(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 817 478**

(51) Int. CI.:

A61L 15/22 (2006.01)
A61L 15/42 (2006.01)
A61F 13/00 (2006.01)
C07K 17/12 (2006.01)
A61L 26/00 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2003 E 16185572 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 3115068**

(54) Título: **Composiciones de apósito para heridas que comprenden quitosano y una celulosa oxidada**

(30) Prioridad:

18.09.2002 GB 0221688

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.04.2021

(73) Titular/es:

SYSTAGENIX WOUND MANAGEMENT, LIMITED (100.0%)
2 City Place, Beehive Ring Road, Gatwick Airport West Sussex RH6 0PA, GB

(72) Inventor/es:

CULLEN, BREDA y
SILCOCK, DEREK WALTER

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Composiciones de apósito para heridas que comprenden quitosano y una celulosa oxidada

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una celulosa oxidada y un quitosano, y a los usos de las mismas para la curación de heridas.

La celulosa oxidada se produce mediante la oxidación de celulosa, por ejemplo, con tetróxido de dinitrógeno. Este procedimiento convierte los grupos alcohol primario en los residuos de sacáridos en grupos ácido carboxílico, formando residuos de ácido urónico dentro de la cadena de celulosa. La oxidación no procede con selectividad completa y, como resultado, los grupos hidroxilo en los carbonos 2 y 3 se convierten ocasionalmente en la forma ceto. Esas unidades de cetona introducen un enlace lábil con pH alcalino, que a pH 7 o superior inicia la descomposición del polímero mediante la formación de una lactona y la escisión del anillo de azúcar. Como resultado, la celulosa oxidada es biodegradable y bioabsorbible en condiciones fisiológicas.

La celulosa oxidada preferida para aplicaciones prácticas es celulosa regenerada oxidada (ORC, por sus siglas en inglés) preparada mediante la oxidación de una celulosa regenerada, tal como el rayón. Se sabe desde hace algún tiempo que la ORC tiene propiedades hemostáticas. La ORC ha estado disponible como un producto hemostático denominado SURGICEL (marca registrada de Johnson & Johnson Medical, Inc.) desde 1950. Ese producto se produce mediante la oxidación de un material de rayón tejido.

Una modificación de la porosidad, la densidad y el patrón de tejido llevó al lanzamiento de un segundo producto textil de ORC, INTERCEED (marca registrada - Johnson & Johnson Medical, Inc.) que demostró reducir la extensión de las adherencias posquirúrgicas en una cirugía abdominal.

El documento US-A-2517772 (Doub et al.) describe materiales hemostáticos mejorados obtenidos impregnando un tejido de ORC con trombina.

El documento EP-A-0437095 describe un material de ORC neutralizado preparado poniendo en contacto un material de ORC ácido, tal y como se ha sintetizado con una solución de una sal básica de un ácido orgánico débil, como acetato de sodio. El producto neutralizado resultante está indicado para la hemostasia y la prevención de adherencias.

El documento EP-A-0562862 describe materiales de tipo esponja bioabsorbible para uso como implantes en heridas. Los materiales comprenden una matriz de esponja de colágeno que tiene una subestructura orientada en la misma. La matriz y/o las subestructuras pueden comprender celulosa regenerada oxidada. No se describe el uso de esos materiales para el tratamiento de heridas crónicas.

El documento WO98/00180 describe el uso de esponjas de colágeno liofilizadas mezcladas con una adición de celulosa regenerada oxidada (ORC) para el tratamiento de heridas crónicas.

El documento EP-A-0393825 describe cuerpos absorbentes basados en mezclas de fibras de celulosa y quitosano. El documento WO00/01166 describe materiales porosos no fibrosos producidos mediante una liofilización de mezclas acuosas de al menos dos polisacáridos, que se pueden seleccionar a partir de quitina/quitosano o sus derivados, alginatos de calcio/sodio, pectina/pectatos, carragenano, CMC, otros derivados de celulosa, ácido hialurónico, derivados de almidón y/o condroitina.

Los materiales para apósitos para heridas descritos anteriormente proporcionan importantes ventajas. Los materiales son de origen biológico natural (aunque modificados químicamente) y, en consecuencia, tienden a tener una baja antigenicidad. Los materiales son generalmente bioabsorbibles, lo que reduce el trauma asociado con la retirada de materiales convencionales de apósitos para heridas desde la superficie de la herida. Además, algunos de esos materiales pueden tener efectos terapéuticos positivos sobre la curación de heridas.

Sin embargo, persisten ciertas dificultades. Por ejemplo, el colágeno como componente de los apósitos para heridas es propenso a una desnaturalización cuando se esteriliza mediante radiación gamma. El colágeno se extrae a partir de fuentes naturales y puede ser antigénico para ciertos pacientes a menos que se tomen medidas estrictas para purificar el colágeno, lo que aumenta sus costes.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de materiales para apósitos para heridas mejorados de ese tipo general que presentan un control de las propiedades físicas y las tasas de absorción biológica, efectos terapéuticos sobre la curación de heridas, un coste reducido y una respuesta antigénica reducida.

Es un objeto de la presente invención proporcionar materiales mejorados para apósitos de heridas para heridas de mamíferos, y especialmente para heridas crónicas humanas, tales como úlceras venosas, úlceras por decúbito y úlceras diabéticas. Tales heridas crónicas generalmente muestran poco o ningún sangrado o adherencia a otros tejidos corporales.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de apósito para heridas según la reivindicación 1.

Preferiblemente, la celulosa oxidada comprende celulosa regenerada oxidada (ORC). La celulosa regenerada oxidada (ORC) se puede obtener mediante el procedimiento descrito en el documento de patente de EE.UU. nº 3122479. Ese material ofrece numerosas ventajas, incluidas las características de que es biocompatible, biodegradable, no inmunogénico y con amplia disponibilidad comercial. La ORC está disponible con diversos grados de oxidación y, por lo tanto, tasas de degradación. La ORC se puede usar en forma de fibras insolubles, incluyendo de punto, tejidas y no tejidas. En otras realizaciones, la ORC está en forma de fragmentos de bajo peso molecular, solubles en agua, obtenidos por hidrólisis alcalina de la ORC.

En realizaciones preferidas, la celulosa oxidada está en forma de partículas, tales como partículas de fibra o partículas de polvo, preferiblemente dispersadas en un vehículo de medicamento tópico sólido o semisólido adecuado. En particular, los materiales contienen preferiblemente fibras de ORC, en las que una fracción en volumen de al menos un 80% de las fibras tiene longitudes en el intervalo de 20 µm a 1000 µm. Esa distribución por tamaño se puede lograr, por ejemplo, moliendo un paño de ORC, seguido de un tamizado del polvo molido para eliminar las fibras fuera del intervalo. Preferiblemente, la longitud promedio (media en volumen) de las fibras de ORC está en el intervalo de 250 µm a 450 µm. La selección de las longitudes de la fibra de ORC en ese intervalo da como resultado una mezcla fácil de la ORC y el quitosano y productos altamente homogéneos. La ORC forma un complejo más íntegro con el quitosano, lo que da lugar a una mejora de las propiedades terapéuticas de la esponja.

Preferiblemente, la celulosa oxidada tiene un peso molecular promedio superior a 50.000. Una celulosa oxidada de ese tipo es sustancialmente insoluble en los fluidos de las heridas, pero sufrirá una descomposición muy gradual en fragmentos biorreabsorbibles a pH fisiológico. Preferiblemente, la celulosa oxidada no se neutraliza. Sin embargo, la presente invención incluye el uso de materiales parcial o completamente neutralizados como se describe en el documento EP-A-0437095 para la preparación de medicamentos para el tratamiento de heridas crónicas tal y como se han definido en esta memoria anteriormente.

La quitina es un biopolímero natural compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina. La quitina se puede extraer a partir del exoesqueleto de gambas y cangrejos de manera conocida. A continuación, la quitina se desacetila parcialmente, por ejemplo, mediante un tratamiento con NaOH 5 M-15 M, para producir quitosano. Una desacetilación completa de la quitina no es una posibilidad práctica, pero preferiblemente el quitosano está desacetilado al menos en un 50%, más preferiblemente desacetilado en al menos un 75%. El quitosano se ha empleado para el tratamiento de heridas en diversas formas físicas, p. ej., como solución/gel; película/membrana; esponja; polvo o fibra. El quitosano en forma de base libre es hinchable pero no sustancialmente soluble en agua a un pH casi neutro, pero es soluble en ácidos debido a la presencia de grupos amonio en la cadena del quitosano. La solubilidad del quitosano se puede reducir mediante reticulación, por ejemplo, con epiclorhidrina. Normalmente, el peso molecular promedio del quitosano tal y como se determina por cromatografía de permeación en gel, es de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención comprenden preferiblemente una mezcla íntima de quitosano y celulosa oxidada. Preferiblemente, la mezcla íntima comprende una solución o dispersión mixta del quitosano y la celulosa oxidada en un vehículo adecuado, tal como un disolvente, o una composición sólida producida eliminando el disolvente desde esa solución o dispersión. (Bajo dispersión se entiende una distribución de partículas sólidas discretas en el vehículo, por ejemplo, una dispersión coloidal o una dispersión formada mediante una mezcla con cizallamiento). Esa mezcla íntima da como resultado la formación de un complejo químico máximo entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilato de la celulosa oxidada.

Preferiblemente, el quitosano constituye al menos un 5%, más preferiblemente al menos un 10%, 20% o 30% de la composición. Preferiblemente, la celulosa oxidada también constituye al menos un 5%, más preferiblemente al menos un 10%, 20% o 30% de la composición. Preferiblemente, el quitosano y la celulosa oxidada juntos constituyen al menos un 25% en peso, más preferiblemente un 50% o un 75% en peso del material de apósito para heridas y, en algunas realizaciones, al menos un 90% en peso del material. En determinadas realizaciones preferidas, el material consiste esencialmente en quitosano y celulosa oxidada.

Otros componentes del material de acuerdo con la invención pueden incluir un 0-25% en peso, por ejemplo, desde aproximadamente 1 a aproximadamente 20% en peso, de uno o varios otros polisacáridos biocompatibles, por ejemplo, alginatos tales como alginato de sodio o alginato de calcio, derivados del almidón tales como glicolato sódico de almidón, derivados de celulosa tales como metil celulosa o carboximetil celulosa, o glicosaminoglicanos tales como ácido hialurónico o sus sales, sulfato de condroitina o sulfato de heparano. Los materiales de acuerdo con la presente invención también pueden comprender hasta aproximadamente un 25% en peso, por ejemplo desde aproximadamente un 1 hasta aproximadamente un 20% en peso, de una o varias proteínas estructurales, seleccionadas a partir del grupo que consiste en fibronectina, fibrina, laminina, elastina, colágeno y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la proteína comprende colágeno y, más preferiblemente, consiste esencialmente en colágeno. Los materiales de acuerdo con la presente invención también pueden comprender hasta aproximadamente un 20% en peso, preferiblemente de aproximadamente un 2% a aproximadamente un 10% en peso de agua. El material de acuerdo con la presente invención también puede contener un 0-40% en peso, por ejemplo, desde aproximadamente un 5 a aproximadamente un 25% en peso, de un agente plastificante, preferiblemente un poli(alcohol hídrico) tal como glicerol o sorbitol.

En determinadas realizaciones, los materiales de acuerdo con la presente invención también pueden comprender hasta aproximadamente un 10% en peso, por ejemplo, desde aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 5% en peso, típicamente desde aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 2% en peso de uno o varios agentes terapéuticos para la curación de heridas, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, acetaminofeno), esteroides, anestésicos locales, agentes antimicrobianos o factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos o factor de crecimiento derivado de plaquetas). El agente antimicrobiano puede comprender, por ejemplo, un agente antiséptico, un antibiótico o mezclas de los mismos. Los antibióticos preferidos incluyen tetraciclina, penicilinas, terramicinas, eritromicina, bacitracina, neomicina, polimicina B, mupirocina, clindamicina y mezclas de las mismas. Los agentes antisépticos preferidos incluyen plata, que incluye plata coloidal, sales de plata incluyendo sales de uno o varios de los polímeros aniónicos que forman el material, sulfadiazina de plata, clorhexidina, yoduro de povidona, triclosán, sucralfato, sales de amonio cuaternario y mezclas de los mismos. Esos materiales para apósitos medicinales para heridas de acuerdo con la invención proporcionan una liberación sostenida de los agentes terapéuticos a medida que el material de los apósitos para heridas se descompone con el uso.

Todos los porcentajes anteriores se basan en el peso seco.

Preferiblemente, la relación en peso entre el quitosano y la celulosa oxidada es desde aproximadamente 1:99 a aproximadamente 99:1. Más preferiblemente, la relación en peso está en el intervalo desde aproximadamente 1:9 a aproximadamente 9:1, más preferiblemente está en el intervalo desde aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, aún más preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2, y lo más preferiblemente en la relación entre quitosano:celulosa oxidada desde aproximadamente 60:40 a aproximadamente 50:50. En ciertas realizaciones, el material consiste esencialmente en aproximadamente un 55% en peso de quitosano y aproximadamente un 45% en peso de celulosa oxidada, en peso seco.

La composición de acuerdo con la presente invención puede estar en cualquier forma conveniente, tal como un polvo, microesferas, escamas, una malla o una película.

En determinadas realizaciones, la composición de acuerdo con la presente invención está en forma de ungüento semisólido o en forma de gel para una aplicación tópica.

En determinadas realizaciones, la composición de acuerdo con la presente invención está en forma de una esponja bioabsorbible liofilizada o con disolvente desecado para aplicar sobre una herida crónica. Preferiblemente, el tamaño promedio de los poros de la esponja está en la región de 10-500 µm, más preferiblemente aproximadamente 100-300 µm. Se ha producido una esponja adecuada liofilizando o desecando el disolvente de una dispersión acuosa que consiste esencialmente en partículas o fibras de quitosano y fibras de ORC, junto con agentes terapéuticos adecuados.

En todavía otras realizaciones, la composición de acuerdo con la presente invención está en forma de una película flexible, que puede ser continua o estar interrumpida (por ejemplo, perforada). La película flexible comprende preferiblemente un agente plastificante para hacerla flexible, tal como glicerol.

La fácil disponibilidad tanto del quitosano como de la ORC que tienen una gama de propiedades controlables, significa que las propiedades de las composiciones de la presente invención se pueden controlar hasta un grado excepcional. En particular, se puede controlar la tasa de absorción biológica, la porosidad y la densidad de los materiales.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un apósito para heridas que comprende una composición de apósito para heridas de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

El apósito para heridas está preferiblemente en forma de lámina y comprende una capa activa de la composición de acuerdo con la invención. La capa activa normalmente sería la capa que está en contacto con la herida en uso, pero en algunas realizaciones podría estar separada de la herida por una lámina superior permeable a los líquidos. Preferiblemente, el área de la capa activa es desde aproximadamente 1 cm^2 a unos 400 cm^2, más preferiblemente desde aproximadamente 4 cm^2 a aproximadamente 100 cm^2.

Preferiblemente, el artículo comprende además una lámina de soporte que se extiende sobre la capa activa, de forma opuesta al lado de la capa activa orientada hacia la herida. Preferiblemente, la lámina de soporte es más grande que la capa activa, de modo que una región marginal de 1 mm a 50 mm de ancho, preferiblemente de 5 mm a 20 mm, se extiende alrededor de la capa activa para formar un llamado apósito en isla. En tales casos, la lámina de soporte se recubre preferiblemente con un adhesivo de calidad médica sensible a la presión, en al menos su región marginal.

Preferiblemente, la lámina de soporte es sustancialmente impermeable a los líquidos. La lámina de soporte es preferiblemente semipermeable. Es decir, la lámina de soporte es preferiblemente permeable al vapor de agua, pero no es permeable al agua líquida o al exudado de una herida. Preferiblemente, la lámina de soporte también es impermeable a los microorganismos. Las láminas de soporte adaptables continuas adecuadas tendrán preferiblemente una tasa de transmisión de vapor de humedad (MVTR) de la lámina de soporte sola de 300 a 5000 g/m^2/24 horas, preferiblemente 500 a 2000 g/m^2/24 horas a 37,5°C con una diferencia de humedad relativa de 100%

a 10%. El espesor de la lámina de soporte está preferiblemente en el intervalo de 10 a 1000 micrómetros, más preferiblemente de 100 a 500 micrómetros.

La MVTR del apósito de acuerdo con la presente invención en su conjunto es más baja que la de la lámina de soporte sola, porque la lámina con orificios obstruye parcialmente la transferencia de humedad a través del apósito. Preferiblemente, la MVTR del apósito (medida a través de la porción de isla del apósito) es desde un 20% a un 80% de la MVTR de la lámina de soporte sola, más preferiblemente desde un 20% a un 60% de la misma, y lo más preferiblemente aproximadamente un 40% de la misma. Se ha descubierto que tales tasas de transmisión de vapor de humedad permiten que la herida debajo del apósito cicatrice en condiciones de humedad sin provocar que la piel que rodea la herida se macere.

Los polímeros adecuados para formar la lámina de soporte incluyen poliuretanos y poli(acrilatos y metacrilatos de alcoxialquilo) tales como los descritos en el documento GB-A-1280631. Preferiblemente, la lámina de soporte comprende una capa continua de una espuma de poliuretano en bloque de alta densidad que es predominantemente de celda cerrada. Un material de lámina de soporte adecuado es la película de poliuretano disponible bajo la marca registrada ESTANE 5714F.

La capa adhesiva (cuando está presente) debe transmitir el vapor de humedad y/o estar diseñada para permitir el paso del vapor de agua a través de ella. La capa adhesiva es preferiblemente una capa adhesiva sensible a la presión que transmite de forma continua el vapor de humedad, del tipo usado convencionalmente para apósitos de heridas de tipo isla, por ejemplo, un adhesivo sensible a la presión a base de copolímeros de éster de acrilato, polivinileteléter y poliuretano, como se describe, por ejemplo, en el documento GB-A-1280631. El peso base de la capa adhesiva es preferiblemente de 20 a 250 g/m^2, y más preferiblemente de 50 a 150 g/m^2. Se prefieren los adhesivos sensibles a la presión a base de poliuretano. Se pueden acumular más capas de un artículo absorbente multicapa entre la capa activa y la lámina protectora. Por ejemplo, esas capas pueden comprender una película de plástico con orificios para proporcionar un soporte a la capa activa en uso, en cuyo caso los orificios en la película están preferiblemente alineados exactamente con los orificios en la capa del hidrogel.

El apósito puede comprender además una capa absorbente entre la capa activa y la lámina protectora, especialmente si el apósito se utiliza sobre heridas exudativas. La capa absorbente opcional puede ser cualquiera de las capas usadas convencionalmente para absorber fluidos de heridas, suero o sangre en la técnica de curación de heridas, incluyendo gasas, telas no tejidas, superabsorbentes, hidrogeles y mezclas de los mismos. Preferiblemente, la capa absorbente comprende una capa de espuma absorbente, tal como una espuma de poliuretano hidrófila de celdas abiertas, preparada de acuerdo con el documento EP-A-0541 391. En otras realizaciones, la capa absorbente puede ser un tramado fibroso no tejido, por ejemplo, un tramado cardado de fibras básicamente viscosas. El peso base de la capa absorbente puede estar en el intervalo de 50-500 g/m^2, tal como 100-400 g/m^2. El espesor sin comprimir de la capa absorbente puede estar en el intervalo de 0,5 mm a 10 mm, tal como de 1 mm a 4 mm. La capacidad de absorción de líquido libre (sin comprimir) medida para una solución salina fisiológica puede estar en el intervalo de 5 a 30 g/g a 25°. Preferiblemente, la capa o capas absorbentes son sustancialmente coextensivas con la capa de quitosano/ORC.

La superficie del apósito orientada hacia la herida está preferiblemente protegida por una lámina superior extraíble. La lámina superior está formada normalmente por material termoplástico flexible. Los materiales adecuados incluyen poliésteres y poliolefinas. Preferiblemente, la superficie orientada hacia el adhesivo de la lámina superior es una superficie que se desprende. Es decir, una superficie que solo se adhiere débilmente a la capa activa y al adhesivo de la lámina de soporte para ayudar a despegar la capa de hidrogel de la lámina superior. Por ejemplo, la lámina superior puede estar formada por un plástico no adherente, tal como un fluoropolímero, o puede estar provista de un revestimiento que se desprende, tal como un revestimiento que se desprende de silicona o de fluoropolímero.

Preferiblemente, el apósito para heridas es estéril y está envasado en un recipiente impermeable a los microorganismos.

También se describe el uso de una composición de apósito para heridas de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para la preparación de un apósito para el tratamiento de una herida. Preferiblemente, la herida es una herida crónica, por ejemplo, una herida seleccionada a partir del grupo que consiste en úlceras venosas, úlceras por decúbito y úlceras diabéticas.

Se ha encontrado que las composiciones de quitosano/celulosa oxidada de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención, tienen una excelente capacidad para unirse a factores de crecimiento, en particular, al factor de crecimiento derivado de plaquetas. Por consiguiente, se describe el uso de composiciones de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para unirse a uno o varios factores de crecimiento celular. Preferiblemente, el factor de crecimiento celular es un factor de crecimiento celular derivado de plaquetas (PDGF).

También se describe un método para apartar los factores de crecimiento celular desde una muestra u organismo biológico, comprendiendo el método: poner en contacto la muestra o el organismo biológico con un material que comprende una composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en donde la puesta en contacto se lleva a cabo *in vivo* o *in vitro*, para unir los factores de crecimiento con el material. Preferiblemente, el método

comprende además recuperar los factores de crecimiento unidos desde el material.

También se describe un método para preparar un material activo para apósitos de heridas que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto un material que comprende una composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención, con un medio biológico que contiene factores de crecimiento celular para unir los factores de crecimiento celular con el material;

(ii) lavar y secar el material que tiene los factores de crecimiento celular unidos al mismo para formar dicho material activo para apósitos de heridas. Preferiblemente, los factores de crecimiento celular comprenden el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

También se describe un método de tratamiento de una herida crónica en un mamífero, tal como una úlcera por decúbito, una úlcera venosa o una úlcera diabética. El método comprende aplicar un apósito de acuerdo con el segundo aspecto de la invención sobre la herida.

Preferiblemente, el apósito se aplica sobre la herida crónica durante un período de al menos 1 hora, más preferiblemente al menos 6 horas y lo más preferiblemente al menos 12 horas. El tratamiento se puede extender a varios días o semanas, con cambios de apósito según corresponda, si es necesario para heridas crónicas. Eso contrasta con las aplicaciones hemostáticas de ORC, que normalmente duran solo unos pocos segundos o minutos.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que las composiciones de quitosano/celulosa oxidada promueven la curación de heridas crónicas en al menos algunas de las siguientes formas. En primer lugar, el complejo se une a factores de crecimiento tales como PDGF, EGF y FGF para retener esos factores de crecimiento en el sitio de la herida, de lo contrario, esos factores de crecimiento tienden a alejarse del lugar de la herida junto con el exudado de la herida.

La descomposición gradual del quitosano/celulosa oxidada a pH fisiológico da como resultado una liberación gradual de los factores de crecimiento de regreso a la herida. Una segunda razón es que el material es completamente biorreabsorbible y fisiológicamente aceptable. Una tercera razón puede ser que los fragmentos de oligosacáridos producidos por la descomposición de la celulosa oxidada y el quitosano *in vivo* promueven ellos mismos la curación de heridas crónicas.

Preferiblemente, la herida crónica se selecciona a partir del grupo que consiste en úlceras venosas, úlceras por decúbito y úlceras diabéticas. Preferiblemente, la herida crónica no sangra sustancial o completamente. La expresión "herida crónica" preferiblemente no incluye un trastorno o una enfermedad periodontal.

Los complejos de quitosano/celulosa oxidada usados en la presente invención se pueden preparar mediante un procedimiento que comprende las etapas de: proporcionar una dispersión de un quitosano en un disolvente adecuado, preferiblemente una dispersión acuosa; sumergir o dispersar la celulosa oxidada en el disolvente; seguido de una eliminación del disolvente desde la dispersión para dejar un material sólido que comprende quitosano que forma un complejo con celulosa oxidada.

La celulosa oxidada se puede añadir a la dispersión acuosa de quitosano en forma de una suspensión o solución de la celulosa oxidada, preferiblemente a un pH comparable al de la suspensión de quitosano, seguido de una mezcla por agitación u homogeneización. Alternativamente, las fibras secas o el tejido de celulosa oxidada se pueden dispersar o sumergir en la dispersión acuosa de quitosano.

Los componentes adicionales opcionales en los materiales de acuerdo con la presente invención, se incluyen preferiblemente en la dispersión antes de eliminar el disolvente de la dispersión.

Preferiblemente, el pH de la dispersión se ajusta preferiblemente a un pH en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, preferiblemente un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 8. El quitosano es soluble a pH bajo, lo que puede ser deseable para formar ciertos productos tales como películas. La celulosa oxidada experimenta a pH elevado una hidrólisis hasta fragmentos solubles.

El disolvente se puede eliminar de la dispersión mediante evaporación, por ejemplo, mediante una evaporación de la dispersión en una bandeja para dejar una película de material. En otras realizaciones, el disolvente, preferiblemente agua, se elimina mediante desecación por congelación (liofilización) o desecación del disolvente para producir el material en forma de una esponja. Preferiblemente, la dispersión del disolvente contiene 5-30 mg/ml de quitosano. Preferiblemente, el método de liofilización es similar al descrito para una esponja a base de colágeno en el documento US-A-21 57224. En determinadas realizaciones, el procedimiento puede comprender además tratar el quitosano y/o la celulosa oxidada en la dispersión, o en el material desecado, con un agente de reticulación tal como epiclorhidrina, carbodiimida, diisocianato de hexametileno (HMDI) o glutaraldehído.

Alternativamente, la reticulación se puede llevar a cabo de forma deshidrotérmica. El método de reticulación puede afectar notablemente al producto final. Por ejemplo, el HMDI reticula los grupos amino primarios del quitosano dentro

del complejo, mientras que la carbodiimida reticula los carbohidratos de la ORC con los grupos amino primarios del quitosano.

Se apreciará que cualquier característica adicional o alternativa que se ha descrito anteriormente en relación con un aspecto cualquiera de la invención, también es una característica alternativa o adicional en relación con otro aspecto cualquiera de la invención, ya sea sola o en combinación.

A continuación, se describirán adicionalmente unas realizaciones específicas de la presente invención, a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

la Figura 1 muestra un gráfico de la actividad elastasa frente al tiempo para un material de apósito para heridas de acuerdo con la presente invención, en comparación con controles positivos y negativos; y

la Figura 2 muestra un gráfico de la actividad colagenasa frente al tiempo para un material de apósito para heridas de acuerdo con la presente invención, en comparación con los mismos controles positivos y negativos.

Ejemplo de referencia 1: Preparación de una esponja de colágeno/ORC fibrosa

Se prepara una esponja liofilizada de colágeno /ORC del modo siguiente.

En primer lugar, el componente de colágeno se prepara a partir de dermis bovina del modo siguiente. La dermis bovina se separa de la piel de vaca, se raspa y se sumerge en una solución de hipoclorito de sodio (0,03% p/v) para inhibir la actividad microbiana en espera de un procesamiento adicional. A continuación, la dermis se lava con agua y se trata con una solución que contiene hidróxido de sodio (0,2% p/v) y peróxido de hidrógeno (0,02% p/v) para hinchar y esterilizar la dermis a temperatura ambiente. La dermis se fragmenta y luego se somete a una etapa de tratamiento alcalino en una solución que contiene hidróxido de sodio, hidróxido de calcio y bicarbonato de sodio (0,4% p/v, 0,6% p/v y 0,05% p/v, respectivamente) a un pH superior a 12,2, temperatura ambiente y durante un tiempo de 10 a 14 días, con volteo, hasta que se alcanza un nivel de nitrógeno amídico inferior a 0,24 mmol/g. Los fragmentos de dermis se someten después a una etapa de tratamiento ácido con ácido clorhídrico al 1% a temperatura ambiente y pH 0,8-1,2. El tratamiento continúa con volteo hasta que los fragmentos de dermis han absorbido suficiente ácido para alcanzar un pH inferior a 2,5. A continuación, los fragmentos se lavan con agua hasta que el valor del pH de los fragmentos de dermis alcanza 3,0-3,4. Los fragmentos de dermis se trituran después con hielo en un triturador de cuenco, primero con una trituración gruesa y, después, en un contexto de trituración fina. La pasta resultante, que se compone de una proporción de 650 g de fragmentos de dermis por 100 g de agua, en forma de hielo, se congela y se almacena antes del uso en la siguiente etapa del procedimiento. Sin embargo, el colágeno no se liofiliza antes de mezclarlo con la ORC en la siguiente etapa.

El componente de ORC de la almohadilla liofilizada se prepara del modo siguiente. Se muele un paño SURGICEL (Johnson & Johnson Medical, Arlington) utilizando una cuchilla rotatoria a través de una placa de malla, manteniendo la temperatura por debajo de 60°C.

El polvo de ORC molida y el peso requerido (según el contenido en sólidos) de la pasta de colágeno congelada, se añaden luego a una cantidad suficiente de agua acidificada con ácido acético para obtener un valor de pH de 3,0 y un contenido total en sólidos de 1,0%. La mezcla se homogeneiza a través de un homogeneizador Fryma MZ130D, disminuyendo progresivamente los parámetros para formar una suspensión homogénea. El pH de la suspensión se mantiene a 2,9-3,1. La temperatura de la suspensión se mantiene por debajo de 20°C y el contenido en sólidos se mantiene al 1% ± 0,07.

La suspensión resultante se bombea a un recipiente de desgasificación. Se inicia el vacío durante un mínimo de 30 minutos, con agitación intermitente, para desgasificar la suspensión. A continuación, la suspensión se bombea a bandejas de liofilización hasta una profundidad de 25 mm. Las bandejas se colocan sobre estantes del congelador en donde la temperatura se ha ajustado previamente a -40°C. A continuación, se inicia el programa de liofilización para secar y reticular deshidrotérmicamente el colágeno y la ORC, para formar almohadillas de esponja gruesas. Una vez completado el ciclo, se libera el vacío, se retiran los bloques liofilizados y luego se fragmentan para eliminar las capas superficiales superior e inferior y para dividir el resto de los bloques en almohadillas de 3 mm de espesor. La etapa de fragmentar los bloques liofilizados en forma de almohadillas se realiza con una cortadora Fecken Kirfel K1. Finalmente, las almohadillas se cortan con troquel al tamaño y la forma deseados en una troqueladora, se envasan y se esterilizan con 18-29 KGy de radiación gamma de cobalto 60. Sorprendentemente, esa radiación no provoca una desnaturalización significativa del colágeno, que parece estar estabilizado por la presencia de ORC. Las almohadillas de ORC y colágeno liofilizadas resultantes tienen un aspecto uniforme, blanco y aterciopelado. El espesor de las almohadillas es de 3,2 ± 0,17 mm (N ≈ 8 lotes). Esas almohadillas se utilizan como control positivo en los procedimientos que se describen a continuación.

Ejemplo de referencia 2: Preparación de una esponja de alginato/ORC fibrosa

Se preparó una esponja de alginato/ORC fibrosa como se ha descrito en el Ejemplo de referencia 1, pero reemplazando el colágeno por una fracción de alginato con el mismo peso.

El alginato de sodio se obtuvo a partir de Pronova Biomedical en forma de polvo. El polvo se disolvió en agua helada hasta una concentración del 2% p/v, mezclando con un agitador de paletas. Después, la solución se diluyó hasta tener un 1% de sólidos mediante la adición de un volumen igual de ácido acético 0,1 M. A continuación, se añadió a la ORC un peso conocido de la solución de alginato de sodio para proporcionar una relación final de 45% de ORC/55% de alginato de sodio en el material final. A continuación, se prepararon las esponjas como en el ejemplo 1.

Ejemplo de referencia 3: Preparación de una esponja de hialuronato/ORC fibrosa

Se preparó una esponja de hialuronato/ORC fibrosa como se ha descrito en el Ejemplo de referencia 1, pero reemplazando el colágeno por una fracción de hialuronato con el mismo peso.

El hialuronato de sodio con una distribución de peso molecular promedio de 500.000 Dalton se obtuvo a partir de Lifecore Biomedical Inc., en forma de polvo. El polvo se disolvió en agua helada hasta una concentración del 2% p/v mezclando durante una noche. A continuación, se añadió a la ORC un peso conocido de la solución de hialuronato de sodio para proporcionar una relación final de 45% de ORC/55% de hialuronato de sodio en el material final. A continuación, se prepararon las esponjas como en el ejemplo 1.

Ejemplo de referencia 4: Preparación de una esponja de pectina/ORC fibrosa

Se preparó una esponja de pectina/ORC fibrosa como se ha descrito en el Ejemplo de referencia 1, pero reemplazando el colágeno por una fracción de pectina con el mismo peso.

La pectina de las manzanas, se obtuvo a partir de Sigma Chemical Co. El polvo se disolvió en agua helada al 2% p/v con agitación durante una noche. A continuación, se añadió a la ORC un peso conocido de la solución de pectina para proporcionar una relación final de 45% de ORC/55% de pectina en el material final. A continuación, se prepararon las esponjas como en el ejemplo 1.

Ejemplo de referencia 5: Preparación de una esponja de beta-glucano/ORC fibrosa

Se preparó una esponja de beta-glucano/ORC fibrosa como se ha descrito en el Ejemplo de referencia 1, pero reemplazando el colágeno por una fracción de beta-glucano con el mismo peso.

El B-glucano se obtuvo en forma de polvo a partir de Sigma Chemical Company y se disolvió en agua helada al 2% p/v agitando durante una noche. La solución final se diluyó con un volumen igual de ácido acético 0,1 M para proporcionar una solución con una concentración final de 1% p/v en ácido acético 0,05 M. A continuación, se añadió a la ORC un peso conocido de la solución de b-glucano para proporcionar una relación final de 45% de ORC/55% de b-glucano en el material final. A continuación, se prepararon las esponjas como en el ejemplo 1.

Ejemplo de referencia 6: Preparación de una esponja de goma de algarrobo/ORC fibrosa

Se preparó una esponja de goma de algarrobo/ORC fibrosa como se ha descrito en el Ejemplo de referencia 1, pero reemplazando el colágeno por una fracción de goma de algarrobo con el mismo peso.

La goma de algarrobo se obtuvo en forma granular a partir de Sigma Chemical Company. Los gránulos se suspendieron en agua helada al 2% p/v. A continuación, la suspensión se calentó lentamente a 95ºC para solubilizar la goma. La solución resultante se centrifugó a 5000 g para aclarar la solución y eliminar los fragmentos insolubles de la cáscara de la semilla. A continuación, se eliminó el material sobrenadante y se calculó el contenido en sólidos, después la solución se diluyó hasta tener una concentración final del 1% p/v mediante la adición de ácido acético 0,05 M. A continuación, se añadió a la ORC un peso conocido de la solución de goma de algarrobo para proporcionar una relación final de 45% de ORC/55% de goma de algarrobo en el material final. A continuación, se prepararon las esponjas como en el ejemplo 1.

Ejemplo 1: Preparación de una esponja de quitosano/ORC fibrosa

Se preparó una esponja de quitosano/ORC fibrosa como se ha descrito en el Ejemplo de referencia 1, pero reemplazando el colágeno por una fracción de quitosano con el mismo peso.

El polvo de quitosano de calidad práctica se obtuvo a partir de Sigma Chemical Company. El polvo se disolvió en agua helada hasta una concentración del 2% p/v. Después, la solución se diluyó hasta 1% p/v de quitosano mediante la adición de un volumen igual de ácido acético 0,1 M. A continuación, se añadió a la ORC un peso conocido de la solución de quitosano para proporcionar una relación final de 45% de ORC/55% de quitosano en el material final. A continuación, se prepararon las esponjas como en el ejemplo 1.

Ejemplo 2: Preparación de una película de quitosano/ORC

Una película de quitosano/ORC para aplicar sobre una herida se prepara del modo siguiente.

Se mezclaron 15 gramos de quitosano en polvo en 1,5 litros de agua hasta que estuvieron bien integrados. Se incorporaron 2 gramos de glicerol en la mezcla. A continuación, se añadieron 15 gramos de fibras de ORC

preparadas como se ha descrito en el Ejemplo 1 mezclando con alto nivel de cizallamiento. La mezcla resultante se vertió a continuación en el fondo de una bandeja de PTFE hasta un tener un espesor de aproximadamente 5 mm y se secó al aire para formar películas del complejo ORC/quitosano.

Ejemplo 3

Se preparó un gel para el tratamiento de heridas para aplicación tópica sobre a una herida del modo siguiente. Las fibras de ORC se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 1 y las fibras resultantes se dispersaron hasta tener una concentración del 2% p/p en un gel acuoso de carboximetilcelulosa (CMC) al 3% p/p que contenía 2% en peso de cloruro de quitosano disuelto.

Procedimiento 1: Unión del factor de crecimiento derivado de plaquetas

Los estudios de unión de PDGF se llevaron a cabo del modo siguiente:

Se pesaron secciones pequeñas de material de la prueba (cuadrados de aproximadamente 1 cm^2 de tejido de ORC INTERCEED (RTM), y secciones de aproximadamente 1 cm x 0,5 cm x 0,4 cm de las esponjas liofilizadas) y se empaparon en tampón dibásico de fosfato de sodio 100 mM que contenía cloruro de sodio 150 mM (volumen total 1 ml) durante al menos una hora a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 22 ng de PDGF a cada muestra en 250 µl de PBS que contenía BSA al 2%, y las muestras se incubaron después durante una hora más a 37ºC. A continuación, cada muestra se lavó después tres veces con 250 µl de PBS, seguido de concentraciones crecientes de cloruro de sodio. Finalmente, cada muestra se lavó con urea 4,0 M. Se llevaron a cabo análisis ELISA de PDGF de la preparación de PDGF original y los diversos lavados. Los resultados eran los siguientes:

Polisacárido + ORC	Protección de PDGF	Liberación de PDGF	Comentarios
Quitosano	si	si	50% liberado y conserva la actividad durante 96 horas
Alginato	?	no	Dado que se no liberó nada de GF, no se podía decir si estaba protegido
Hialuronato	no	si	80% liberado durante 96 horas pero inactivo - no estaba protegido
Pectina	no	si	40% liberado durante 96 horas pero inactivo - no estaba protegido
Beta-glucano	?	no	Dado que no se liberó nada de GF, no se podía decir si estaba protegido
Goma de algarrobo	?	no	Dado que no se liberó nada de GF, no se podía decir si estaba protegido

Se puede observar que los materiales de quitosano/ORC se unen bien al PDGF y liberan el PDGF unido con una pérdida de actividad relativamente pequeña. Esto es útil para la curación de heridas, ya que permite que los materiales actúen como reservorios de PDGF en el sitio de la herida, fijando el PDGF y luego liberándolo de nuevo en la herida a medida que el material se biodegrada *in vivo.* Ninguno de los otros complejos de ORC/polisacárido estudiados tiene esa característica.

Procedimiento 2: Inhibición de la elastasa

Los niveles de elastasa obtenida a partir de neutrófilos presentes en las muestras de líquido de heridas, se midieron espectrofluorimétricamente usando ensayos de la actividad del sustrato. Los sustratos comprenden péptidos cortos sintetizados para imitar el sitio de escisión enzimático apropiado y contienen un grupo indicador fluorescente que se libera tras la hidrólisis. La actividad enzimática se determinó midiendo la tasa de producción del compuesto fluorimétrico, 7-amino 4-metil cumarina. La actividad se expresaba como unidades de fluorescencia relativa por minuto (RFU/min) o cambio en la fluorescencia cuando se corregía para la proteína total (RFU/min/mg de proteína). Cada muestra se sometió al ensayo 6 veces y se calculó el valor promedio. El sustrato se preparó con una concentración de almacenamiento de 10 mM y se diluyó hasta tener una concentración de trabajo de 0,5 mM en el tampón de ensayo apropiado. La mezcla de reacción, combinada en un pocillo de microtitulación (negro, fondo plano) comprendía 5 µl de líquido de heridas, 175 µl de tampón de ensayo y 20 µl de sustrato (concentración final 50 µM). La placa de microtitulación se leyó inmediatamente a 455 nm (excitación 383 nm) y a intervalos cronometrados durante

la siguiente hora; entre las lecturas, la placa se cubrió y se incubó a 37°C. La actividad similar a elastasa derivada de los neutrófilos se estimó utilizando el sustrato fluorimétrico metoxi - alanina - alanina - prolina - valina 7-amino 4-metil cumarina (Bachem GB, Ltd.) solubilizado en metanol. El tampón del ensayo requerido para una actividad óptima de esta enzima era Hepes 0,1 M, pH 7,5 que contenía NaCl 0,5 M y dimetilsulfóxido al 10%.

Se utilizó una muestra de la esponja de colágeno/ORC preparada como se ha descrito en el Ejemplo de referencia 1 como control positivo. Se utilizó una muestra de gasa de SOF-WICK (marca registrada) como control negativo.

Los resultados se muestran en la Fig. 1. Se puede observar que el complejo de acuerdo con la presente invención proporciona una inhibición significativa de la actividad elastasa después de 2 y 24 horas.

Procedimiento 3: Inhibición de la colagenasa

Los niveles de metaloproteinasas matriciales presentes en las muestras de líquido de heridas se midieron espectrofluorimétricamente usando ensayos de actividad del sustrato. Los sustratos comprenden péptidos cortos sintetizados para imitar el sitio de escisión enzimática apropiado y contienen un grupo indicador fluorescente que se libera tras la hidrólisis. La actividad enzimática se determinó midiendo la tasa de producción del compuesto fluorimétrico, 7-amino 4-metil cumarina. La actividad se expresaba como unidades de fluorescencia relativa por minuto (RFU/min) o cambio en la fluorescencia cuando se corregía para la proteína total (RFU/min/mg de proteína). Cada muestra se sometió al ensayo 6 veces y se calculó el valor promedio. El sustrato se preparó con una concentración de almacenamiento de 10 mM y se diluyó hasta tener una concentración de trabajo de 0,5 mM en el tampón de ensayo apropiado. La mezcla de reacción, combinada en un pocillo de microtitulación (negro, fondo plano) comprendía 5 µl de líquido de heridas, 175 µl de tampón de ensayo y 20 µl de sustrato (concentración final 50 µM). La placa de microtitulación se leyó inmediatamente a 455 nm (excitación 383 nm) y a intervalos cronometrados durante la siguiente hora; entre las lecturas, la placa se cubrió y se incubó a 37°C. La actividad similar a metaloproteinasa matricial se estimó utilizando el sustrato succinil - glicina - prolina - leucina - glicina - prolina 7-amino 4-metil cumarina (Bachem, GB, Ltd.) solubilizado en metanol. El tampón del ensayo necesario para una actividad máxima de MMP era Tris/HCl 40 mM, pH 7,4 que contenía NaCl 200 mM y $CaCl_2$ 10 mM.

Se utilizó una muestra de esponja de colágeno/ORC preparada como se ha descrito en el Ejemplo de referencia 1 como control positivo. Se utilizó una muestra de gasa SOF-WICK (marca registrada) como control negativo.

Los resultados se muestran en la Fig. 2. Se puede observar que el complejo de acuerdo con la presente invención proporciona una inhibición rápida de la actividad colagenasa y una inhibición casi completa después de 2 y 24 horas.

Los ejemplos anteriores se entiende que tienen únicamente fines ilustrativos. Muchas otras realizaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas serán evidentes para el lector especializado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de apósito para heridas que comprende un quitosano, una celulosa oxidada y desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5% en peso sobre una base de peso seco de una o varias sustancias terapéuticas para la curación de heridas.

2. Una composición de apósito para heridas según la reivindicación 1, en la que el quitosano y la celulosa oxidada se mezclan íntimamente en la composición de apósito para heridas.

3. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha celulosa oxidada está en forma de fibras dispersas o polvo.

4. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha celulosa oxidada y dicho quitosano se dispersan en un vehículo semisólido o sólido para una aplicación tópica.

5. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la celulosa oxidada comprende celulosa regenerada oxidada (ORC).

6. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la celulosa oxidada y el quitosano juntos constituyen al menos un 25% en peso del material sobre una base de peso seco.

7. Una composición de apósito para heridas según la reivindicación 6, en la que la celulosa oxidada y el quitosano juntos constituyen al menos un 50% en peso del material sobre una base de peso seco.

8. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición es una película flexible.

9. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la relación en peso entre quitosano y celulosa oxidada está en el intervalo de 1:4 a 4:1.

10. Un apósito para heridas que comprende una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Una composición de apósito para heridas según la reivindicación 1, en la que la sustancia terapéutica para la curación de heridas comprende un factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

12. Una composición de apósito para heridas según la reivindicación 2, en la que la composición se prepara a partir de una dispersión acuosa que comprende quitosano y celulosa oxidada dispersados en un disolvente y el pH de la dispersión está en el intervalo de aproximadamente 2 a 8.

13. Una composición de apósito para heridas según la reivindicación 1, en la que la sustancia terapéutica para la curación de heridas comprende un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

FIG. 1

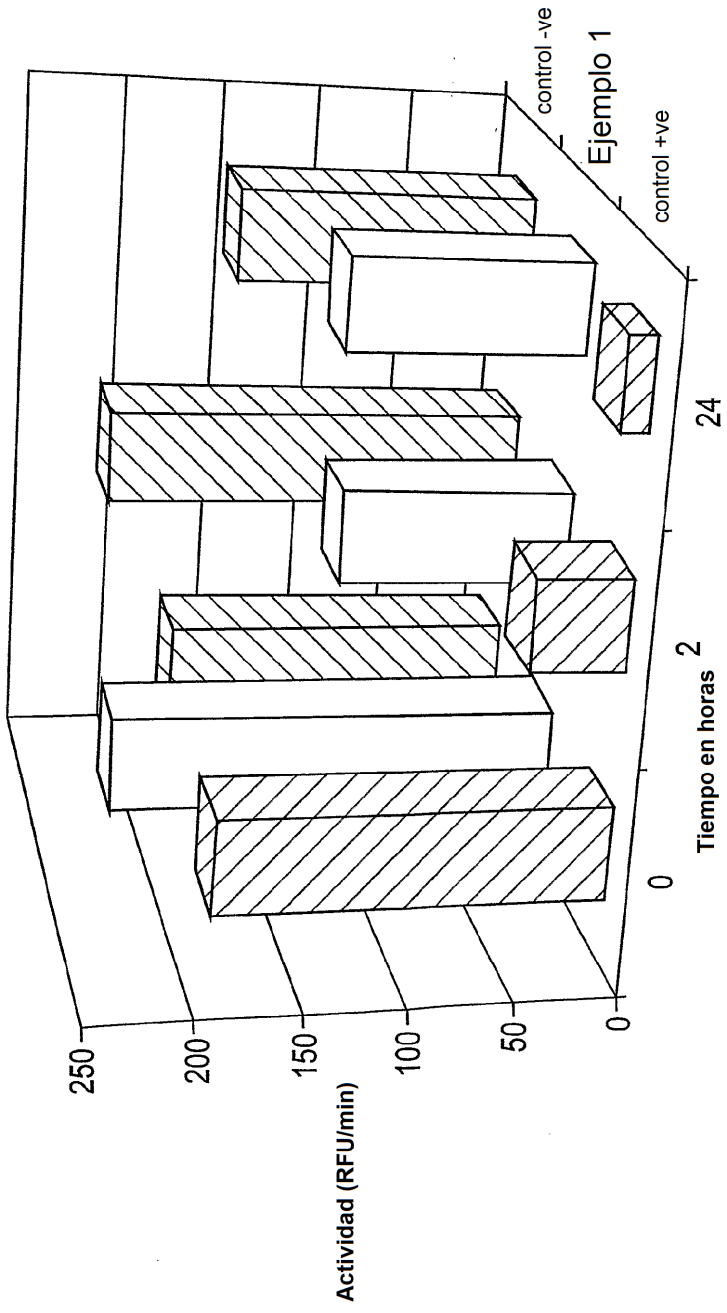
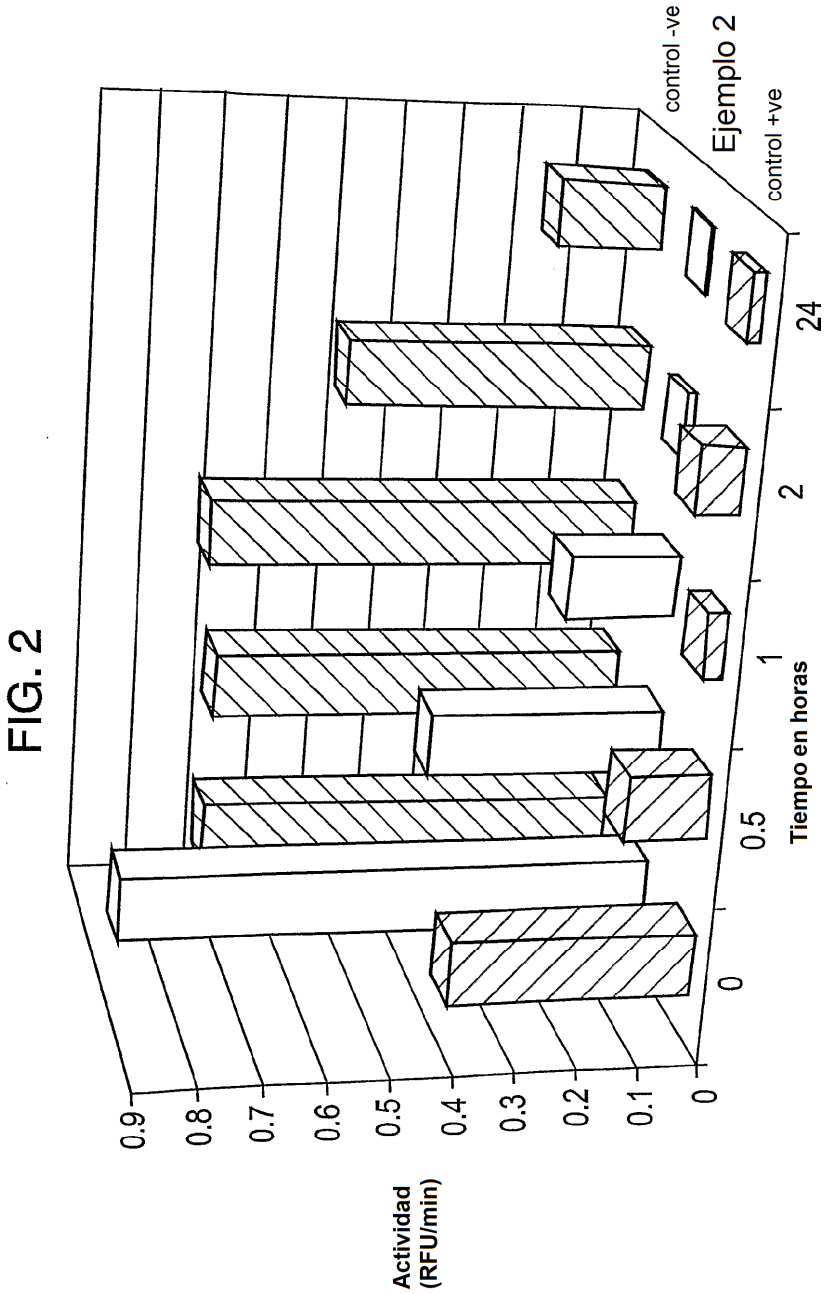

control -ve
Ejemplo 1
control +ve
24
2
0
Tiempo en horas
250
200
150
100
50
0
Actividad (RFU/min)

FIG. 2


Actividad (RFU/min)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
0.5
1
2
24
Tiempo en horas
control -ve
Ejemplo 2
control +ve