la piel herida es inofensivo en cuanto a cambios sistémicos de marcadores renales, hepáticos o inflamatorios *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Nanomaterial de grafeno seleccionado de nanofibras de grafeno, en el que el nanomaterial de grafeno tiene una distribución de tamaño de partícula que tiene un $dn(90)$ de $0,60\ \mu\text{m}$ o más pequeño en número de partículas y un $dv(90)$ de $80,00\ \mu\text{m}$ o más pequeño en volumen de partículas, tal como se mide mediante un analizador de partículas por difracción láser.
2. Nanomaterial de grafeno según la reivindicación 1, en el que su área de superficie específica BET está comprendida entre 100 y $500\ \text{m}^2/\text{g}$.
3. Nanomaterial de grafeno según la reivindicación 2, en el que su área de superficie específica BET está entre 300 - $350\ \text{m}^2/\text{g}$.
4. Nanomaterial de grafeno según la reivindicación 1, en el que su volumen de poros está entre $0,35$ - $0,40\ \text{cm}^3/\text{g}$.
5. Nanomaterial de grafeno según la reivindicación 1, en el que su área de superficie específica BET está entre 300 - $350\ \text{m}^2/\text{g}$ y su volumen de poros está entre $0,35$ - $0,40\ \text{cm}^3/\text{g}$.
6. Nanomaterial de grafeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las impurezas en el nanomaterial son de menos del $0,01\ \%$ en peso.
7. Nanomaterial de grafeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso como medicamento.
8. Nanomaterial de grafeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de heridas, cicatrices, eccemas, quemaduras cutáneas, úlceras cutáneas u otras lesiones cutáneas.
9. Nanomaterial de grafeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso según la reivindicación 8 en el tratamiento de lesiones cutáneas producidas por psoriasis, diabetes, cáncer, infecciones, acné o disminución de la circulación sanguínea.
10. Composición farmacéutica que comprende un producto de nanomaterial de grafeno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Composición farmacéutica según la reivindicación 10, adecuada para uso tópico.
12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, en la que está en una forma seleccionada de una crema, una pomada, una microemulsión, un gel, una emulsión-gel, una pasta, una espuma, una tintura, un parche, un vendaje, una membrana, una matriz o un sistema de administración transdérmica.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, en la que es un hidrogel o una crema.
14. Método para preparar el producto según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, a partir de nanofibras de grafeno en bruto, que comprende las etapas de:
 - a) purificar el material de grafeno en bruto, preferiblemente usando un ácido fuerte, para retirar cualquier metal o impureza presente en el material de grafeno en bruto,
 - b) reducir el tamaño de partícula del nanomaterial de grafeno purificado, preferiblemente a través de un procedimiento de exfoliación, a una distribución de tamaño de partícula que tiene un $dn(90)$ de $0,60\ \mu\text{m}$ o más pequeño en número de partículas y un $dv(90)$ de $80,00\ \mu\text{m}$ o más pequeño en volumen de partículas, tal como se mide mediante un analizador de partículas por difracción láser,
 - c) opcionalmente someter el producto obtenido a un procedimiento de despirogenización.

Figura 1

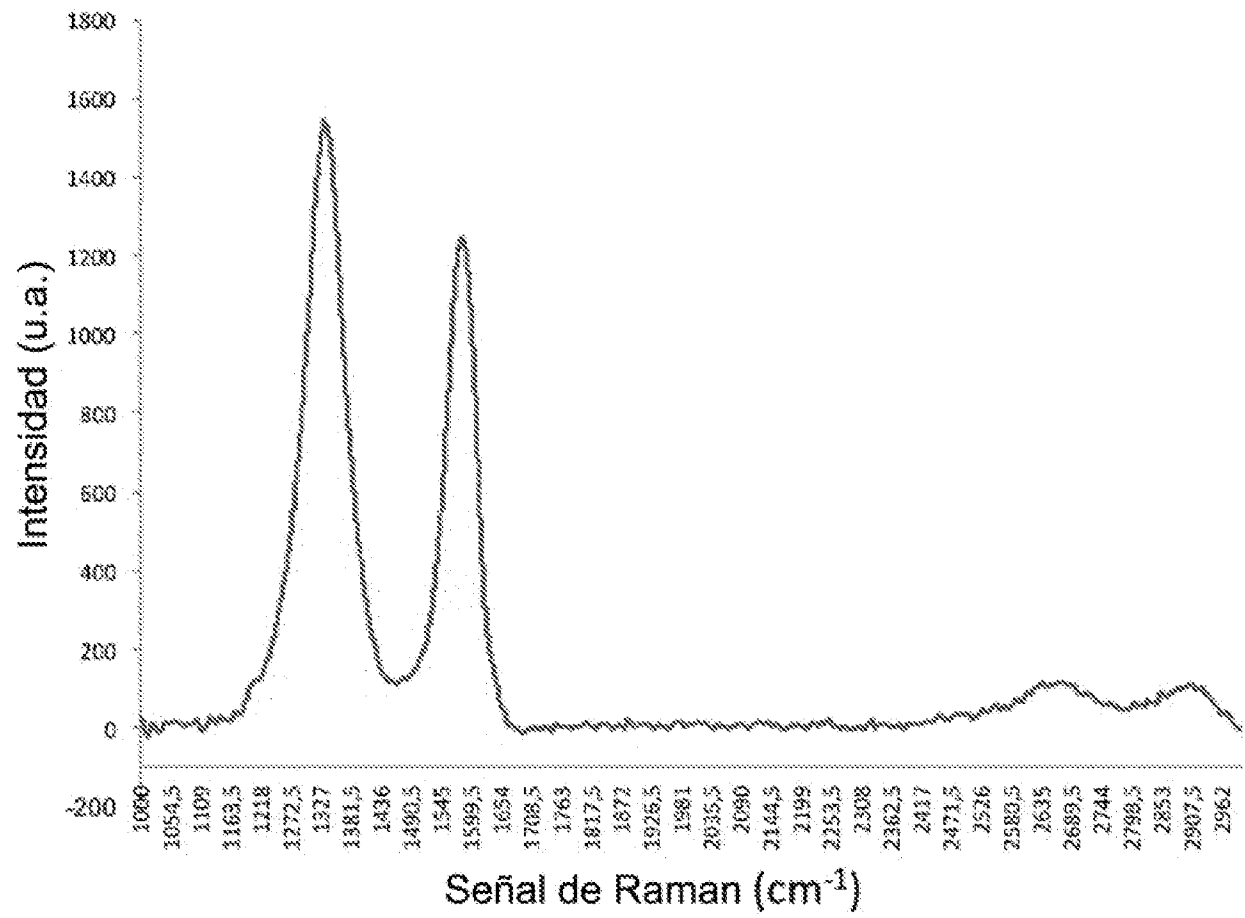


Figura 2

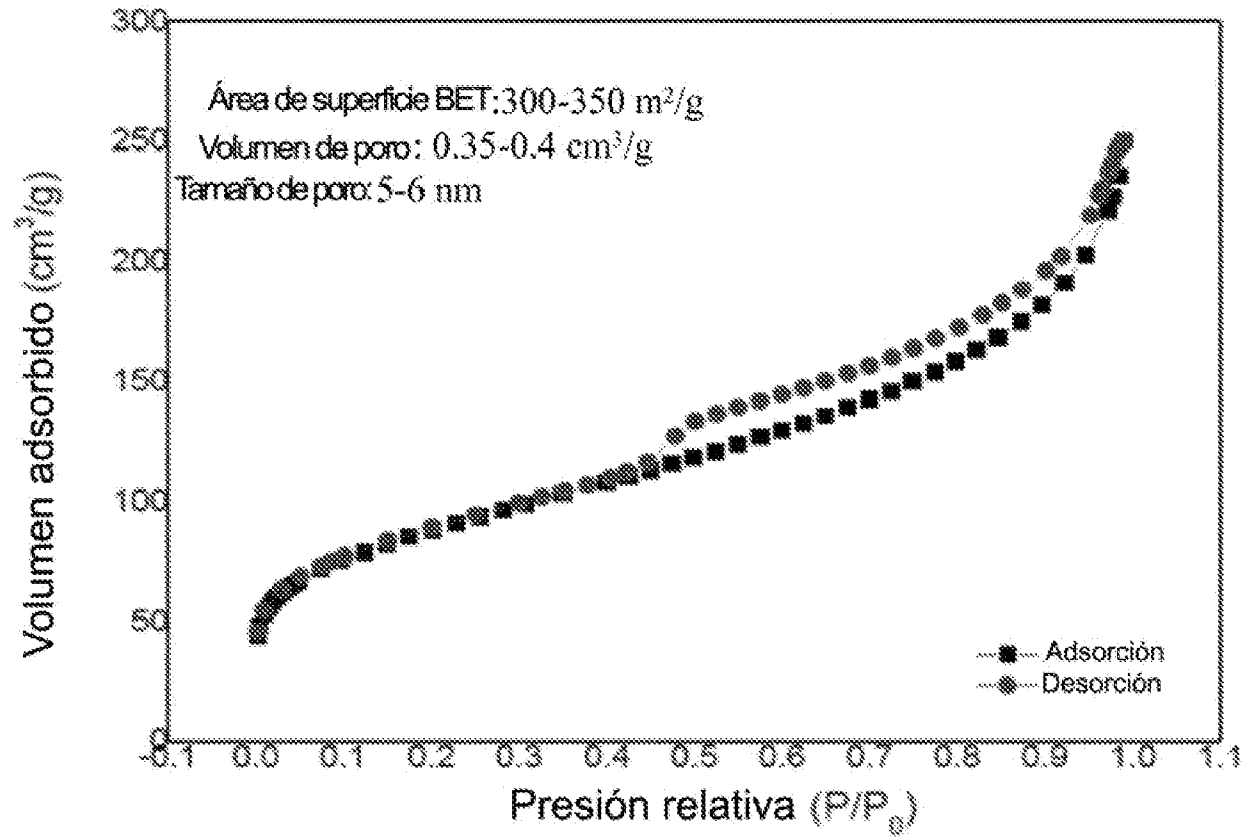


Figura 3A

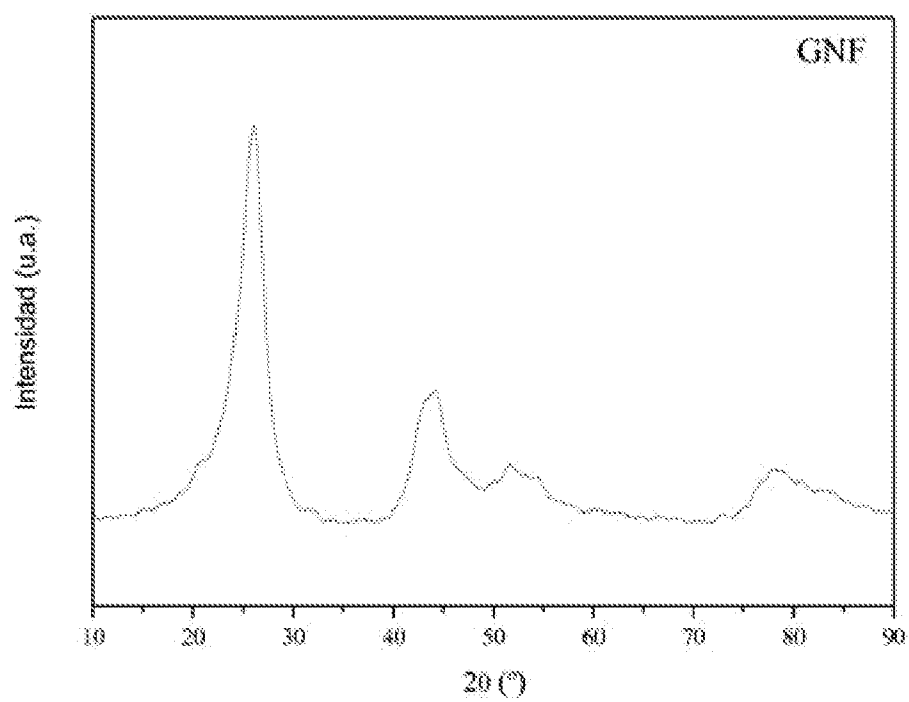


Figura 3B

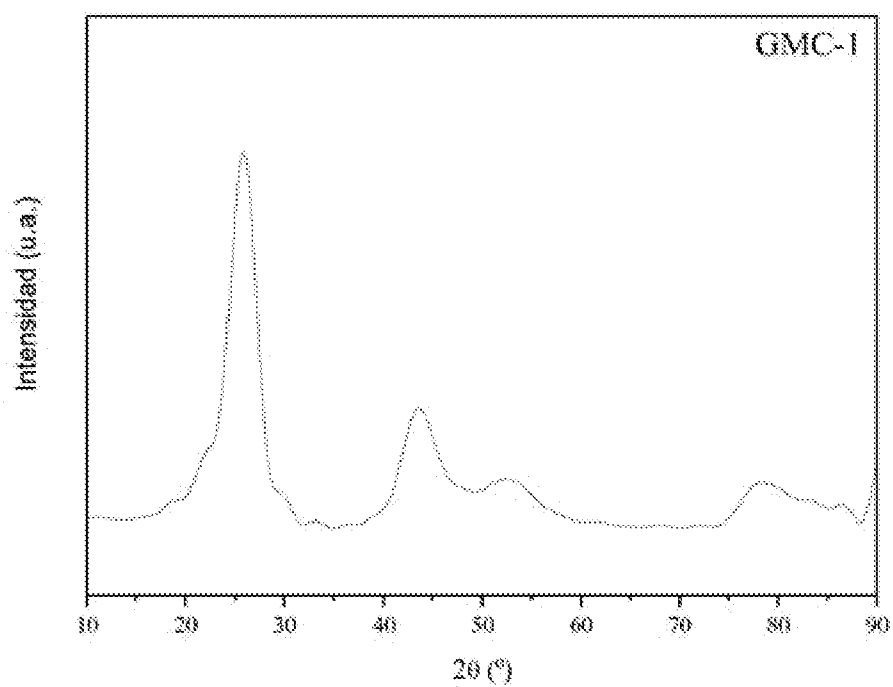


Figura 4A

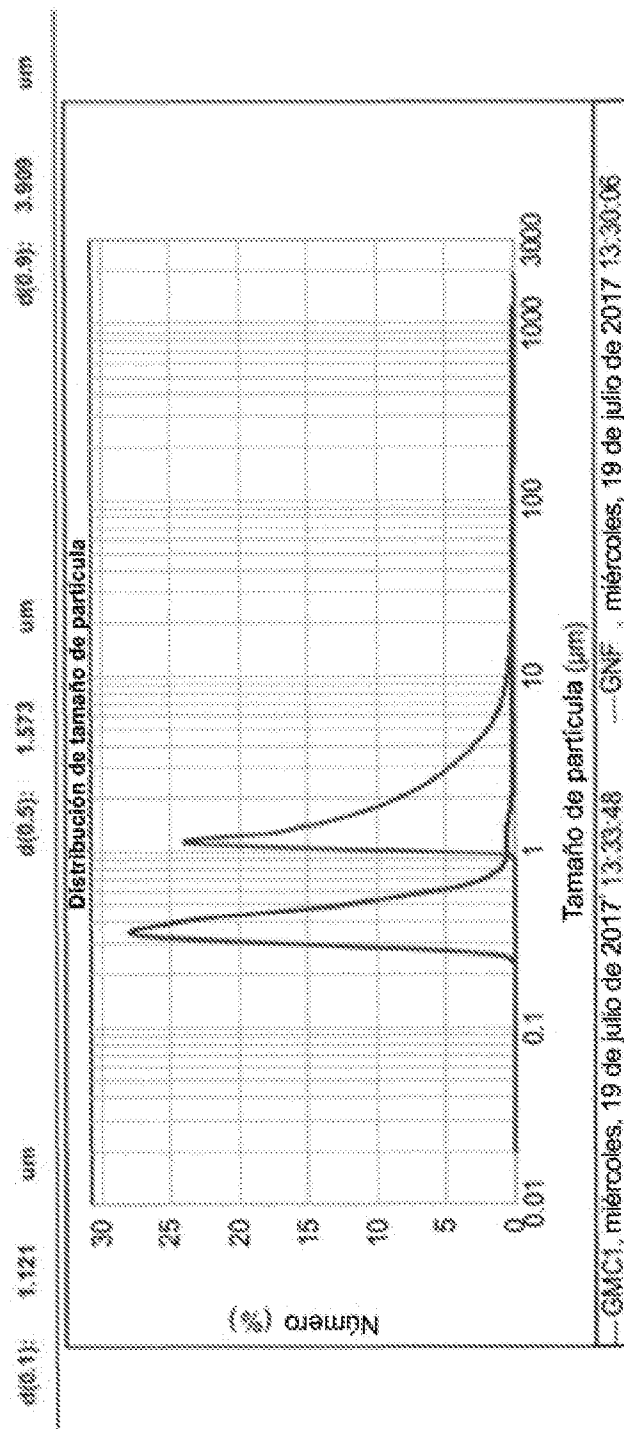


Figura 4B

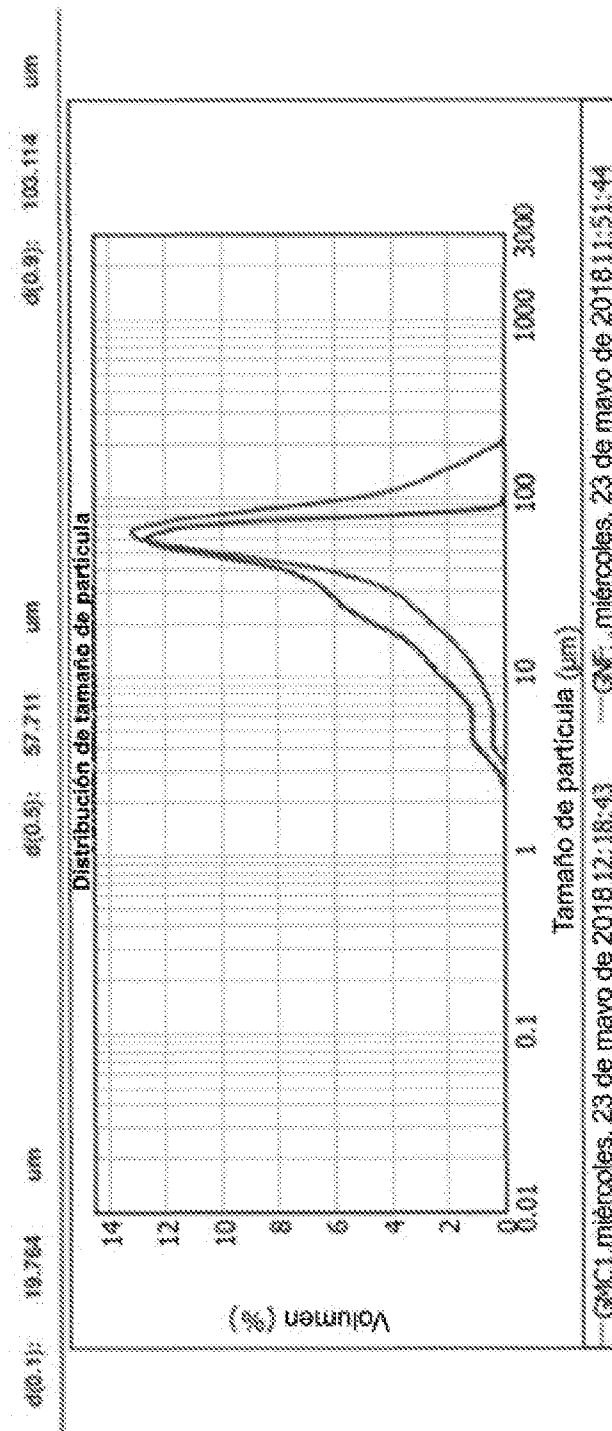


Figura 5

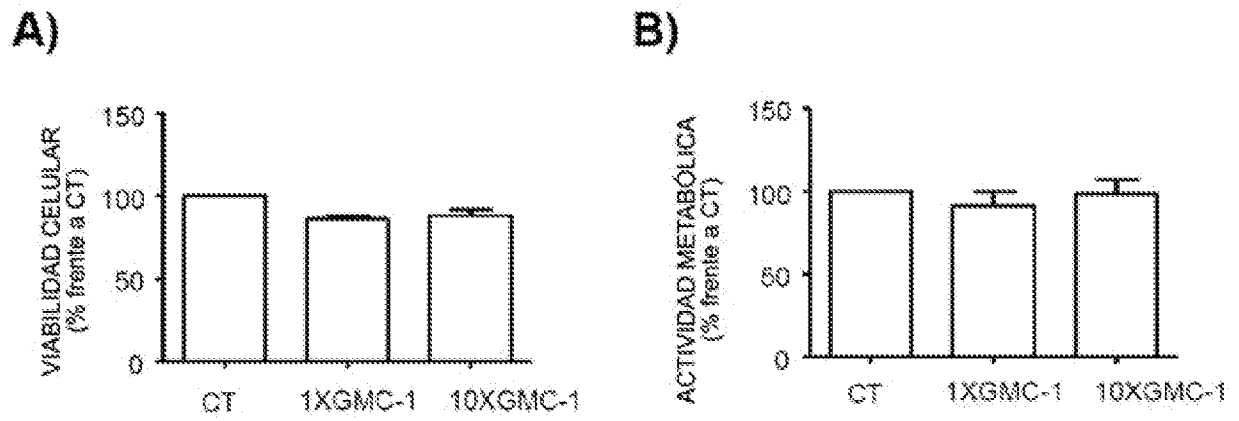


Figura 6

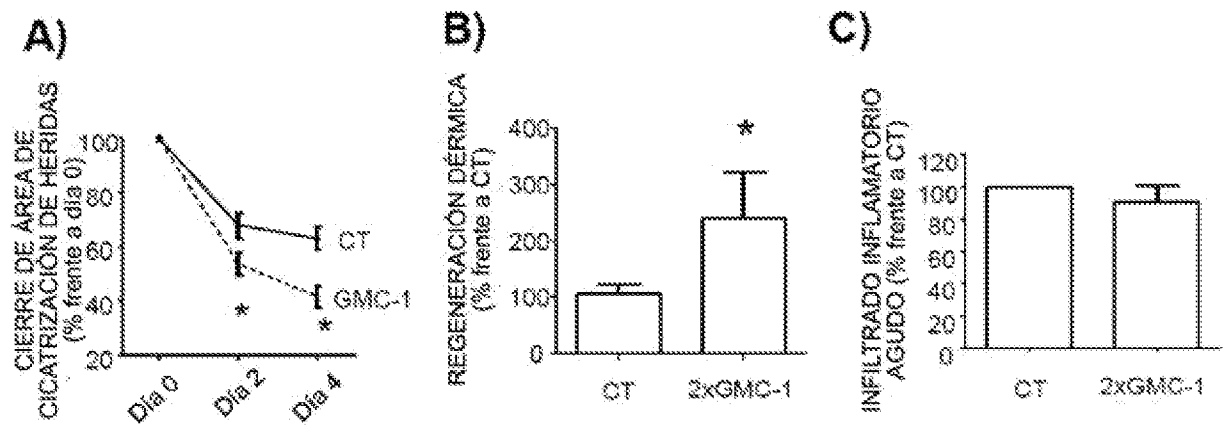


Figura 7

