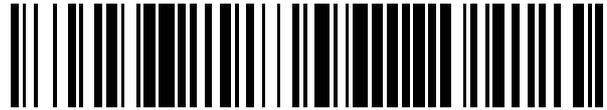


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 847**

51 Int. Cl.:

A61K 9/14 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61L 24/00 (2006.01)

A61L 24/04 (2006.01)

A61L 24/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.1998 E 98952952 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1041970**

54 Título: **Composiciones de microesferas para curar heridas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2013

73 Titular/es:

**POLYHEAL LTD. (100.0%)
42 Hayarkon Street North Industrial Zone
8122745 Yavne, IL**

72 Inventor/es:

**RITTER, VLADIMIR y
RITTER, MARINA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 435 847 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

Composiciones de microesferas para curar heridas.

5 **1. CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a composiciones de microesferas para su aplicación en heridas y a los procedimientos de utilización de dicha composición, ya sea por sí sola o combinada con otros agentes en el tratamiento de heridas.

10

2. ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La cicatrización de heridas es un proceso complejo que conlleva factores tales como células, componentes de la matriz extracelular y el microentorno celular. Esencialmente, la cicatrización de heridas conlleva la reparación o la sustitución de tejidos dañados incluyendo de manera no limitante piel, músculo, tejido neurológico, hueso, tejido blando, órganos internos o tejido vascular. La naturaleza concreta de tal reparación o sustitución depende de los tejidos involucrados, aunque cualquiera de estos procesos conlleva ciertos principios básicos. Un aspecto importante de la cicatrización de heridas es la velocidad a la que una herida gana resistencia a la tracción.

15

20

La piel está expuesta a tensión y elasticidad. La tensión de la piel es uno de los factores determinantes en la respuesta a una herida y varía con la edad y la zona. La piel está formada por diversas capas, incluyendo la queratina, la epidermis y la dermis, y contiene células, una red fibrosa compuesta por colágeno y elastina y una sustancia fundamental amorfa consistente en polisacáridos, glucoproteínas, proteínas globulares, sales y agua. Si solamente la epidermis resulta dañada, como en la mayoría de las lesiones menores, los queratinocitos migran hacia el exterior de la piel y cubren la herida, reformando la epidermis y la queratina (Knighton, D.R. and Fiegel, V. D., 1991, Invest. Radiol: 26:604-611).

25

30

Si todas las capas de la piel resultan dañadas o destruidas, un nuevo tejido conectivo, llamado tejido granulatorio, rellena el espacio de la herida. Este tejido se forma por la deposición de componentes de la matriz extracelular como, por ejemplo, colágeno, o por fibroblastos que migran al espacio de la herida. La síntesis y la deposición de colágeno es un hecho importante en la cicatrización de heridas y la velocidad de la síntesis de colágeno varía según los órganos (Haukipuro, K. Et al., 1991, Ann. Surg. 213:75-80).

35

El proceso de cicatrización de heridas conlleva múltiples etapas y debe completarse totalmente para la correcta cicatrización de la herida. Si se pierden uno o más de estos componentes, la cicatrización no tendrá lugar, la piel no se reparará y la herida quedará abierta. Estas heridas abiertas se pueden infectar con facilidad y, además, retrasan el proceso de cicatrización y provocan la formación de úlceras y llagas en la piel. El proceso de cicatrización de heridas resulta, además, inhibido en muchos pacientes por la presencia de otras condiciones complicantes, incluyendo de manera no limitante la diabetes o una edad avanzada. Los pacientes en estas condiciones tienden a tener heridas en la piel que se ulceran y no se curan, o curan lentamente tras un largo período de tiempo.

40

45

Se han utilizado diversos tratamientos para acelerar la velocidad a la que las heridas se curan (patentes U. S. 4,772,591 y U. S. 4,590,212) y varios vehículos farmacéuticos se han utilizado para llevar agentes quimioterapéuticos a la herida como, por ejemplo, cremas, geles, polvos y microesferas. La patente U. S. 5,264,207 describe microesferas de un polímero que actúan como vehículos para una o más sustancias farmacéuticas o cosméticas activas. Las microesferas del polímero son sólidas o huecas, insolubles en el vehículo líquido y de dimensiones diferentes, aunque no exceden los 1000 nm (1µm), y cuyos tamaños, preferentemente, oscilan entre los 50 y los 500 nm (de 0,05 µm a 0,5 µm) y, más preferentemente, entre los 60 y los 300 nm (de 0,06 µm a 0,3 µm). La finura de las microesferas permite aumentar el área específica por unidad de peso y una mayor combinación de las microesferas con sustancias activas sin la desventaja de los excipientes convencionales que obstruyen los poros de la piel. Además, según la invención descrita en la patente U. S. 5,264,207, se puede obtener una suspensión de las microesferas en la que se absorba una sustancia activa, otra sustancia se une a la microesfera por enlaces químicos, con la posibilidad de una tercera sustancia que se une a las microesferas por enlaces electrostáticos o iónicos (Col. 2, líneas 58 – 63). Cuando las microesferas son huecas, son absorbedoras y / o portadoras de grupos funcionales (Col. 3, líneas 18 – 21). Cuando las microesferas contienen poros, la adhesión a sustancias farmacéuticas o cosméticas consiste en la adsorción en los poros (Col. 3, líneas 26 – 28). Además, la patente U. S. 5,264,207 describe una composición de microesferas que actúan únicamente como vehículos de sustancias farmacéuticas y / o cosméticas y no muestran ni sugieren el uso de las microesferas por sí mismas para mejorar la cicatrización de heridas.

50

55

60

65

Igualmente, las solicitudes de patentes internacionales PCT WO96/13164 y WO94/13333 describen microesferas hechas de un material que cataliza la producción o liberación de ciertas sustancias terapéuticas. La solicitud de patente internacional PCT WO96/13164 describe aductos poliméricos de óxido nítrico que liberan óxido nítrico cuando se aplican directamente en tejidos dañados. La solicitud de patente internacional PCT WO94/13333 describe partículas que han sido modificadas químicamente para tener actividad de radical libre en la zona de la herida. Además, ninguna de las referencias muestra o sugiere el uso de las microesferas por sí mismas como

sustancia terapéutica sin modificación química del material de la microesfera.

El tamaño de las microesferas se empleó para influir en el efecto de las microesferas como vehículos para el aloantígeno de clase I utilizado en la activación de linfocitos T citotóxicos (Mescher, M. F., 1992, J. Immunol 149:2420 – 2405). La respuesta dependía del antígeno de clase I presente en el tamaño adecuado de microesferas de 4 o 5 μm de diámetro (4000 nm o 5000 nm). En otras palabras, Mescher describe que la activación de linfocitos T *in vitro* no sería posible de conseguir únicamente con microesferas, sino con la clase exigida de antígeno de clase I para inducir la activación. El antígeno reaccionó correctamente cuando se unió a microesferas de 4 o 5 μm de diámetro, es decir, 4 o 5 veces más grandes en tamaño a las microesferas utilizadas en la patente U.S. 5,264,207, emitida a nombre de Bommelser, J., et al. En Mescher no se muestra ni se sugiere el uso de microesferas por sí mismas sin el componente activo, antígeno de clase I, en la activación de la cicatrización de heridas. De hecho, Mescher no considera ni sugiere en absoluto el papel de las microesferas y los linfocitos T citotóxicos en la cicatrización de heridas y la síntesis de colágeno. Además, Bommelser rechaza el uso de microesferas superiores a 1000 nm o 1 μm de tamaño, ya que podrían obstruir los poros de la piel. Por lo tanto, la presente invención no es ni inherente (debido a la diferencia de los ingredientes de las composiciones anteriores) ni evidente (debido a que el tamaño de las microesferas empleadas se supondría a partir de composiciones anteriores para obstruir los poros de la piel) de las composiciones anteriores.

La patente U.S. 5,092,883 se refiere generalmente a materiales para fomentar la formación de tejidos conectivos duros y blandos de mamíferos. Específicamente, se presenta que las gotas biodegradables de dextrano (por ejemplo Sephadex), con partículas de un tamaño que oscila entre los 40 – 120 μm muestran diferentes grupos funcionales positivos o negativos. Las gotas pueden utilizarse para preparar una pasta o mezcla espesa, o puede utilizarse en una suspensión. También se presenta que el tratamiento de heridas con gotas de carga positivas su significativamente más exitoso que el tratamiento con gotas sin carga o cargadas negativamente.

La patente U.S. 5,565,206 concierne el ámbito de las aplicaciones dentales y resuelve el problema de los deterioros dentales causados por bacterias en la boca presentando una composición para la higiene bucal que comprende microesferas de poliestireno con un diámetro que oscila entre 0,05 y 1 μm y una carga superficial externa para la interacción electrostática con clorhexidina. Durante la preparación de la composición, se añadió una suspensión de microesferas de poliestireno a una solución de clorhexidina para conseguir una concentración final de 0,54 mg / ml.

El procedimiento de cicatrización de una herida incluye una fase inicial proliferativa que favorece el metabolismo y la proliferación celular rápidas, la eliminación de residuos, la movilización de fibroblastos y la restauración de la circulación. Es durante esta fase que la herida es más susceptible a infecciones. Durante la siguiente fase (también llamada fase fibroblástica) de la cicatrización de la herida, el incremento de la fuerza de tracción iguala el aumento de colágeno que contiene la herida. Por tanto, permanece la necesidad de desarrollar composiciones para la cicatrización de heridas que contengan microesferas no biodegradables y otros componentes extracelulares capaces de favorecer la fase proliferativa y regular la fase fibroblástica *in situ*.

Por consiguiente, debe existir un balance entre el aumento de la fase proliferativa y el inicio de la fase fibroblástica durante la cicatrización de heridas en animales y seres humanos en condiciones diferentes que incluyen de manera no limitante los tejidos quemados, infecciones post-quirúrgicas, deshidratación post-quirúrgica, úlceras internas, hemorragia, gangrena ósea, llagas de presión, decúbito, áreas con riesgo de amputación, úlceras traumáticas no cicatrizadas, cosméticos, *after shave*, tratamientos dentales, úlceras crónicas (por diabetes, venas varicosas o tras una apoplejía), destrucción de tejido por radiación, heridas por lesiones espinales, heridas ginecológicas, heridas químicas, heridas por enfermedades vasculares, llagas en la piel por diabetes, pie diabético, trauma físico, áreas de sutura post-cirugía plástica, quemaduras solares o episiotomías.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

Es objeto de la presente invención producir una composición terapéutica que pueda favorecer la cicatrización de heridas y que pueda funcionar como apósito de una herida o lesión cuando se aplique alrededor y en la herida o lesión.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que pueda funcionar como apósito de una herida que servirá para favorecer la regeneración de músculo, piel, cartílago, tejido neurológico, tejido blando o tejido vascular.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que pueda funcionar como recubrimiento de una herida o lesión, es decir, que cuando esté húmeda, se adhiera y permanezca en contacto con el área de la herida o lesión sin necesidad de un adhesivo potencialmente tóxico.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que pueda servir como medio para las microesferas y como sistema de liberación de fármacos para agentes farmacéuticos.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que servirá para favorecer la fusión de mioblastos.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que servirá para favorecer la síntesis de colágeno *in vivo* e *in vitro*.

5 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que prevendrá la formación de cicatrices.

10 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y factores de crecimiento exógenos añadidos que servirán para favorecer la cicatrización de heridas.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y agentes antiinflamatorios.

15 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y antibióticos.

20 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y vitaminas.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y minerales.

25 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y agentes anticancerígenos, antivirales y antifúngicos.

30 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas con o sin sustancias activas y que se aplique como terapia adyuvante en cirugía, terapias de radiación, terapias hormonales o quimioterapia.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y un analgésico, anestésico o astringente.

35 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y colágeno.

40 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y uno o más de los agentes seleccionados del grupo formado por antiinflamatorios, antihistamínicos, antibióticos, antisépticos, antifúngicos, analgésicos, anestésicos, minerales, vitaminas, agentes astringentes y colágenos.

Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y células estromales que servirán para favorecer la cicatrización de heridas.

45 Es también objeto de la presente invención proporcionar una composición que incluya microesferas y células estromales modificadas genéticamente que expresan un producto génico beneficioso para conseguir y / o favorecer la cicatrización de heridas. Por ejemplo, en el caso de llagas diabéticas, los fibroblastos pueden modificarse genéticamente para expresar factor de crecimiento de insulina (FCI) o productos génicos anticoagulantes para reducir el riesgo de aterosclerosis, oclusión; o productos génicos antiinflamatorios para reducir el riesgo de fallos de cicatrización. Alila, H. et al., 1997, Human gene Ther. 8:1785-1795; and Pickering, J. G. et al., 1996, Semin. Interv. Cardiol. 1;84-88.

Una composición conservada para su almacenaje y posterior mezcla a partir de la cual la composición se puede rociar y aplicar en la superficie de una herida, dicha composición comprende:

55 - Aproximadamente 0,001 – 25 % en peso de microesferas no biodegradables en suspensión, en la que dichas microesferas:

60 - Tienen un diámetro que oscila entre 0,01 μm y 200 μm ;
 - Muestran grupos superficiales con carga negativa;
 - Son capaces de formar puntos de contacto múltiples con una membrana celular
 - Están hechas de un material seleccionado del grupo formado por poliestireno, poliestireno derivado, bromuro de poli – 4 – vinil N – etilpiridinio, polimetilacrilato y silicona;

65 - Un agente farmacéutico y
 - Un vehículo farmacéuticamente aceptable para dichas microesferas, que son sustancialmente insolubles en dicho vehículo para su uso en el tratamiento de una herida.

Según una realización, el vehículo farmacéutico se selecciona del grupo formado por un medio acuoso, un vehículo en aerosol, un solvente acuoso para agentes farmacológicos, un solvente acuoso para fenómenos biológicos, pomadas y vendajes.

- 5 Según otra realización, el agente farmacéutico se selecciona del grupo formado por:
- Un antibiótico, el antibiótico se selecciona, en la forma preferente, del grupo formado por tetraciclina, oxitetraciclina, sulfato de gentamicina, sulfato neomicina, bacitracina, sulfato de polimixina B y gramaciclina.
 - 10 - Un antihistamínico
 - Un agente antiinflamatorio
 - Un agente anticancerígeno
 - Un agente antiviral
 - Un agente antifúngico
 - 15 - Un ion metálico, preferentemente seleccionado del grupo formado por zinc, magnesio, cobalto, hierro, cobre y manganeso
 - Un astringente
 - Un anestésico, preferentemente seleccionado del grupo formado por lidocaína, procaína y epinefrina
 - Un analgésico, preferentemente seleccionado del grupo formado por morfina, heroína y fentanilo
 - 20 - Un inhibidor de la ciclooxigenasa – 2
 - Una vitamina
 - Un aminoácido
 - Un colágeno
 - Un factor de crecimiento, preferentemente seleccionado del grupo formado por PDGF, PDAF, PDEGR, TBFB, PF - 4, FGF, BFGF, GH, EGF y IGF
 - 25 - Una enzima proteolítica
 - Una o más células estromales
 - Un potenciador inmunológico, seleccionado del grupo formado por L – arginina, óxido nítrico, Quadrol, muramil dipéptido y otros factores activadores de macrófagos, o
 - 30 - Ácido hialurónico

Según la presente invención, se proporciona un recipiente que contiene una composición para su utilización en el tratamiento de una herida según las realizaciones anteriormente descritas.

35 **4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La presente invención podrá comprenderse mejor, al igual que las ventajas de la misma, gracias a la descripción detallada que sigue y a las figuras acompañantes, en las que:

- 40 La Fig.1 es una gráfica que muestra la habilidad de las microesferas de la presente invención para incrementar la actividad de la creatina fosfoquinasa;
- La Fig. 2 es un gráfico de barras que ilustra el efecto de las microesferas de la presente invención en la síntesis de colágeno;
- 45 Las figuras 3A – 3C ilustran el efecto de las microesferas de la presente invención en la forma del bioblasto;
- Las figuras 4A – 4D ilustran la habilidad de las microesferas para favorecer la cicatrización de heridas en ratas;
- La Fig. 5 es una gráfica que muestra la velocidad a la que disminuye la herida de la Figura 4;
- La Fig. 6A y la Fig. 6B comparan el efecto de las microesferas de la presente invención en la cicatrización de heridas con medios de cultivo de tejidos y solución salina en ratas;
- 50 Las figuras 7A – 7D demuestran la habilidad de las microesferas de la presente invención para favorecer la cicatrización de heridas en un primer caso de estudio humano;
- La Fig. 8A y la Fig. 8B demuestran igualmente la eficacia de la presente invención en el caso de estudio humano de las figuras 7A – 7D.
- La Fig. 9A y la Fig. 9B demuestran la eficacia de la presente invención en un segundo caso de estudio humano;
- 55 Las figuras 10A – 10D muestran el efecto de la presente invención en un tercer caso de estudio humano; y
- La Fig. 11A y la Fig. 11B muestran la eficacia de la presente invención en un cuarto caso de estudio humano.
- Las figuras 12A – 12D describen el efecto de la presente invención en un individuo cuando se suministra junto a una terapia de radiación o quimioterapia.

60 **5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

- La presente invención se relaciona con composiciones terapéuticas que favorecen la cicatrización de heridas mediante microesferas. Inesperadamente, las microesferas del tamaño en particular descrito en el presente documento son capaces de favorecer la cicatrización de heridas sin necesidad de añadir o incluir fármacos u otras sustancias terapéuticas. De hecho, como se describe a continuación, estas microesferas no se degradan ni se someten a otras alteraciones químicas para producir su efecto terapéutico. Las microesferas que forman parte de la presente invención también pueden administrarse como terapia adyuvante a terapias convencionales, por ejemplo,

radiación, quimioterapia, hormonas, láser, terapia hiperbárica u ozonoterapia.

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS MICROESFERAS

5 La estructura de estas microesferas incluye un núcleo de material y, al menos, un tipo de grupo superficial cargado presente en, al menos, el exterior de la microesfera. Entre los ejemplos de materiales se incluyen polímeros de cadena larga como poliestireno, polimetilmetacrilato (PMMA), silicona y poliestireno derivado. Entre los ejemplos de grupos superficiales se incluyen sulfato, bromuro de poli - 4 - vinil N - etilpiridinio, protamina, sulfato de protamina, sales de protamina, polilisina, carboxilo y poliestireno. Estos grupos superficiales pueden presentarse como parte del núcleo de material o se pueden añadir después mediante procesos químicos como la derivación del polímero de cadena larga. En lo sucesivo el término "derivación" se refiere al proceso de alterar, modificar o cambiar químicamente una molécula o una porción de esta. Las microesferas producidas a partir de polímeros deberían ser sustancialmente insolubles en medio acuoso, en lugar de formar una suspensión o dispersión en dicho medio.

15 Para aclarar en profundidad los parámetros de la presente invención, se deberían definir ciertos términos. En lo sucesivo, los términos "herida" o "lesión" incluyen cualquier daño en cualquier parte del cuerpo de un sujeto, incluyendo de manera no limitante condiciones agudas como quemaduras térmicas, químicas, por radiación o quemaduras causadas por una exposición excesiva a la radiación ultravioleta como las solares, daños en el tejido corporal como en el perineo tras un parto, incluyendo daños experimentados durante procedimientos médicos como episiotomías, daños inducidos por trauma tales que cortes, daños sufridos en accidentes de tráfico y otros accidentes mecánicos, y aquellos daños causados por balas, cuchillos y otras armas, y las lesiones post - quirúrgicas, así como las condiciones crónicas tales que llagas de presión, úlceras de decúbito, condiciones relacionada con la diabetes y la mala circulación y todos los tipos de acné. Las áreas del cuerpo que pueden tratarse con la presente invención incluyen de manera no limitante piel, músculo, tejido neurológico, hueso, tejido blando, tejido vascular y órganos internos. En lo sucesivo, el término "sujeto" se refiere a un mamífero humano o a un animal inferior en el que se ha llevado a cabo la presente invención.

30 En lo sucesivo, el término "favorecer" incluye la aceleración y el aumento. En lo sucesivo, "reducir la formación de cicatrices" incluye la prevención o la reducción de la formación de cicatrices como las queloides y las hipertróficas, así como la reducción de la extensión de la formación de tejido cicatrizado tanto externamente en la piel del sujeto como internamente en adhesiones. Finalmente, cabe señalar que el método de la presente invención puede utilizarse también cosméticamente para prevenir el exceso de formación de cicatrices en un corte u otra herida de la piel así como en la piel del rostro, y para tratar el acné. En el sentido cosmético, el término "exceso de formación de cicatrices" incluye cualquier formación de cicatrices que resulta cosméticamente indeseable o inaceptable.

40 Aunque la exposición descrita a continuación se refiere a tipos específicos de microesferas, cabe señalar que esta no es de ninguna manera limitante. Los expertos en la materia podrán apreciar que estas microesferas, más generalmente, pueden ser gotas, partículas o glóbulos sólidos o huecos. En las realizaciones preferentes de la presente invención, estas microesferas se dispersan en un vehículo farmacéuticamente aceptable en el que los agentes son sustancialmente insolubles, como una suspensión en medio acuoso, por ejemplo, o en un medio no acuoso como una pomada, un spray en aerosol o un vendaje que puede ser oclusivo o no oclusivo. La forma de las microesferas puede ser regular, como esférica, elíptica u otras formas no esféricas regulares; o irregulares, de manera que la superficie no es una única curva continua o de manera que la superficie no sea lisa.

45 Además, las microesferas pueden tener una mezcla de diferentes polímeros y pueden ser también una mezcla de diferentes partículas, gotas o glóbulos de diferentes tamaños. Los agentes también pueden tener poros de diferentes tamaños.

50 A modo de ejemplo, el polímero de cadena larga que forma los agentes puede ser reticulado y favorecer particularmente la forma esférica de una microesfera, aunque dicha forma se puede obtener igualmente sin reticulación. Un ejemplo de un método de fabricación de una microesfera de poli - β - alanina reticulada se describe en la patente U.S. 5,077,058, aunque cabe señalar que este material requeriría más derivación para obtener una carga superficial total de la microesfera.

55 De manera alternativa, las partículas pueden tener formas irregulares caóticas, particularmente si el polímero no está reticulado. La partícula puede tener cualquier forma, como enrollada, globular extendida y enrollada irregular. Preferiblemente, el polímero no debería ser reactivo bioquímicamente. El polímero no es biodegradable, de manera que permanece sin degradar durante el período requerido para la cicatrización de la herida. En lo sucesivo, el término "no biodegradable" se refiere a los agentes que no son biodegradables durante el período de tratamiento, que es el período de tiempo requerido para el tratamiento de la herida.

Por último, los agentes deberían tener las siguientes propiedades:

65 1. Deberían ser capaces de favorecer la curación de heridas sin alteración o degradación químicas significativas; y

2. Deberían ser sustancialmente insolubles en medios acuosos tales que fluidos corporales y, en su lugar, deberían formar una suspensión.

Las microesferas son capaces de formar puntos de contacto múltiples con una membrana celular. Estas características son importantes ya que, como se expone a continuación, el efecto de los agentes de la presente invención parece estar directamente relacionado con la formación de puntos de contacto múltiples entre el material de los agentes y una parte de la célula como la membrana celular externa, formando así una superficie adherente para que las células se adhieran a ella. Estos puntos de contacto múltiples son posibles con muchos polímeros diferentes que permiten a los grupos cargados ser accesibles para la interacción con moléculas y partes de la membrana celular externa. Por lo tanto, aunque la siguiente descripción se centra en un tipo de agente, las microesferas, debe entenderse que la presente invención abarca cualquier material capaz de formar tales puntos de contacto múltiples.

Como se ha especificado anteriormente, la microesfera tiene un diámetro que oscila entre 0,01 micrones y 200 micrones, preferiblemente entre 1 y 100 micrones y, más preferiblemente, entre 2 y 20 micrones. La composición de la microesfera de la presente invención comprende del 0,001 % al 25 % en peso en suspensión. Sin estar ligado a ningún mecanismo en particular, cabe señalar que, en la forma preferente, estos son los mejores tamaños para permitir la absorción de las microesferas por los macrófagos infiltrados en el área de la herida. Las microesferas parecen atraer y activar realmente los macrófagos a través del contacto con, al menos, una parte de los macrófagos, probablemente las moléculas de la membrana celular externa del macrófago. Los efectos antiinflamatorios y antibacterianos observados en las microesferas son, por consiguiente, efectos presumiblemente indirectos, obtenidos por la activación de los macrófagos y otras células.

Otra propiedad importante de las microesferas es la carga de los grupos superficiales. La carga total que conllevan ciertos ejemplos preferidos de microesferas se midió como Z o potencial zeta por movilidad electroforética (milivoltios) por un ZetaMaster (Malvern Instruments, Reino Unido). El alcance de potenciales Z medidos en algunas realizaciones ejemplificadas a continuación fue de -29,58 mV a -79,76 mV. En lo sucesivo, el término "cargado" se refiere a un potencial Z con un valor absoluto de, al menos, 1 mV y, preferiblemente de, al menos, 10 mV, tanto negativo como positivo.

Las microesferas en las suspensiones probadas no se agregaron, fusionaron, agruparon o coagularon de manera irreversible. Aunque las microesferas se establecieron en cierta medida, se resuspendieron fácilmente con una simple agitación.

Las microesferas de la presente invención son similares a un vendaje o medio líquido que puede aplicarse alrededor de una herida o en una herida. Las microesferas se conservan en un recipiente estéril en una atmósfera de argón, neón o nitrógeno y con un pH óptimo y modificando la concentración y el volumen por procedimientos convencionales.

5.2 AGENTES FARMACOLÓGICOS Y BIOLÓGICOS

Pueden incluirse en las composiciones terapéuticas uno o más de los siguientes tipos de agentes farmacológicos en las microesferas no tratadas: antisépticos, astringentes, agentes antifúngicos, agentes antivirales, agentes anticancerígenos, antihistamínicos, antibióticos, coagulantes sanguíneos para su utilización en el campo de batalla, preparados vitamínicos y minerales, vitaminas, minerales o agentes antiinflamatorios.

Las sustancias biológicamente activas que pueden incluirse en la composición terapéutica incluyen de manera no limitante astringentes, antibióticos, oxidantes, enzimas proteolíticas, inhibidores de colágeno reticulado (por ejemplo diaminas-cistamina natural o sintética, putrescina, espermidina, cadaverina y similares), aminoácidos, factores estimulantes de macrófagos o anestésicos.

Se pueden añadir a la composición terapéutica factores de crecimiento y factores regulatorios para mejorar el proceso de cicatrización de heridas, ayudando en la formación de tejido granulatorio y reepitelización como, por ejemplo, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de angiogénesis derivado de plaquetas (PDAF), factor de crecimiento epidérmico derivado de plaquetas (PDEGF), factor de crecimiento transformante beta (TGFB), factor de plaquetas (PF - 4), factores de crecimiento de fibroblastos alfa y beta (α FGF y β FGF), hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento epidérmico (EGF) o factor de crecimiento de insulina (IGF).

Los factores de crecimiento derivados de plaquetas estimulan los sistemas cascada implicados en la cicatrización de heridas, especialmente durante las fases de formación de tejido granulatorio y de reepitelización. El factor de crecimiento transformante beta se refiere a una familia de proteínas diméricas relacionadas que regulan la proliferación y diferenciación de muchos tipos celulares (Massague, 1990, Ann. Rev. Cell. Biol. 6:597 - 619). El TGFB también incluye la producción de macromoléculas de cartílago específico en células musculares y condrocitos. Sin embargo, se ha descubierto que el TGFB inhibe la síntesis de colágeno de tipo II con condrocitos medulares de pollo (Horton et al., 1989, J. Cell Physiol. 141:8 - 15) y con condrocitos de rata (Rosen et al., 1988, J. Cell Physiol. 134:337 - 346). De hecho, el TGFB ha resultado ser un inhibidor prototípico de la proliferación de la mayoría de tipos celulares normales, tanto *in vitro* como *in vivo* (Alexandrow, A. G., et al., 1995, Cancer Res. 55:

1452 – 1457). El TGF β se ha purificado a partir de plaquetas de sangre humana y porcina y el TGF β recombinante se encuentra ahora disponible comercialmente (Gentry et al., 1988, Mol. Cell. Biol. 7:3418 – 3427). La insulina por sí sola es mucho menos potente que el IGF – I estimulando la síntesis de colágeno de la matriz. El EGF – II estimula la síntesis de ADN y ARN y es más potente que el IGF – I estimulando el crecimiento clonal en células fetales (McQuillan, et al., 1986, Biochem. J. 240:423 – 430). El factor de crecimiento epidérmico por sí mismo no tiene efecto alguno en la proliferación de condrocitos. Sin embargo, junto a la insulina, el EGF estimula de manera sinérgica la proliferación de condrocitos (Osborn, K. D., et al., 1989, J. Orthop. Res. 7:35 – 42).

Se han demostrado niveles elevados de peróxidos lipídicos en macrófagos activados, plaquetas agregadas y partículas subcelulares aisladas de tejido dañado. Los antioxidantes fuertes, los fármacos metabolizados a radicales libres y la radiación ionizante inducen prostaglandinas, leucotrienos (eicosanoides) y / o el aumento de lípidos peroxidados. Este aumento de eicosanoides y lípidos peroxidados puede ser una de la causa del daño del tejido o necrosis y del aumento de la reacción inflamatoria. La inclusión de fármacos antiinflamatorios, por ejemplo fármacos antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, indometacina, aspirina, acetaminofen, naproxeno, sulindaco) y específicamente los inhibidores de ciclooxigenasa – 2 (COX2), en la composición profiláctica y / o terapéutica pueden resultar útiles para todos los tejidos dañados, por ejemplo, en lesiones producidas por radiación en pulmón o hígado en las que la fibrosis es una consecuencia prominente de un daño prolongado o repetido. Además, la inclusión de antioxidantes (por ejemplo, de vitamina E) y necrófagos de radical libre (por ejemplo, glutatión reducido) pueden también resultar útiles.

Zinc – Se ha demostrado que tras un trauma, quirúrgico o no, la cantidad de zinc en sangre y tejidos puede descender a niveles bajos. Esto resulta particularmente notable en pacientes quemados. La administración de zinc es suficiente para restaurar los niveles normales de este micronutriente en sangre y los tejidos aumentan la velocidad de epitelización, la velocidad de recuperación de tensión de la herida y la síntesis de colágeno y otras proteínas. Numerosas enzimas son dependientes del zinc, particularmente la ADN – polimerasa y la reverso – transcriptasa. Los efectos de la disminución de zinc en la cicatrización de heridas son lo que cabría esperar si la cantidad de funciones de estas enzimas estuviera deprimida. La proliferación epitelial y de fibroblastos no se llevará a cabo, ya que la mitosis de estas células no puede tener lugar sin la ADN – polimerasa ni la reverso – transcriptasa. Por lo tanto, aunque estas células pueden migrar normalmente, no se multiplicarán, por lo tanto, no se llevará a cabo una epitelización adecuada y la síntesis de colágeno de los pocos fibroblastos que migran a la herida no podrá suplir las fibras necesarias para mantener la herida unida. En tal caso, el aumento de la concentración de zinc en sangre y tejidos hasta niveles normales restaurará la progresión normal de la cicatrización de la herida. Es objeto de la presente invención que en pacientes cuyos niveles de zinc en sangre y tejido sean bajos se administre zinc por vía oral, parenteral o tópica en la composición terapéutica que restaurará la cicatrización normal de la herida. El zinc se proporcionará en forma de sal seleccionada del grupo formado por cloruro de zinc, carbonato de zinc y / o gluconato de zinc.

Vitamina A y E – La vitamina A puede invertir parcialmente el desarrollo retardado del tejido granulatorio y las cantidades reducidas de colágeno en la cicatrización de heridas. La vitamina A aplicada por vía tópica mejora la epitelización en heridas retardadas por la administración de corticoesteroides, pero la deposición de colágeno se ve afectada por la vitamina A sistemática sola.

La vitamina E puede utilizarse para modificar la formación de cicatrices ya que tiene menos efectos secundarios que los de cantidades de hormonas esteroideas similares. En dosis altas, la vitamina E retrasa la cicatrización de heridas y la producción de colágeno, pero este efecto es anulado en presencia de vitamina A.

5.3. TERAPIA GÉNICA

La composición terapéutica de la presente invención puede permitir un vehículo para introducir genes y productos génicos *in vivo* para acelerar el proceso de cicatrización de heridas. Por ejemplo, para las llagas diabéticas, la composición terapéutica incluye las microesferas de la presente invención y células estromales modificadas genéticamente (por ejemplo, fibroblastos con o sin otras células y / o elementos encontrados en tejidos conectivos libres extraídos del sujeto, incluyendo de manera no limitante células endoteliales, pericitos, macrófagos, monocitos, células plasmáticas, mastocitos, adipocitos, etc.) que utilizan la modificación genética para expresar productos génicos anticoagulación para reducir el riesgo de tromboembolismo o productos génicos antiinflamatorios para reducir el riesgo de fallo debido a reacciones inflamatorias. Una vez modificadas genéticamente, las células se aplican en la zona de la herida, la presencia de los productos génicos antiinflamatorios, por ejemplo, péptidos o polipéptidos correspondientes al idiotipo de anticuerpos neutralizantes para el factor de necrosis de tumor (TNF), interleuquina – 2 (IL – 2) u otras citoquinas inflamatorias, pueden suponer una mejora de las reacciones inflamatorias asociadas a las enfermedades, incluyendo de manera no limitante tejidos quemados, infecciones post-quirúrgicas, úlceras de diabetes neuropática, úlceras de presión, úlceras venosas por estasis, tejidos quemados, infecciones post-quirúrgicas, deshidratación post-quirúrgica, úlceras internas, hemorragia, gangrena ósea, llagas de presión, decúbito, áreas con riesgo de amputación, heridas traumáticas no cicatrizadas, cosméticos, *after shave*, tratamientos dentales, úlceras crónicas (por diabetes, venas varicosas o tras una apoplejía), destrucción de tejido por radiación, heridas por lesiones espinales, heridas ginecológicas, heridas químicas, heridas por enfermedades vasculares, llagas en la piel por diabetes, pie diabético, trauma físico, áreas de sutura post-cirugía plástica,

quemaduras solares o episiotomías.

Preferiblemente, las células son modificadas para expresar productos génicos temporales y / o bajo control inducible durante la fase inicial de la cicatrización, o como proteína de fusión quimérica unidas a células estromales, por ejemplo, una molécula quimérica compuesta por una región intracelular y / o transmembrana de un receptor o una molécula similar a un receptor, fusionada al producto génico como la región extracelular. En otra realización, las células estromales podrían ser modificadas genéticamente para expresar un gen para el que un paciente es deficiente, o que ejercería un efecto terapéutico como, por ejemplo, HDL, apolipoproteína E, etc. Los genes de interés convertidos en células estromales necesitan estar relacionados con la enfermedad que está siendo tratada.

Las células estromales pueden ser modificadas utilizando un constructo de ADN recombinante que contiene el gen utilizado para transformar o transfectar una célula portadora que se clona y se expande en el sistema de cultivo. El cultivo que expresa el producto génico activo podría implantarse en un individuo que tiene una deficiencia de ese producto. Por ejemplo, los genes que previenen o mejoran los síntomas vasculares de varios tipos pueden expresarse o disminuir en condiciones de enfermedad. Específicamente, se puede disminuir la expresión de genes que intervienen en la prevención de las siguientes condiciones patológicas: formación de trombos, reacciones inflamatorias, fibrosis y calcificación de válvulas. Por lo tanto, el nivel de actividad génica puede incrementarse al aumentar el nivel de producto génico presente o el nivel de producto génico activo presente en un sistema de cultivo de microesfera tridimensional.

Además, los pacientes pueden ser tratados con terapias de reemplazamiento génico durante la fase fibroblástica de la cicatrización. Las células estromales pueden diseñarse específicamente para cumplir los requisitos de un paciente individual, por ejemplo, las células estromales pueden ser modificadas genéticamente para regular uno o más genes; o la regulación de la expresión génica puede ser transitoria o a largo plazo; o la actividad génica puede ser inducible o no inducible. Por ejemplo, una o más copias de un gen diana normal, o una parte de un gen que dirige la producción de un producto proteínico de un gen diana con función de gen diana, se puede insertar en células humanas que pueblan construcciones tridimensionales usando vectores no inducibles que incluyen de manera no limitante adenovirus, virus asociados a adeno y vectores retrovirus; o promotores inducibles, que incluyen metalotioneína o proteína de choque térmico, además de otras partículas que introducen ADN en células, como liposomas, inyecciones directas de ADN o en partículas de oro.

El uso de la célula estromal en la composición terapéutica en terapia génica tiene numerosas ventajas. En primer lugar, puesto que el cultivo contiene células eucariotas, el producto génico se expresará adecuadamente y se procesará en cultivo para formar un producto activo. En segundo lugar, las técnicas de terapia génica son útiles solo si el número de células transfectadas puede ser sustancialmente mejorado para ser de valor clínico, relevante y útil; los cultivos tridimensionales de la invención permiten la expansión del número de células transfectadas y la amplificación (por división celular) de las mismas.

Se pueden utilizar diversos métodos para obtener la expresión constitutiva o transitoria de los productos génicos modificados dentro de las células estromales. Por ejemplo, se puede utilizar la técnica de implantación transcariótica descrita por Seldon, R. F. et al., 1987, *Science* 236:714 – 718. El término “transcariótico” aquí utilizado sugiere que el núcleo de las células implantadas ha sido alterado por la adición de secuencias de ADN mediante transfección estable o transitoria. Las células pueden modificarse utilizando cualquiera de los vectores que incluyen de manera no limitante vectores virales, por ejemplo, vectores retrovirus o vectores virales asociados a adeno; o vectores no integrativos replicantes, por ejemplo, vectores del virus del papiloma, vectores SV40, vectores adenovirales; o vectores virales replicantes defectuosos. Cuando se quiere una expresión transitoria, se pueden preferir vectores no integrativos replicantes defectuosos, ya que se pueden utilizar promotores inducibles o constitutivos en estos sistemas para controlar la expresión del gen de interés. De manera alternativa, se pueden utilizar vectores integrativos para obtener expresión transitoria, siempre y cuando el gen de interés esté controlado por un promotor inducible.

Se puede utilizar cualquier promotor para impulsar la expresión del gen insertado. Por ejemplo, los promotores virales incluyen de manera no limitante promotor / potenciador CMV, SV40, papilomavirus, virus de Epstein – Barr, promotor del gen elastina y b – globulina. Si se desea una expresión transitoria, tales promotores constitutivos deben utilizarse en un vector no integrativo y / o replicante defectuoso. De manera alternativa, los promotores inducibles podrían utilizarse para impulsar la expresión del gen insertado cuando sea necesario. Por ejemplo, los promotores inducibles incluyen, de manera no limitante, metalotioneína y proteína de choque térmico.

Los ejemplos de regiones de control transcripcionales que muestran la especificidad del tejido para tejidos conectivos que se han descrito y que podrían utilizarse incluyen de manera no limitante: región de control del gen elastina o elastasa I, activo en células pancreáticas acinares (Swit et al., 1984, *Cell* 38:639:646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399 – 409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425 – 515). La deposición de elastina está correlacionada con hechos específicos fisiológicos y de desarrollo en diferentes tejidos, incluyendo injertos vasculares. Por ejemplo, en el desarrollo de arterias, la deposición de elastina parece estar coordinada con los cambios en la presión arterial y la actividad mecánica. Los mecanismos de transducción que unen la actividad mecánica a la expresión de elastina involucran a los receptores de superficie celular. Una vez que las células que

sintetizan elastina están unidas a la elastina a través de los receptores de superficie celular, la síntesis de elastina adicional y otras proteínas de la matriz se pueden ver influenciadas por la exposición a estrés o a fuerzas mecánicas en el tejido (por ejemplo, el movimiento constante del constructo en el bioreactor) u otros factores que influyen en la forma celular.

5 Las células estromales utilizadas en el sistema de cultivo de la microesfera de la invención puede modificarse genéticamente para “noquear” la expresión de factores o antígenos superficiales que favorecen la coagulación o el rechazo en el área del implante. Se analizan a continuación las técnicas de modulación negativa para la reducción de niveles de expresión de genes diana o niveles de actividad de productos de genes diana. El término “modulación negativa” aquí utilizado se refiere a una reducción en el nivel y / o la actividad de productos de genes diana relativos al nivel y / o la actividad del producto de gen diana en ausencia del tratamiento de modulación. La expresión de un gen nativo en una célula estromal puede reducirse o noquearse utilizando numerosas técnicas, por ejemplo, la expresión puede inhibirse desactivando el gen completamente (comúnmente llamado “noqueo”) utilizando la técnica de recombinación homóloga. Normalmente, un exón que codifica una región importante de la proteína (o un exón 51 a esa región) se interrumpe por un marcador seleccionable positivo (por ejemplo, uno nuevo), previniendo así la producción de ARNm normal del gen diana y dando como resultado la desactivación del gen. Un gen también puede desactivarse creando una supresión en una parte del gen o eliminando por completo el gen. Mediante un constructo con dos regiones de homología al gen diana que se encuentra separado en el genoma, las secuencias que intervienen las dos regiones pueden eliminarse. Mombaerts, P. et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084 – 3087.

Las moléculas antisentido y ribocimas que inhiben la expresión del gen diana pueden utilizarse también según la invención para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, las moléculas de ARN antisentido que inhiben la expresión de complejos génicos mayores de histocompatibilidad (HLA) muestran ser más versátiles respecto a respuestas inmunes. Además, las moléculas de triple hélice pueden utilizarse para reducir el nivel de actividad del gen diana. Estas técnicas se describen detalladamente por L. G. David, et al., eda, Basic Methods in Molecular Biology, 2ª de., Appleton & Lange, Norwalk, Conn. 1994.

De manera alternativa, las células estromales se pueden modificar genéticamente para bloquear la expresión génica necesaria para la transición de las células del músculo liso para proliferar, migrar y permitir el desarrollo de hiperplasia neointimal, por ejemplo, por el bloqueo de oligodesoxinucleótidos antisentido de la expresión de la quinasa 2 en el ciclo de división celular y la proliferación de antígenos celulares nucleares. Mann, M. J. Et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:4502 – 4506.

La utilización de cultivos de células estromales en terapias génicas tiene numerosas ventajas. En primer lugar, ya que el cultivo incluye células eucariotas, el producto génico se expresará correctamente y se procesará en el cultivo para formar un producto activo. En segundo lugar, las técnicas de terapia génica son útiles únicamente si el número de células transfectadas puede aumentarse sustancialmente para ser considerado de valor clínico, relevante y útil; los cultivos de células estromales de la invención permiten la expansión del número de células transfectadas y la amplificación (por división celular) de estas. Por ejemplo, las células modificadas genéticamente que expresan factores de cicatrización de heridas pueden incorporarse a cultivos de células estromales vivas utilizados para hacer tendones y ligamentos que mejoran la cicatrización de heridas en el área de la lesión.

Los ejemplos de regiones de control transcripcional que muestran especificidad de tejidos que se han descrito y que podrían utilizarse incluyen, de manera no limitante: región de control del gen elastasa I que está activa en las células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, Cell 38:639 – 646; Ornitz et al., 1986, cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399 – 409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:42S – 51S); región de control del gen de la insulina que está activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, Nature 315:115 – 122); región de control del gen de la inmunoglobulina que está activa en las células linfoides (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647 – 658; Adams et al., 1985, Nature 318:533 – 538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436 – 1444); y región de control del gen de la miosina de cadena ligera 2 que está activa en el músculo esquelético (Shani, 1985, Nature 314:283 – 286).

5.4 HERIDAS / LESIONES

55 (A) El pie diabético

Del 50 % al 70 % de las amputaciones no traumáticas en Estados Unidos son por diabetes (A Report of the National Diabetes Board: NIH Publication 81 – 2284, 1980, pág 25). El colapso del pie en diabéticos se debe normalmente a la combinación de neuropatía e infección, con o sin insuficiencia arterial. Si hay una uña encarnada o una úlcera y no se trata debido a la falta de sensación de dolor, la infección puede extenderse hacia el pie, creando una infección grave que requerirá más riego sanguíneo del que los vasos sanguíneos pueden proporcionar. La gangrena resultante puede requerir la amputación. Los médicos, a veces, tienen la impresión de que las úlceras tróficas en pacientes diabéticos suceden sin pérdida de sensación. Por esto se sorprenden cuando sucede el colapso. El problema es que un pie puede ser más susceptible a una mala evolución antes de que se note una pérdida grave de sensibilidad. Las composiciones terapéuticas de la presente invención están diseñadas para

prevenir el colapso y tratar las úlceras asociadas a los pacientes con diabetes.

(B) Úlceras por presión

5 Las úlceras por presión siguen siendo un problema importante de salud, especialmente en pacientes de edad avanzada con movilidad reducida. El riesgo de muerte entre pacientes geriátricos se cuadruplica cuando se desarrolla una úlcera por presión y se sextuplica cuando una úlcera no se cura. El desarrollo de úlceras de presión se ha reconocido como fuente de negligencia para todos aquellos que proporcionan cuidados al paciente. Los tribunales han mostrado poca simpatía por los cuidadores que permiten que tales heridas ocurran o persistan. En 10 West contra Can – Care, Inc. (Caso N° CV – 91 – 617), un jurado de Alabama dictó un veredicto de 65 millones de dólares a favor de un anciano que desarrolló una úlcera por presión grangrenosa de 10 pulgadas mientras residía en la residencia del demandado. Hay además una necesidad no solo de mejores prestaciones (por ejemplo, colchones) para prevenir la formación de llagas, pero también una composición terapéutica que pueda utilizarse para proporcionar un mejor cuidado de la piel y acelerar el proceso de cicatrización de heridas en las úlceras por presión. 15

(C) Cirugía general, plástica y otras terapias

La cirugía (incluyendo, de manera no limitante, cirugía de los siguientes órganos y tejidos: piel, mama, pared torácica, pleura, pulmón y mediastino, cardiopatía, enfermedad vascular, enfermedad arterial periférica, enfermedad gastrointestinal, estómago, colon, recto y ano, apéndice, hígado, vesícula biliar y sistema biliar extrahepático, páncreas, bazo, peritonitis e infección intraabdominal, pared abdominal, omento, mesenterio, retroperitoneo, hernia de la pared abdominal, pituitaria y adrenal, cirugía pediátrica, tiroides y paratiroides, urología, ginecología, neurocirugía, ortopédica, amputaciones, cirugía de la mano, cirugía plástica y reconstructiva, cirugía oncológica, craneal, musculoesquelética, del sistema genitourinario, de corrección de cicatrices, tratamiento con láser, radiación roentgen, radiación radioactiva, tratamientos de ozonoterapia o de calor, son algunos de los procedimientos que dan como resultado heridas que desencadenan el comienzo de las defensas del huésped. Las defensas del huésped contra infecciones pueden ser locales o sistémicas, específicas o inespecíficas y humorales o celulares. Numerosas funciones normales actúan continuamente para reducir la carga bacteriana del cuerpo y para acelerar los procesos de cicatrización. Las composiciones profilácticas y terapéuticas de la presente invención pueden emplearse para 20 acelerar o mejorar los fenómenos inmunológicos naturales involucrados en lo referente a patógenos potenciales invasores, por ejemplo, los efectos combinados protectores de las barreras anatómicas, la fagocitosis basal, la digestión de células fagocigóticas o los mecanismos efectores. 25 30

(D) Quemaduras

35 Las quemaduras son una lesión muy común. Se estime que, al menos, dos millones de individuos por año sufren quemaduras graves que requieren atención médica. La descripción clásica de quemaduras de primer, segundo, tercer y cuarto grado es una descripción anatómica basada en la profundidad de la lesión en relación a la anatomía de la piel. Una quemadura de primer grado no ha penetrado la capa basal del epitelio. En esencia, el 40 epitelio no ha sido atravesado. Estas lesiones están tipificadas por las quemaduras solares y requieren pocos cuidados, excepto por la posibilidad de una crema humectante. Una quemadura de segundo grado se extiende desde la capa basal del epitelio hasta, pero no a través de, toda la epidermis. Las células epiteliales que revisten los anexos dérmicos permanecen viables y migran para cubrir la superficie de la herida. Una quemadura de tercer grado se extiende completamente bajo la grasa de la dermis. Una quemadura de cuarto grado se extiende hasta el 45 músculo y el hueso y requiere tratamiento en un centro de quemados especializado. Las composiciones terapéuticas de la presente invención son apropiadas para acelerar la cicatrización de heridas en pacientes quemados, en pacientes con daños por inhalación, quemaduras en las vías respiratorias altas y bajas, quemaduras en los pulmones y en el control de complicaciones relacionadas. 50

6. EJEMPLOS

La presente invención se ejemplifica a continuación mediante el uso de la composición compuesta de las microesferas que pueden utilizarse para favorecer la cicatrización de heridas en general, así como para la regeneración muscular. La cicatrización de heridas y la regeneración muscular requieren la reparación de tejido 55 dañado y el reemplazamiento del tejido perdido. La migración y proliferación de tipos específicos de células pueden aparecer de manera ordenada y estructurada, lo que puede diferenciarse fácilmente del crecimiento descontrolado de tejidos malignos como los tumores sólidos. En particular, las células involucradas en la cicatrización de heridas y la reparación muscular deben, en primer lugar, activarse para llevar a cabo su papel en el proceso de cicatrización. Aunque se desconoce el mecanismo exacto, el crecimiento celular organizado y estructurado en la proliferación que 60 tiene lugar en la cicatrización de heridas demuestra claramente la presencia de un proceso regulatorio altamente organizado.

Como se demuestra en los Ejemplos descritos a continuación, la composición de la presente invención no parece interferir con este proceso complejo, organizado y estructurado, ya que las microesferas estimulan 65 únicamente el ritmo del proceso de cicatrización al completo, así como las etapas específicas del mismo. Sin embargo, e inesperadamente, las microesferas no causan que las células muestren un estado de activación

continuo, descontrolado y metabólico, indicando que los procesos regulatorios normales no se ven afectados. Por lo tanto, la composición de la presente invención no causa activación celular descontrolada.

Sin pretender limitar la presente invención a un mecanismo en particular, la adición de microesferas con grupos cargados negativamente pueden tener un efecto terapéutico en la cicatrización de heridas al servir como superficie adicional para la adhesión y el cultivo de células. Una explicación de la eficacia de las microesferas de enlaces múltiples entre la superficie sólida de las microesferas y las membranas celulares, que representan puntos de contacto múltiple entre el material de la microesfera y la membrana celular. La formación de estos enlaces causa cambios en la distribución y el estado de los ligandos de la membrana, la reorganización citoesquelética, la activación de transducción de señal intracelular y otros cambios bioquímicos, permitiendo finalmente la activación de la célula. La activación celular permite, entonces, la proliferación celular y la producción de factores de crecimiento, y de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Cabe señalar que la presente invención no necesita contar con ningún mecanismo particular, ya que, como se demuestra a continuación, estas microesferas tienen efectos beneficiosos evidentes en el tratamiento y la cicatrización de heridas *in vivo*.

Se han probado numerosos tipos de microesferas diferentes en los Ejemplos descritos a continuación. Estas microesferas se realizaron de poliestireno, con carboxilo o grupos superficiales amino o sin grupos superficiales adicionales. Los diámetros de las microesferas oscilan entre 0,1 y 20 micrones. El potencial zeta de ciertas microesferas también se probó y se demostró que el tamaño de la esfera y el tipo de grupos superficiales tienen un claro efecto en la cantidad de carga total transportada por cada microesfera, lo que podría tener un importante efecto en la habilidad de las microesferas para favorecer la cicatrización de heridas.

Aunque se muestran ciertos tipos específicos de microesferas, es comprensible que muchos otros tipos de microesferas se podrían utilizar igualmente siempre que cumplan las siguientes características.

1. Deberían ser capaces de formar puntos de contacto múltiple con células o porciones celulares;
2. Sus mecanismos de acción no deberían requerir alteración o degradación química; y
3. Deberían ser sustancialmente insolubles en medios acuosos como fluidos corporales y, en su lugar, deberían formar una suspensión.

Otros atributos preferibles incluyen los siguientes. En primer lugar, las microesferas deben estar hechas de material no biodegradable, preferiblemente poliestireno. En segundo lugar, las microesferas deben conllevar una carga total negativa. El tamaño de las microesferas tiene de 0,1 a 200 micrones de diámetro. Preferiblemente, las microesferas deberían ser derivadas con grupos superficiales carboxilo, aunque también pueden emplearse otros grupos de carga negativa. Los principios y la operación de las microesferas según la presente invención podrán ser mejor entendidas gracias a los ejemplos y dibujos que acompañan la siguiente descripción.

Ejemplo 1

Efecto de las microesferas en la creatina fosfoquinasa

Las microesferas de la presente invención inducen claramente un incremento inicial de la actividad de la creatina fosfoquinasa (CPK) en mioblastos cultivados, como muestra la Figura 1. Sin embargo, tras ocho días, las células tratadas y no tratadas muestran el mismo nivel de actividad de CPK, indicando que la inducción de la actividad incrementada de CPK por las microesferas de la presente invención es temporal. El método experimental es el siguiente.

Se preparó un cultivo primario de músculo esquelético de embrión de rata como describe Freshney [R. J. Freshney, Culture of Animal Cells, Willey. 1986, pág 117. 170 – 172]. Poco después, se analizaron los músculos sin piel ni hueso y 15 desgregados mediante tripsinización en caliente (0,25 % de tripsina a 36,5 °C). La contaminación por fibroblastos se redujo gracias a células cultivadas anteriormente durante 1 hora en una incubadora con un 5 % de CO₂ a 37 °C, ya que los fibroblastos se adhieren primero al tejido de las placas de cultivo. Los mioblastos se cultivaron a continuación en placas de Petri de 35 mm a una concentración de 5.000 células por ml con 2 ml de medio (medio Eagle modificado de Dulbecco: medio 199 en proporción de 1:4), enriquecido con antibióticos, 10 % vol / vol de suero equino y 4 % vol / vol de extracto embrionario de pollo. El extracto embrionario de pollo se preparó a partir de embriones de pollo de 10 días según R. J. Freshney, Culture of Animal Cells, Willey, 1986. Los antibióticos incluían anfotericina y gentamicina, diluidos a 1:1000 a partir de la concentración estándar inicial de 2,5 mg / ml. Tras 24 horas, el medio se decantó y se reemplazó con un nuevo medio con un 20 % vol / vol de suero fetal equino y 1 % vol / vol de extracto embrionario de pollo.

Las células cultivadas se trataron a continuación con microesferas, comenzando en el momento del cultivo en medios durante 4 – 8 días o con medios solos. Las microesferas eran de poliestireno carboxilado de 1, 2 o 4,5 micrones de diámetro, o de poliestireno solo de 4,5 micrones de diámetro. La concentración de microesferas era de 10⁶ o 10⁷ por ml de medio, con resultados similares para ambas concentraciones (no se muestra). Tras 4, 5, 6, 7 u 8 días de tratamiento, la actividad de creatina fosfoquinasa se midió con un ensayo estándar ("Creatine Kinase", Worthington Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, N. J., U. S. A., 1972. pág 54 – 55). Los resultados se muestran en la Figura 1, como Unidades de actividad de CPK por mg de proteína celular total.

La Figura 1 demuestra claramente la habilidad de las microesferas de la presente invención para inducir un incremento inicial de la actividad de creatina fosfoquinasa, en comparación a las células de control. Tras 4 días de tratamiento, las células tratadas con microesferas muestran un aumento inicial de actividad de CPK en comparación a las células de control. Este aumento se pronuncia particularmente los días 5 y 6 del tratamiento. Sin embargo, en el día 7, la actividad de CPK en las células de control comenzó a asemejarse a la de las células tratadas con microesferas. Las microesferas favorecieron un aumento inicial de la actividad de CPK en mioblastos, que se estabilizó tras 8 días de tratamiento. Este aumento de la actividad de CPK está correlacionado con la maduración bioquímica de células miogénicas. Por lo tanto, las microesferas favorecieron la maduración bioquímica de los mioblastos cultivados.

Ejemplo 2

Efecto de las microesferas en la proliferación y la fusión celular

Se demostró que las microesferas de la presente invención indujeron el aumento inicial tanto en la proliferación celular como en la fusión de mioblastos en comparación a las células de control (sin tratar), como se muestra a continuación.

Los cultivos primarios de mioblastos de rata se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, excepto las células, que se cultivaron en cubreobjetos. Las células tratadas se incubaron en un medio con microesferas, como se describe a continuación, mientras que las células de control en medio solo. Para determinar el alcance de la proliferación celular, se fijaron las células en etanol / ácido acético (3:1) y se tiñeron posteriormente con hematoxilina – eosina. A continuación, se procedió al conteo de las células en un microscopio óptico. El índice mitótico se calculó como la proporción de células en mitosis contadas por cada 1000 células.

Para el examen de la proliferación celular, se emplearon microesferas de poliestireno que tenían grupos superficiales de sulfato, con un diámetro de 0,18 micrones y a una concentración de 10^7 microesferas / ml de medio. Tras 24 horas de tratamiento con las microesferas, se observó un incremento de 20 veces el índice mitótico en comparación a las células de control. Específicamente, el índice mitótico de células de control fue de $1,25 \pm 0,7$ %, mientras que las células tratadas con microesferas fue de $24,6 \pm 1,0$ %. Por lo tanto, las microesferas favorecieron claramente un gran incremento del índice mitótico de los mioblastos.

También se analizó el efecto de las microesferas en la fusión de mioblastos. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Generalmente, las células tratadas con microesferas mostraron un 150 % de fusión respecto a los controles. Sin embargo, el alcance de este efecto depende del tipo de microesferas y la duración del tratamiento.

Los tipos de microesferas probadas se muestran en la Tabla 1. El diámetro de las microesferas se da en micrones en el apartado "Diámetro". Los grupos superficiales en las gotas de poliestireno se encuentran en el apartado "Grupo superficial". Las gotas de poliestireno sin derivación son "Poliestireno". Las gotas derivadas con carboxilo o grupos superficiales amino se describen como "carboxi" y "amino", respectivamente. La concentración de las gotas se da en número de gotas por ml de medio en el apartado "Conc."

Las células se prepararon, fijaron y tiñeron para determinar la velocidad de proliferación de mioblastos como se describe a continuación. Las células se cultivaron en una placa a la densidad dada en la Tabla 1 como células por ml de medio, en la columna "Células iniciales". Las medidas de fusión de mioblastos se tomaron tras el número dado de días tras el tratamiento en "Días tras tratamiento".

El alcance de la fusión se calculó como la proporción de núcleos en células multinucleares, o mioimplastes, relacionado con el número total de núcleos en el campo microscópico, dado como "Proporción de fusión" para las células tratadas con microesferas, y "Control de fusión" para las células de control no tratadas. Se contaron, al menos, 400 núcleos en cada condición experimental. La proporción del alcance de la fusión en las células tratadas con microesferas y las células de control no tratadas se denomina "Efecto relativo". Para las celdas que no tienen valor dado en la Tabla 1, el valor es el mismo que el de la celda superior.

Tabla 1. Efecto de las microesferas de la fusión de mioblastos

Diámetro	Grupo superficial	Conc.	Células iniciales	Días tras tratamiento	Proporción de fusión	Control de fusión	Efecto relativo
0,22	Poliestireno	10^7	3×10^4	6	$0,75 \pm 0,06$	$0,58 \pm 0,1$	1,29
				7	$0,82 \pm 0,09$	$0,64 \pm 0,09$	1,28
0,49				6	$0,86 \pm 0,06$	$0,58 \pm 0,1$	1,48
				7	$0,91 \pm 0,07$	$0,64 \pm 0,09$	1,57
0,91	carboxi	10^8	5×10^3	5	$0,84 \pm 0,06$	$0,64 \pm 0,09$	1,31
				4	$0,63 \pm 0,09$	$0,51 \pm 0,06$	1,23
1,12	amino		4×10^4	6	$0,69 \pm 0,15$	$0,58 \pm 0,10$	1,18
					$0,73 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,10$	1,25
2,01	carboxi	10^7	5×10^3	5	$0,84 \pm 0,096$	$0,64 \pm 0,09$	1,31
				4	$0,63 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,06$	1,23
4,58		10^8		5	$0,72 \pm 0,09$	$0,64 \pm 0,09$	1,12
				4	$0,67 \pm 0,09$	$0,51 \pm 0,06$	1,31
10,85				5	$0,68 \pm 0,08$	$0,64 \pm 0,09$	1,06
				4	$0,60 \pm 0,10$	$0,51 \pm 0,09$	1,17

Como se puede observar en la Tabla 1, todos los tipos de microesferas diferentes favorecieron la fusión celular de mioblastos, aunque el alcance de este efecto depende del diámetro de la microesfera, el grupo superficial de la microesfera, el número de días transcurridos tras el tratamiento y la concentración. La fusión de mioblastos tiene lugar cuando el tejido muscular se forma durante la embriogénesis, y es también una etapa muy importante en la regeneración muscular y la reparación del tejido muscular dañado. Por lo tanto, la habilidad de las microesferas para favorecer esta fusión indica claramente el potencial de estas microesferas para favorecer la regeneración muscular, como se demuestra en el Ejemplo 5 descrito a continuación.

Ejemplo 3

Efecto de las microesferas en la síntesis y deposición de colágeno

Como se ha descrito anteriormente en el apartado "Antecedentes", la síntesis y la deposición de colágeno son etapas importantes en el proceso de la cicatrización de heridas. Además, la cantidad de colágeno depositada en la herida es un determinante importante de la fuerza de la herida. Por lo tanto, aunque las microesferas de la presente invención tiene numerosos y evidentes efectos en todos los diferentes tipos celulares, como se demuestra en los ejemplos precedentes y posteriores, uno de los más importantes de la habilidad de una composición para favorecer la cicatrización de heridas es su efecto en la síntesis y deposición de colágeno.

Como se muestra en las figuras 2A y 2B, las microesferas de la presente invención favorecen la síntesis de colágeno gracias a fibroblastos cultivados. El mayor efecto se comprueba en las microesferas de Tipo I y Tipo II. Las microesferas de Tipo I tienen un diámetro de 4,5 micrones y están hechas de poliestireno caboxilado y tienen un potencial Z de -29,96 mV. Las microesferas de Tipo II tienen un diámetro de 0,49 micrones, están hechas de poliestireno y tienen un potencial Z de -34,5 mV. Las microesferas de Tipo III tienen un diámetro de 1,0 micrones, están hechas de poliestireno carboxilado y tienen un potencial Z de -53,34 mV. El método experimental fue el siguiente.

Se cultivaron fibroblastos de prepucio en matraces de plástico (Corning Glass Works, Corning, NY) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con 4,5 mg / ml de glucosa suplementada con 10 % vol / vol de suero fecal bovino, 2 mM de L - Glutamina, 50 ug / ml de sulfato de gentamicina y 2,5 mg / ml de anfotericina B. Los cultivos se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ hasta que se hicieron confluentes. Los fibroblastos se extrajeron utilizando 0,25 % de tripsina, 0,05 % de solución de EDTA y se subcultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 200.000 células / pocillo con el mismo medio durante 24 horas, momento en el cual se incubaron las células tratadas con microesferas de Tipo I, II o III. Las células de control se incubaron en medio solo.

La síntesis de colágeno se midió de la siguiente manera. Los fibroblastos cultivados se preincubaron en DMEM suplementado con 0,5 % de suero fetal bovino dializado durante 24 horas. Las células se marcaron con 3 uCi de solución $2,3 - ^3 - H -$ prolina o $3,4 - ^3 - H -$ prolina con fumarato de B - aminopropionitrilo (BAPN) a una concentración final de 100 uM, en presencia (Figura 2A) o ausencia (Figura 2B) de 10 uM de ácido ascórbico, como se indica. El ácido ascórbico favorece la síntesis de colágeno en fibroblastos y es un factor de estimulación importante.

Tras 24 horas de incubación, se determinó la reacción y se extrajo el colágeno de cada pocillo añadiendo 30 ul de ácido acético frío (0,5 M) con pepsina (concentración final de 0,5 mg / ml), seguido de una ligera agitación a

temperatura ambiente durante 4 horas. Tras la centrifugación, los residuos celulares se descartaron y se añadieron 80 ul de solución de colágeno en ácido acético 0,5 M a cada sobrenadante, con una concentración final de colágeno de 200 mg / ml. Se precipitó el colágeno de cada sobrenadante añadiendo 0,4 ml de solución de NaCl 5,2M a ácido acético 0,5 M. Tras un reposo de 2 horas, el colágeno precipitado se separó por centrifugación durante 15 minutos a 15.000 rpm. A continuación, los pellets se resuspendieron en 750 ul de solución amortiguadora TRIS 10 mM, con pH de 7,4 y NaCl 1 M. El colágeno se precipitó añadiendo 750 ul de amortiguador TRIS, con pH de 7,4 y NaCl 5 M. Transcurridas 2 horas, el colágeno se separó por centrifugación, se volvió a disolver en ácido acético 0,5 M y se midió cada muestra en un contador de centelleo. Los resultados se muestran en las figuras 2A y 2B como cpm por pocillo. Los datos presentados son la media de las muestras cuadruplicadas.

Tanto las microesferas de Tipo I como de Tipo II son capaces de estimular la síntesis de colágeno superando el nivel visto en los fibroblastos de control (sin tratar), tanto en presencia (Figura 2A) como en ausencia (Figura 2B) de ácido ascórbico. Las microesferas de Tipo I tuvieron un efecto mayor que las microesferas de Tipo II en presencia de ácido ascórbico, aunque ambos tipos tuvieron un efecto similar en ausencia de ácido ascórbico. Las microesferas de Tipo II no tuvieron efectos detectables en la síntesis de colágeno ni en presencia ni en ausencia de ácido ascórbico.

Un hallazgo particularmente interesante es que tanto las microesferas de Tipo I como de Tipo II tenían un efecto, mientras que las microesferas de Tipo III no, indicando que el tamaño específico y el material de las microesferas es importante. Además, ambos tipos I y II de las microesferas tuvieron efecto incluso en ausencia de ácido ascórbico, indicando que estos dos tipos de microesferas pueden potenciar la síntesis de colágeno incluso en ausencia de otros factores estimulantes. Por lo tanto, ambos tipos I y II tiene un evidente efecto estimulante en la síntesis de colágeno.

Ejemplo 4

Efecto de las microesferas en la forma de los mioblastos

Los cultivos celulares primarios de mioblastos de rata se prepararon como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Se incubaron las células con microesferas de poliestireno (células tratadas) o sin ellas (células de control) durante 48 horas. Las células fueron, entonces, fijadas en un 1 % de glutaraldehído en tampón fosfato salino durante 1 a 4 días, y se aclararon con PBS. Las células fueron, a continuación, transferidas a una solución de 1 % de ácido tánico y 1 % de HCL guanidina (proporción de 1:1) en PBS durante 1 hora. Los especímenes se fijaron después en 1 % de OSO₄ durante 1 hora y se deshidrataron en etanol graduado y Freon 113 a temperatura ambiente. Los especímenes se colocaron en portaobjetos, se recubrieron con oro y se examinaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL T – 300 a 2 kV.

Las figuras 3A – 3C ilustran el efecto de las microesferas de la presente invención con forma de mioblasto. La célula de la Figura 3A ha crecido sobre la microesfera de manera que la parte de la superficie celular es más convexa que plana. Las figuras 3B y 3C muestran células que han extendido pseudópodos en la parte de la célula sobre la que descansa la microesfera. El pseudópodo de la célula de la Figura 3C es particularmente pronunciado, mostrando que las microesferas influyen claramente en la forma del mioblasto. Además, la formación y la extensión de un pseudópodo exige cambios evidentes en la estructura citoesquelética, demostrando que las microesferas también afectan al citoesqueleto de la célula. La formación de estos pseudopios puede ser importante para la migración de las células a la zona de la herida. Por lo tanto, la estimulación de estos pseudópodos por las microesferas indica su habilidad para favorecer otra etapa importante en el proceso de cicatrización de heridas.

Ejemplo 5

Composiciones y métodos de aplicación

La siguiente descripción es un medio general y un método para la aplicación de los agentes para la cicatrización de heridas. Los agentes, tales que las microesferas, se aplican preferiblemente en la herida a tratar de manera repetida. La frecuencia de aplicación y la concentración aplicada depende de la severidad de los síntomas y del grado de reacción del sujeto al tratamiento. Los expertos en la materia podrán determinar las concentraciones correctas con facilidad, administrando las metodologías y los tiempos entre repeticiones. En el presente estudio, las microesferas se aplicaron en la herida a tratar una vez al día, aunque, por supuesto, son posibles más aplicaciones.

El método incluye la etapa de administración en el paciente a tratar de los agentes en forma de microesferas, en un vehículo farmacéuticamente aceptable en el que los agentes sean sustancialmente insolubles. Entre los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables se encuentran los medios acuosos para suspensión de agentes, medios no acuosos como pomadas, cremas y aerosoles, así como vendajes impregnados en la composición o que contengan medios con los agentes. Los vendajes pueden ser oclusivos o no oclusivos. En cualquier caso, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden describirse como una dispersión de agentes.

Los agentes se administran según una metodología de dosificación efectiva, preferiblemente hasta que se alcance un punto final predefinido, como la ausencia de los síntomas iniciales en el sujeto. El cierre de la herida a

tratar es un ejemplo de dicho punto final.

El medio de la presente invención incluye una composición con uno o más agentes, un vehículo farmacéuticamente aceptable para dichos agentes y un contenedor para la composición. Entre los ejemplos de contenedores adecuados se incluyen los aerosoles. Los expertos en la materia podrán fácilmente seleccionar los recipientes adecuados para la composición. Independientemente de la utilización particular del medio, los agentes, como las microesferas, se aplican preferentemente en un procedimiento de dos etapas. En primer lugar, se aplican las microesferas en dispersión en la herida, empapando, rociando, pintando, lavando o cualquier otro método apropiado de aplicación tópica. Es preferible esperar de 30 segundos a 2 minutos antes de la segunda etapa, para permitir a las microesferas formar contactos iniciales con la herida. La segunda etapa incluye, preferiblemente, la aplicación en la herida de un vendaje oclusivo o no oclusivo, u otro recubrimiento apropiado impregnado de la suspensión líquida que contiene las microesferas. Esto reduce o elimina sustancialmente la absorción de las microesferas por el vendaje o el recubrimiento. Este método se utilizó tanto en humanos como en ratas para la cicatrización de heridas como se describe en los siguientes Ejemplos.

Las microesferas en suspensión no se agregaron, fusionaron, agruparon o sufrieron coágulos irreversibles. Aunque las microesferas se depositaban transcurrido cierto tiempo, volvían a estar en suspensión tras una ligera agitación.

Ejemplo 6

Mejora de la cicatrización de heridas en ratas gracias a las microesferas

Como se ha señalado en los Ejemplos 1 – 4, las microesferas de la presente invención favorecen numerosos procesos celulares *in vitro* importantes para la cicatrización de heridas. Sin embargo, los efectos *in vitro* e *in vivo* no están siempre correlacionados.

Además, los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo para evaluar la habilidad de las microesferas para favorecer la cicatrización de heridas en ratas. Como se muestra en las figuras 4A – 4D, las microesferas de la presente invención favorecen claramente la cicatrización de heridas en ratas. La Figura 5 es un gráfico de la velocidad a la que el área de la herida disminuye, mostrando que las microesferas de la presente invención aumentan la velocidad a la que tiene lugar dicha disminución. Finalmente, la Tabla 2 muestra que las microesferas favorecen la regeneración muscular en ratas. El método experimental fue el siguiente.

Se anestesiaron ratas Wistar macho de entre 300 gr y 400 gr con Nembutal (5 mg / kg de peso corporal). Se les extirparon las partes laterales del músculo tibial anterior de la siguiente manera. En primer lugar, se realizó una incisión longitudinal en la piel para exponer el músculo tibial anterior. A continuación, se extirpó parcialmente este músculo mediante un corte transversal de las fibras musculares de, aproximadamente, la mitad de la anchura del músculo. El pedazo extirpado fue entonces retirado del músculo, dejando un hueco de unos 5 mm por 5 mm en el músculo. En todas las ratas se extrajo la misma cantidad de tejido (80 ± 10 mg) de la misma zona exacta del músculo. La zona de la herida se revistió con microesferas de poliestireno de 2 micrones en solución salina para las ratas tratadas y solución salina sola para las ratas de control. La zona de la herida se midió durante los 3 y 15 días posteriores a la lesión.

Las figuras 4A – 4D muestran imágenes de las áreas de la herida preparadas como se ha descrito anteriormente. La Figura 4A muestra la herida de la rata de control inmediatamente después de la lesión, mientras la Figura 4B muestra la herida equivalente en la rata a tratar. Las figuras 4C y 4D muestran las mismas ratas cinco días después de la lesión. La herida de la rata de control se trató únicamente con solución salina y aún no había cicatrizado completamente. Por el contrario, la herida de la rata a tratar, tratada con microesferas, había cicatrizado completamente. Por consiguiente, las microesferas de la presente invención favorecen claramente la cicatrización de heridas.

La Figura 5 ilustra la mejora de la cicatrización de heridas gracias a las microesferas de la presente invención. Las heridas de las ratas de control terminaron por cicatrizar, pero a una velocidad mucho más lenta que las heridas de las ratas tratadas. Por lo tanto, las microesferas incrementan de manera evidente la velocidad a la que el área de la herida disminuye en las cicatrizaciones de heridas.

Se prepararon portaobjetos para el análisis histológico haciendo una biopsia con sacabocados en la zona de la herida. Las ratas fueron sacrificadas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13 o 14 días después de la lesión y se realizaron biopsias para exámenes histológicos. El número de células miogénicas especializadas que se incorporaron en fibras musculares nuevas o reparadas se contaron determinando el número de núcleos “nuevos” que representan células miogénicas activadas. Los núcleos de estas células eran núcleos grandes, basofílicos, con cromatina dispersa y podían diferenciarse fácilmente de los núcleos de los mioblastos existentes. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tratamiento	Día tras cirugía	Núcleos "nuevos" por portaobjetos	Núcleos "nuevos" por campo	Núcleos "nuevos" por fibra
M	4	442 ± 67	53,8 ± 22	9,5 ± 3,5
C	4	117 ± 37	14,6 ± 10	5,9 ± 1,4
M	5	350 ± 84	43,8 ± 13,5	8,6 ± 1,8
C	5	110 ± 31	14,1 ± 4,6	4,8 ± 1,2
M	6	1221 ± 180	94 ± 25	11,9 ± 5
C	6	676 ± 120	52 ± 11	4,9 ± 0,9
M	7	762 ± 110	95 ± 51	9,4 ± 3,5
C	7	169 ± 47	21,1 ± 4,8	4,5 ± 0,8
M	8	715 ± 140	89,4 ± 36	11 ± 2,2
C	8	126 ± 32	18,6 ± 12	5,2 ± 1,5
M	9	299 ± 75	42,7 ± 19	7,4 ± 1,3
C	9	235 ± 84	33 ± 12	6,5 ± 2,8
M	13	747 ± 129	53,3 ± 15	9,7 ± 1,5
C	13	582 ± 140	42 ± 42	5 ± 1,7
M	14	665 ± 143	83 ± 24	9,4 ± 1,9
C	14	491 ± 124	61 ± 36	5,5 ± 2,7

5 Como se muestra en la Tabla 2, las microesferas de la presente invención favorecen de manera evidente la regeneración muscular, medida por el número de núcleos "nuevos" o incorporados en las fibras musculares. El hecho de que tales medidas se realizaran en muestras histológicas extraídas de ratas tratadas *in vivo* también indica que las microesferas favorecen la regeneración muscular tanto *in vivo* como *in vitro*. Finalmente, la Figura 6 compara el efecto de las microesferas de la presente invención en la cicatrización de heridas con medios de cultivos de tejidos y solución salina en ratas. Las heridas se produjeron en las ratas como se ha descrito anteriormente, y las ratas se trataron con solución salina sola (Figura 6A.), medio de cultivo de tejidos solo (Figura 6B, X), solución salina más las microesferas (Figura 6A,) o medio de cultivo de tejidos más las microesferas (Figura 6B,). Se tomaron fotografías de las ratas 4 días después de que se produjera la herida. Como se puede observar en las Figuras 6A y 6B, las microesferas son capaces de inducir una velocidad de cicatrización de la herida mucho más rápida independientemente de si el vehículo era solución salina o medio de cultivo de tejidos. Por consiguiente, el medio de cultivo de tejidos no es de ningún modo responsable del efecto de las microesferas de la presente invención en la cicatrización de heridas.

Ejemplo 7

Estudios de toxicidad de las microesferas

20 No se observó ningún efecto tóxico de una preparación que contuviera las microesferas. El examen preliminar de las ratas tratadas 65 y 180 días después de la lesión demostró que ninguno de los siguientes órganos mostró signos de cambios patológicos: corazón, hígado, pulmones, riñón, vasos sanguíneos, estómago, nódulos linfáticos y cerebro.

25 Los experimentos con microesferas marcadas con fluorescencia mostraron que no se observó ningún signo de patología en las ratas tratadas. Además, las microesferas no penetraron en ninguno de los órganos anteriormente mencionados. Tampoco se detectó ningún crecimiento nuevo en los órganos anteriormente detectados. Finalmente, las microesferas se dispersaron en el área de la herida pero no penetraron en las fibras musculares que se estaban regenerando.

Ejemplo 8

Efecto de las microesferas en la cicatrización de heridas en humanos

35 Los experimentos *in vivo* descritos anteriormente en el Ejemplo 6 demuestran claramente que las microesferas de la presente invención pueden favorecer la cicatrización de heridas y la regeneración muscular en ratas. Además,

los resultados de los estudios de toxicidad en ratas descritos en el Ejemplo 7 muestran que las microesferas no son sustancialmente tóxicas. Además, se llevaron a cabo estudios para determinar el efecto de las microesferas de la presente invención en la cicatrización de heridas en humanos. Como se describe detalladamente a continuación, los casos de estudio demostraron que las microesferas favorecen claramente la cicatrización de heridas en humanos. El primer caso de estudio fue una mujer de 66 años con úlceras en la pierna izquierda que no cicatrizaban. La paciente también tenía celulitis en la pierna izquierda y venas varicosas en ambas piernas. Las úlceras en la cara interior del muslo de la paciente se trataron con Milton 2 %, una sal de cloro corrosiva en agua. Las úlceras en la cara exterior del muslo de la paciente se trataron con microesferas de 4,5 micrones de la presente invención hechas de poliestireno en medio de cultivo de tejidos. La Figura 7A muestra la herida de control en el día 0, mientras que la Figura 7B muestra la herida de control tras 4 meses de tratamiento. La Figura 7C muestra la herida tratada en el día 0, mientras que la Figura 7D muestra la herida tratada tras 4 meses de tratamiento. Ambas heridas tratadas con las microesferas de la presente invención y aquellas tratadas con Milton mostraron signos de infección y otras dificultades de cicatrización durante los siguientes cuatro meses. Sin embargo, al término del período de tratamiento, las heridas tratadas con las microesferas habían mostrado mejoras significativas. El tamaño de la herida había disminuido y las heridas estaban limpias, sin signos de infección, las microesferas de la presente invención mostraron una mayor eficacia en la mejora de la cicatrización de heridas que los tratamientos actuales disponibles.

Como otra prueba más, la herida que había servido de control en la Figura 7 anteriormente mencionada (figuras 7A y 7B) se trató con las mismas microesferas que las que se utilizaron para tratar la herida de las figuras 7C y 7D. Los resultados se muestran en las figuras 8A y 8B. La Figura 8A muestra la herida en el día 0 del tratamiento con las microesferas, mientras la Figura 8B muestra la herida tras 21 días de tratamiento. La extensión de la herida disminuyó de manera evidente, incluso tras un período de tiempo tan breve. Además, la herida era superficial, estaba limpia y dejó de producir exudaciones.

El segundo caso de estudio fue una mujer de 52 años con una herida infectada desde hace un año en la zona frontal del muslo izquierdo. La herida se trató con 1 % de Milton durante una semana, se desbridó y se trató con las microesferas las figuras 7 y 8 durante 10 días. La Figura 9A muestra la herida en el día 0 del tratamiento, mientras la Figura 9B muestra la herida tras 10 días de tratamiento.

Tras 10 días, la herida mostró una mejora significativa. Había disminuido en extensión a un tamaño menor, estaba limpia y dejó de producir exudaciones, como puede verse en la Figura 9B. Aunque la herida no cerró completamente durante el relativamente corto período de tratamiento, sus efectos mejoraron significativamente.

El tercer caso de estudio fue un hombre de 19 años que resultó herido por un derrame químico en un accidente industrial en su lugar de trabajo. Los químicos en cuestión, sulfuros, causaron graves quemaduras y ampollas en el lado derecho del cuello y en la mano derecha. Durante los primeros dos días, las heridas se trataron con Silverol, un hidrogel con fuertes propiedades absorbentes. Después, las heridas del antebrazo se trataron con las microesferas de los casos de estudio 1 y 2, mientras el resto de heridas fueron tratadas con Silverol. Los resultados se muestran en las figuras 10A y 10B (herida de control en el día 0 y el día 5, respectivamente), y en las figuras 10C y 10D (herida tratada en el día 0 y el día 5, respectivamente).

Tras 5 días de tratamiento con microesferas, las condiciones de las heridas tratadas en el antebrazo habían mejorado significativamente en cuanto al resto de heridas que no habían sido tratadas con las microesferas. La herida del antebrazo se curó completamente tras 5 días de tratamiento con microesferas. Por el contrario, el resto de las heridas que se habían tratado con Silverol no se habían curado completamente. Por consiguiente, las microesferas favorecieron de manera evidente la cicatrización de heridas, demostrando una mayor eficacia que los tratamientos actuales disponibles.

El cuarto caso de estudio fue una mujer de 52 años que había sufrido quemaduras de segundo grado en las nalgas a causa de un baño caliente. Las heridas de la nalga izquierda se trataron con Silverol, mientras que las heridas de la nalga derecha se trataron con las microesferas de los casos de estudio anteriores. Los resultados se muestran, para las heridas tratadas con las microesferas solas, en las figuras 11A (día 0) y 11B (día 7) del tratamiento.

Siete días después de comenzar el tratamiento, las heridas de la nalga derecha, que habían sido tratadas con las microesferas, habían cicatrizado completamente y mostraban un buen crecimiento epitelial. Por el contrario, las heridas de la nalga izquierda, que habían sido tratadas con Silverol, no habían cicatrizado por completo y se estaban cerrando lentamente. Por consiguiente, las microesferas fueron capaces de favorecer la cicatrización de las heridas a mayor velocidad que los tratamientos convencionales.

El quinto caso de estudio fue una mujer de 28 años que sufrió numerosas y severas quemaduras solares (no se muestran los datos). Se trató con las microesferas de los casos de estudio anteriores. La paciente informó de una reducción significativa del malestar y una curación rápida de las quemaduras solares. Por tanto, las microesferas empleadas en el método y el medio de la presente invención pueden tanto aliviar el malestar como mejorar la cicatrización de heridas, aunque cabe señalar que el alivio del malestar es, probablemente, un efecto indirecto de las microesferas más que una analgesia directa.

De hecho, cabe señalar que la información de la paciente anteriormente mencionada solo puede ser inferida de incluir la aparente reducción en la sensación de malestar de las quemaduras solares. Dicha disminución del malestar probablemente no demuestra ninguna habilidad de las microesferas para tener este efecto directo en la transmisión de impulsos nerviosos, o para alterar ciertamente cualquiera de los muchos factores que controlan la sensación de malestar. En su lugar, este efecto es probablemente indirecto, y tiene lugar como resultado de la activación de macrófagos, que tienen efectos antiinflamatorios, permitiendo la disminución de la sensación de malestar del paciente.

De estos cinco casos, relacionados con las numerosas pruebas obtenidas de los estudios en ratas, el uso de los agentes, como las microesferas, según la presente invención, ha mostrado claramente tener una mayor eficacia en la mejora de la cicatrización de heridas y la regeneración muscular que los tratamientos actuales disponibles de trabajos anteriores. El método y el medio favorecen, aceleran y mejoran la cicatrización de heridas, así como disminuyen el malestar según la experiencia de los sujetos.

En lo que concierne al malestar decreciente, cabría señalar que los pacientes de los casos de estudio anteriormente mencionados también informaron de la reducción local del dolor y el malestar de las heridas tratadas, particularmente la paciente con quemaduras solares, probablemente como efecto indirecto de las microesferas gracias a su (también indirecta) acción antiinflamatoria.

Finalmente, aunque los datos no se muestran, también se notó un efecto bacteriostático indirecto contra infecciones en las heridas por especies de *Pseudomonas*. El mecanismo para la acción indirecta antiinflamatoria y el efecto bacteriostático indirecto no está claro, pero es, probablemente, resultado de un efecto celular que incluye la atracción y activación de macrófagos. Independientemente del mecanismo exacto, la utilización de microesferas según la presente invención representa una mejora clara y significativa en el tratamiento de heridas.

Ejemplo 9

Efecto de las microesferas en la cicatrización de heridas tras radiación o antes de quimioterapia

Las microesferas de la presente invención inducen un incremento inicial en un paciente que haya sido sometido a una mastectomía radical seguida de terapia de radiación.

Una paciente de cincuenta y cuatro años con cáncer de mama en estadio II se sometió a cirugía y posteriormente a una terapia de radiación. La paciente sufrió una lesión necrótica (Figura 12A) y se le aconsejó no seguir un tratamiento de quimioterapia para prevenir la extensión de la enfermedad avanzada hasta que la herida necrótica cerrara. La paciente fue tratada con microesferas 2 veces al día durante 54 días. Tras 21 días de tratamiento con microesferas, la herida de la paciente había mejorado y comenzó la quimioterapia hasta que se cerró la herida (figuras 12B – 12D). La paciente fue capaz de seguir un tratamiento de quimioterapia y actualmente no sufre la enfermedad. Por tanto, la composición de la presente invención fue útil en el tratamiento de heridas en combinación con terapias de radiación y quimioterapia.

Ejemplo 10

Composiciones de microesferas en presencia de agentes farmacológicos y biológicos

En los ejemplos que se describen a continuación, los agentes farmacológicos y / o biológicos son solubles en el vehículo farmacéutico pero las microesferas no lo son y quedan en suspensión en la composición terapéutica.

a) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque se añade un antibiótico a la composición para prevenir infecciones, por ejemplo, de 1 a 100 mg / ml de sulfato de neomicina, de 100 a 1000 Unidades / ml de bacitracina, de 10 a 100 mg / ml de oxitetraciclina HCL o de 1 a 10 mg / ml de gramacidina.

b) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque se añade una enzima proteolítica a la composición para proporcionar desbridamiento enzimático de heridas patógenas cuando sea necesario, por ejemplo, de 10 a 100 unidades / ml de colagenasa o elastasa, de 10 a 100 unidades / ml de estreptoquinasa o de 10 a 100 unidades / ml de estreptodornasa.

c) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque se añade un astringente a la composición para proporcionar una composición terapéutica de emergencia o para el campo de batalla, por ejemplo de 75 a 250 mg / ml de alumbre, de 100 a 1000 mg / ml de hamamelis, de 1 a 10 % de polividona yodada, de 10 a 100 mg / ml de ozono como base de oxígeno o de 10 a 100 mg / ml de peróxido de hidrógeno.

d) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque se añade una diamina a la composición para reducir la reticulación de colágeno, por ejemplo, de 1 a 50 mg / ml de putrescina, de 1 a 100 mg / ml de espermidina o de 1 a 150 mg / ml de cadaverina.

e) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque

se añade un factor de crecimiento a la composición acuosa para mejorar los procesos de cicatrización naturales y estimular el crecimiento, por ejemplo, de 10 a 100 unidades / ml de PGDF, PDAF, PDEGE o PF – 4, de 10 a 100 unidades / ml de FGF, de 10 a 100 unidades / ml de EGF, de 10 a 100 unidades / ml de TGF o de 10 a 100 unidades / ml de IGF.

- 5 f) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque se añade un potenciador inmune a la composición para estimular la cicatrización de la herida, por ejemplo, de 10 a 100 mg /ml de L – arginina, de 5 a 50 mg / ml de óxido nítrico, de 50 a 500 mg / ml de Quadrol, de 50 a 500 mg / ml de muramil dipéptido, de 10 a 100 mg / ml de factor activador de macrófagos o de 1 a 10 mg / ml de ácido hialurónico.
- 10 g) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque se añade un ion metálico a la composición, por ejemplo, de 1 a 10 mg / ml de cloruro de zinc, de 1 a 10 mg / ml de gluconato de zinc, de 1 a 100 mg / ml de gluconato de magnesio o de 1 a 10 mg / ml de sales de cobre o péptidos.
- 15 h) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque se añade una vitamina a la composición, por ejemplo de 10 a 100 unidades / ml de vitamina A, de 50 a 500 mg / ml de vitamina C o de 50 a 500 unidades / ml de vitamina E.
- 20 i) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1, excepto porque se añade un analgésico a la composición para el tratamiento de heridas traumáticas en emergencias o para el campo de batalla, por ejemplo, de 5 a 50 mg / ml de sulfato de morfina, de 1 a 10 mg / ml de citrato fentanilo o de 5 a 50 mg / ml de hidroclo-ro de lidocaína.
- j) Una composición terapéutica hecha de microesferas como se describe en el apartado 5.1 administrada en combinación con terapias de radiación, tratamientos por láser, ozonoterapia o terapias hiperbárica.

REIVINDICACIONES

1. Una composición conservada para su almacenaje y posterior mezcla a partir de la cual la composición se puede rociar y aplicar en la superficie de una herida, dicha composición comprende:

- 5 - Aproximadamente 0,001 – 25 % en peso de microesferas no biodegradables en suspensión, en la que dichas microesferas:
 - 10 - Tienen un diámetro que oscila entre 0,01 µm y 200 µm;
 - Muestran grupos superficiales con carga negativa;
 - Son capaces de formar puntos de contacto múltiples con una membrana celular
 - Están hechas de un material seleccionado del grupo formado por poliestireno, poliestireno derivado, bromuro de poli – 4 – vinil N – etilpiridinio, polimetilacrilato y silicona;
- 15 - Un agente farmacéutico y
- Un vehículo farmacéuticamente aceptable para dichas microesferas, que son sustancialmente insolubles en dicho vehículo para su uso en el tratamiento de una herida.

2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho vehículo farmacéutico es seleccionado del grupo formado por medio acuoso, vehículo en aerosol, solvente acuoso para agentes farmacológicos, solvente acuoso para fenómenos biológicos, pomadas y vendajes.

3. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en las que dicho agente farmacológico es seleccionado del grupo formado por:

- 25 - Un antibiótico, el antibiótico se selecciona, en la forma preferente, del grupo formado por tetraciclina, oxitetraciclina, sulfato de gentamicina, sulfato neomicina, bacitracina, sulfato de polimixina B y gramaciclina.
- Un antihistamínico
- 30 - Un agente antiinflamatorio
- Un agente anticancerígeno
- Un agente antiviral
- Un agente antifúngico
- Un ion metálico, preferentemente seleccionado del grupo formado por zinc, magnesio, cobalto, hierro, cobre y manganeso
- 35 - Un astringente
- Un anestésico, preferentemente seleccionado del grupo formado por lidocaína, procaína y epinefrina
- Un analgésico, preferentemente seleccionado del grupo formado por morfina, heroína y fentanilo
- Un inhibidor de la ciclooxigenasa – 2
- Una vitamina
- 40 - Un aminoácido
- Un colágeno
- Un factor de crecimiento, preferentemente seleccionado del grupo formado por PDGF, PDAF, PDEGR, TBFB, PF - 4, FGF, BFGF, GH, EGF y IGF
- 45 - Una enzima proteolítica
- Una o más células estromales
- Un potenciador inmunológico, seleccionado del grupo formado por L – arginina, óxido nítrico, Quadrol, muramil dipéptido y otros factores activadores de macrófagos, o
- Ácido hialurónico

4. Un medio compuesto de una composición para su uso en el tratamiento de heridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

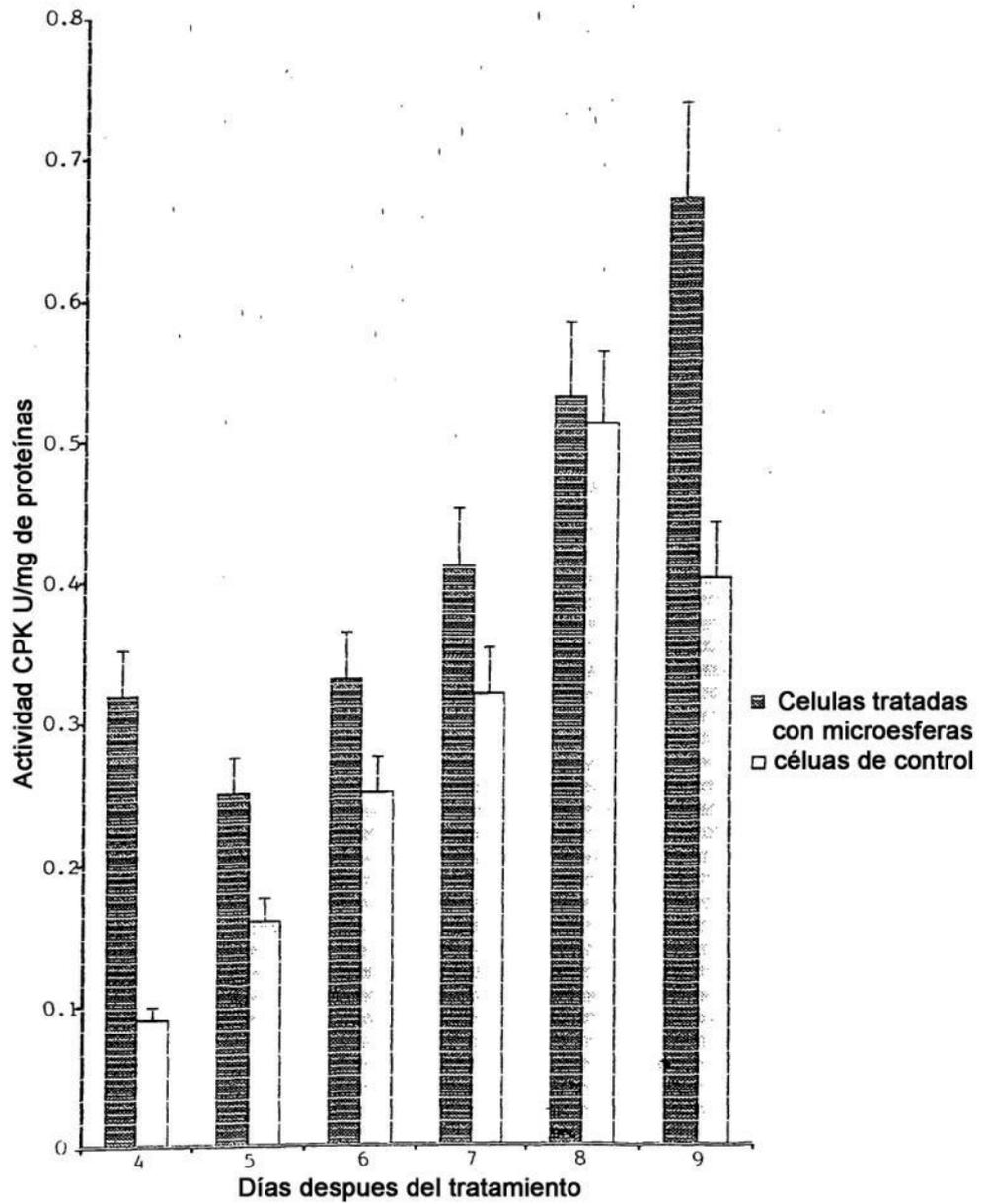
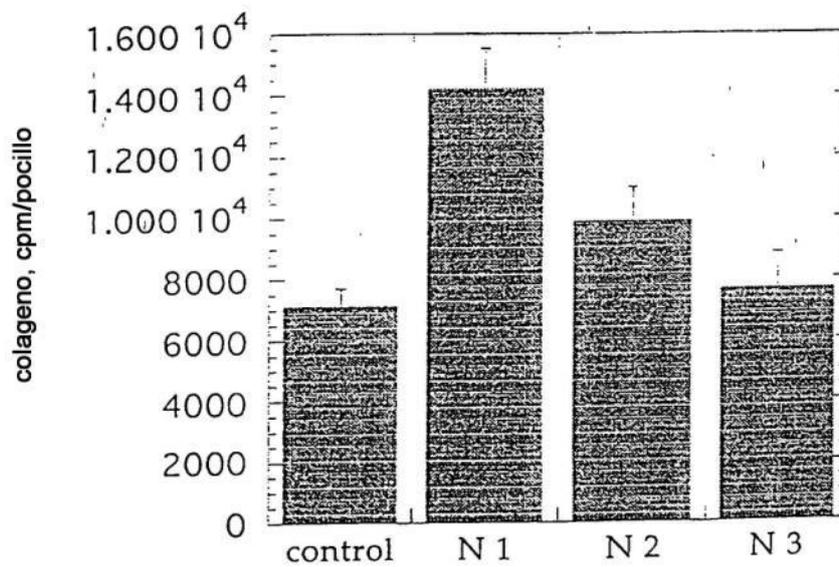


FIGURA 1

Efecto de las microesferas N1, N2 y N3 en la síntesis de colágeno estimulado en ácido ascórbico



* Cada dato presenta la media para cuatro exámenes

FIGURA 2A

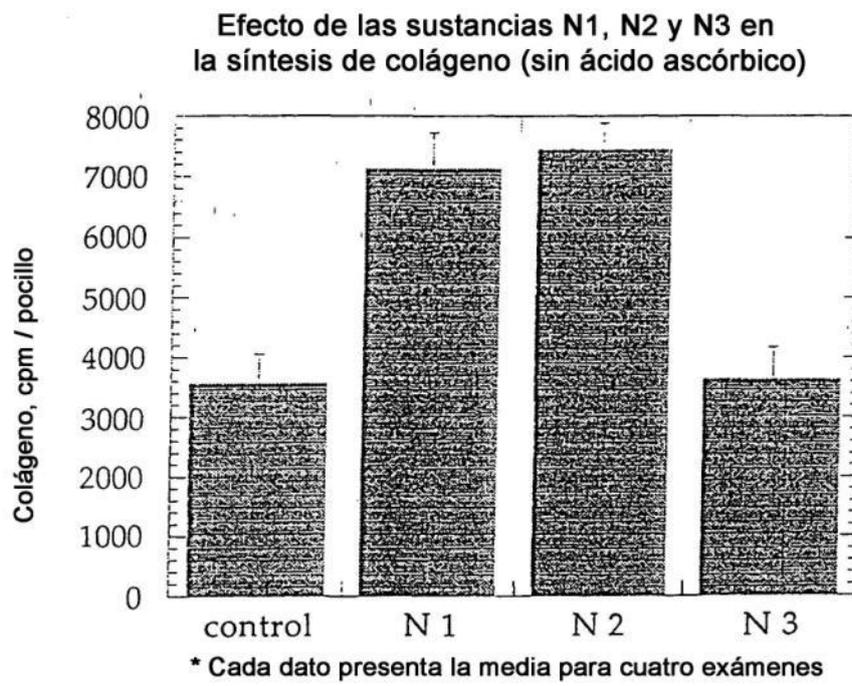


FIGURA 2B



FIGURA 3A

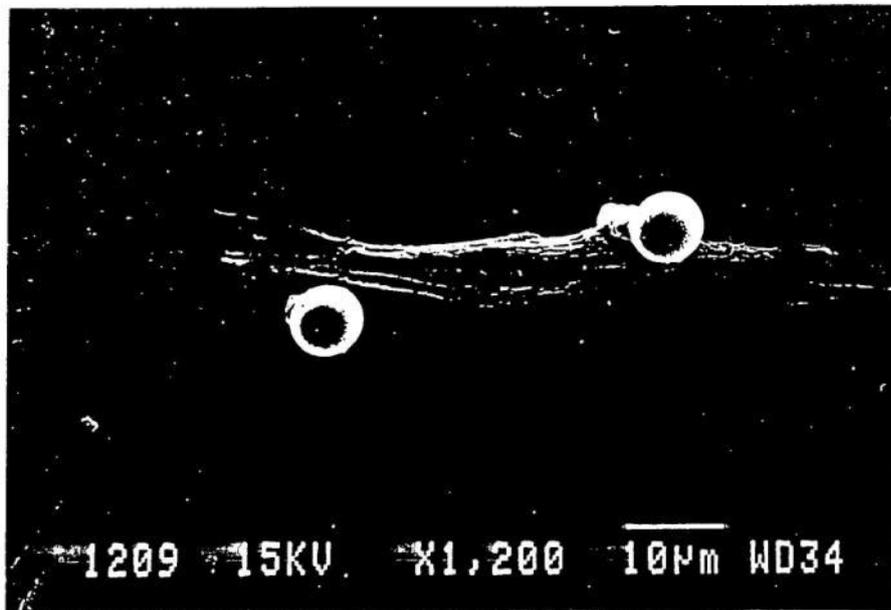


FIGURA 3B

FIGURA 3C





Rata de control
FIGURA 4A



Rata experimental
FIGURA 4B

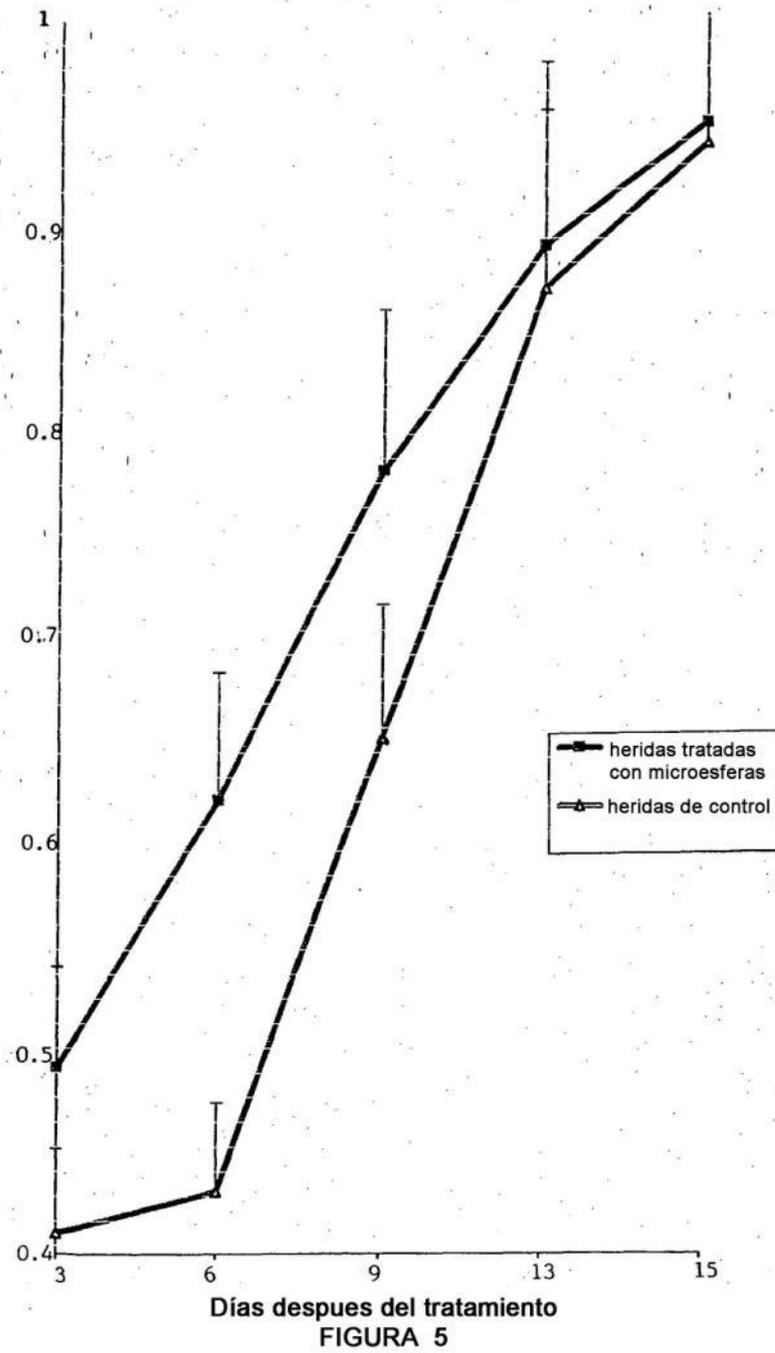
Cicatrización de heridas, tratadas con microesferas (ratas de control)
y con solución salina (ratas de control) 5 días después de la lesión



Rata de control
FIGURA 4C



Rata experimental
FIGURA 4D



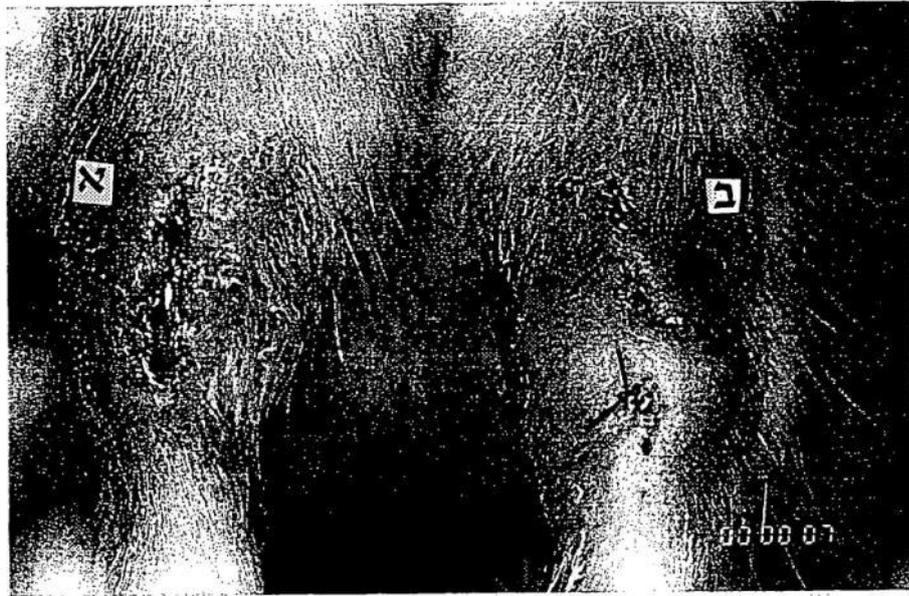


FIGURA 6A

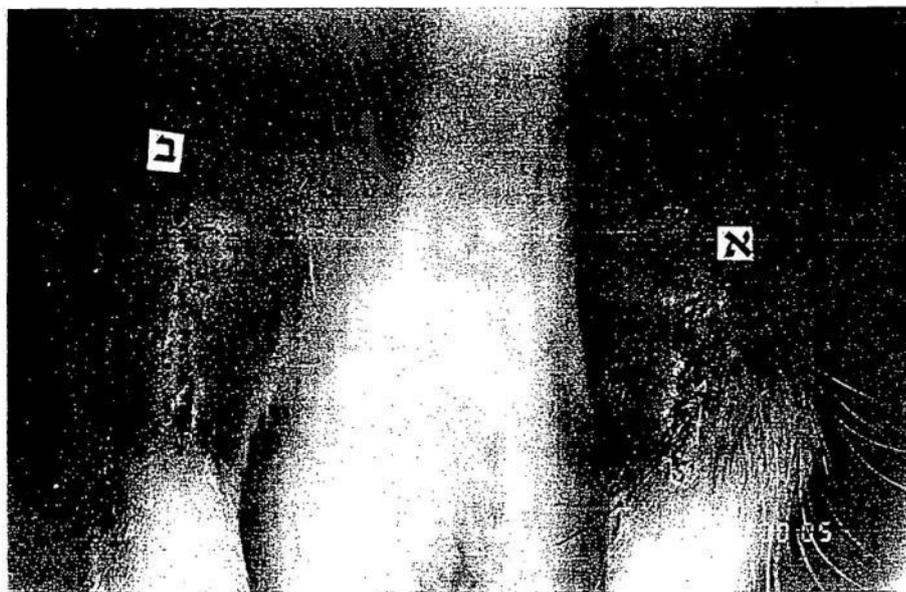


FIGURA 6B



FIGURA 7A

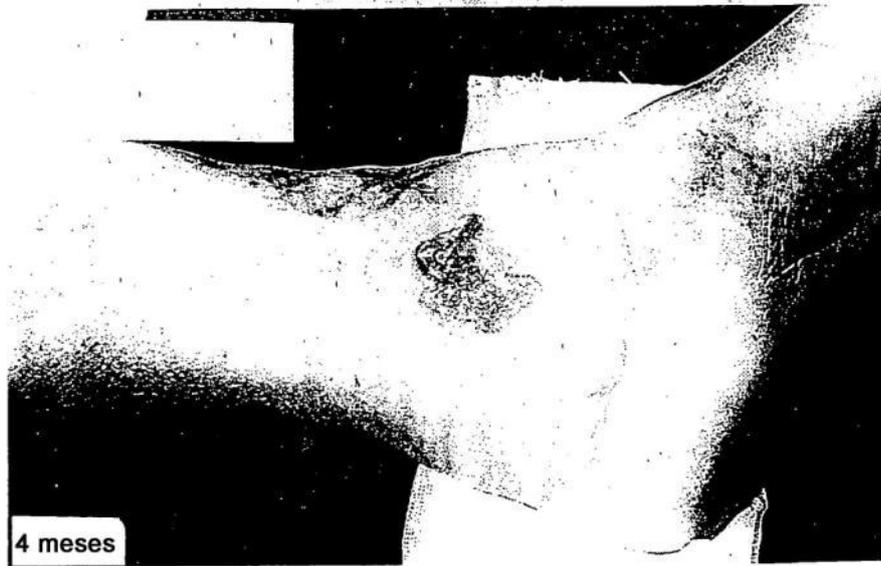


FIGURA 7B

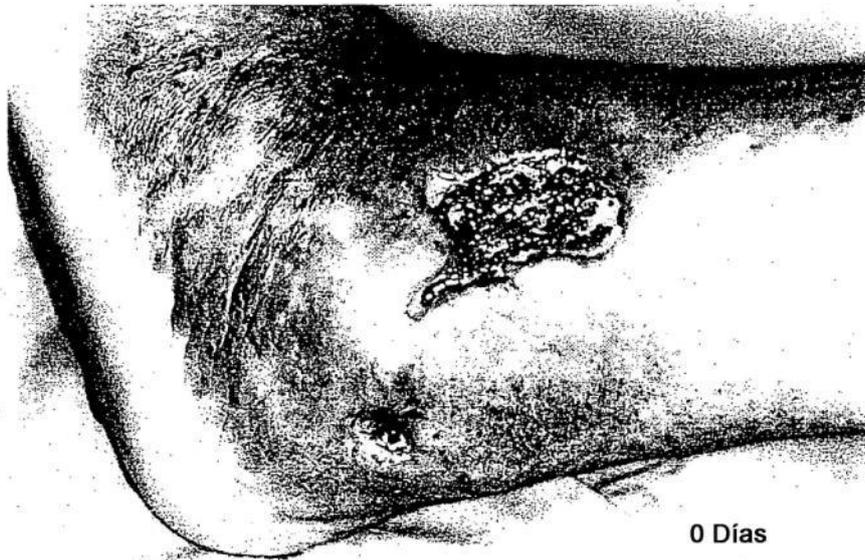


FIGURA 7C



FIGURA 7D

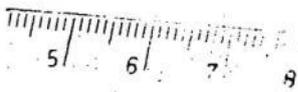


FIGURA 8A



FIGURA 8B



FIGURA 9A

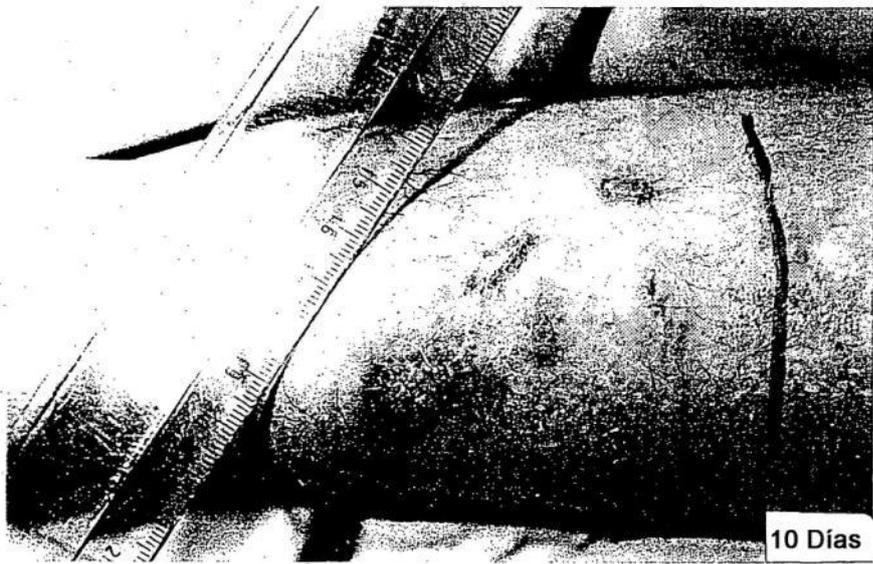


FIGURA 9B

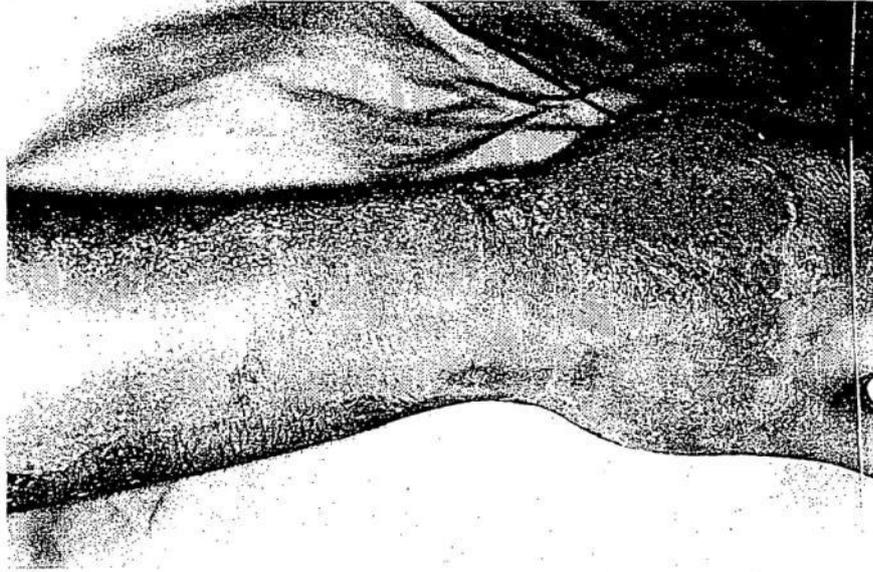


FIGURA 10A

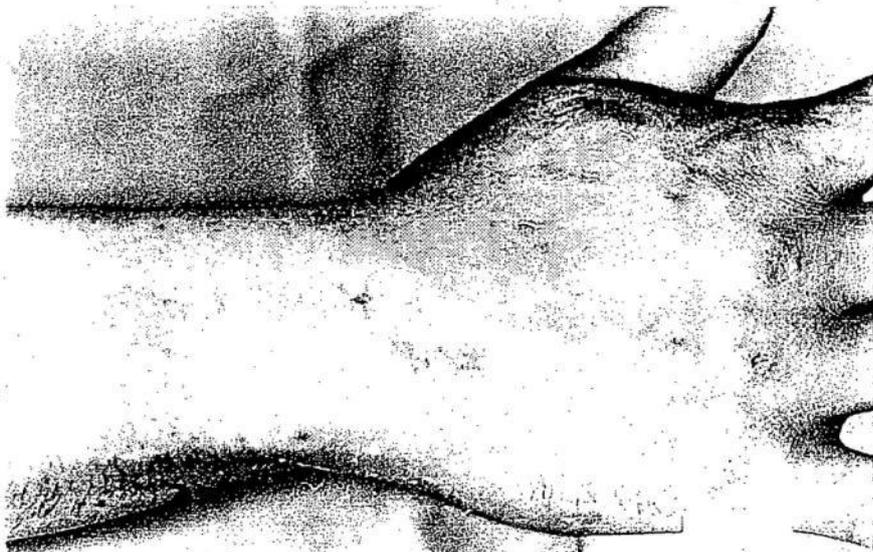


FIGURA 10B

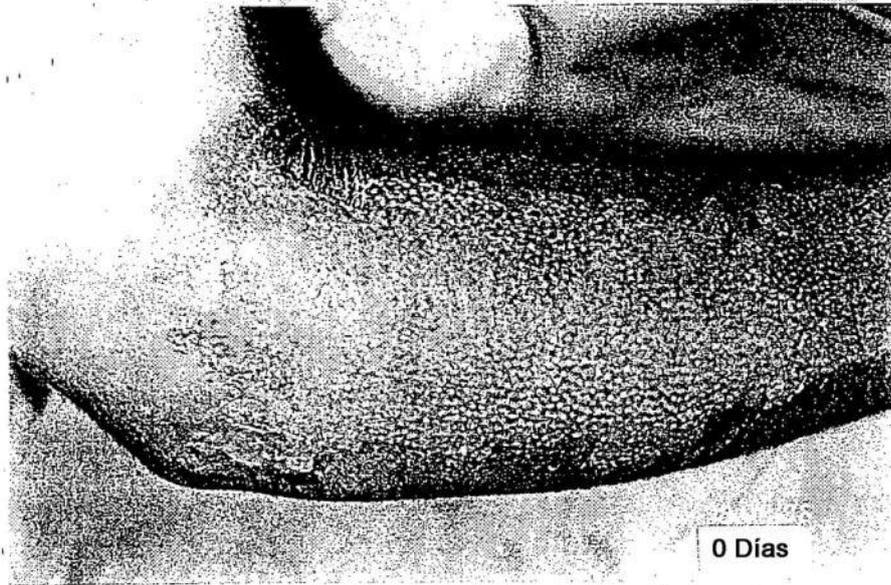


FIGURA 10C

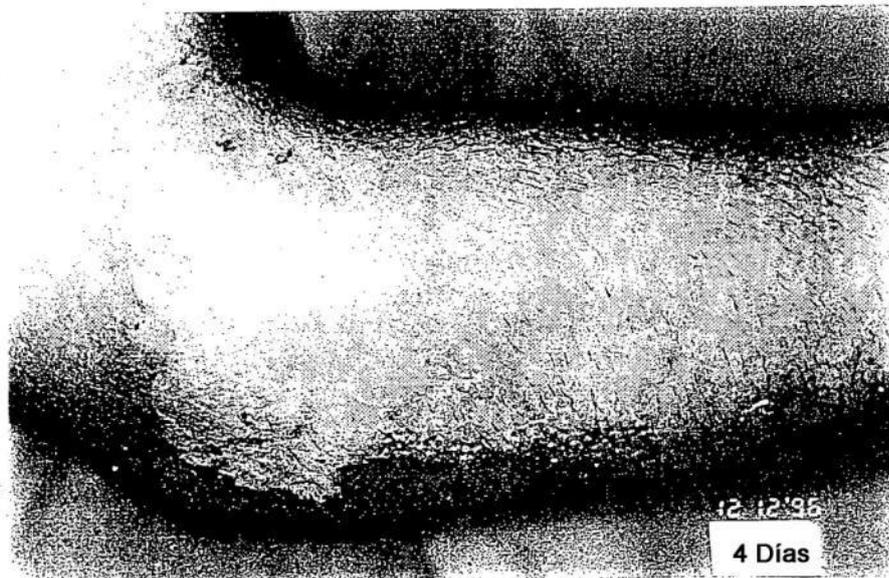


FIGURA 10D



FIGURA 11A



FIGURA 11B

Dia 0 (9 Julio)

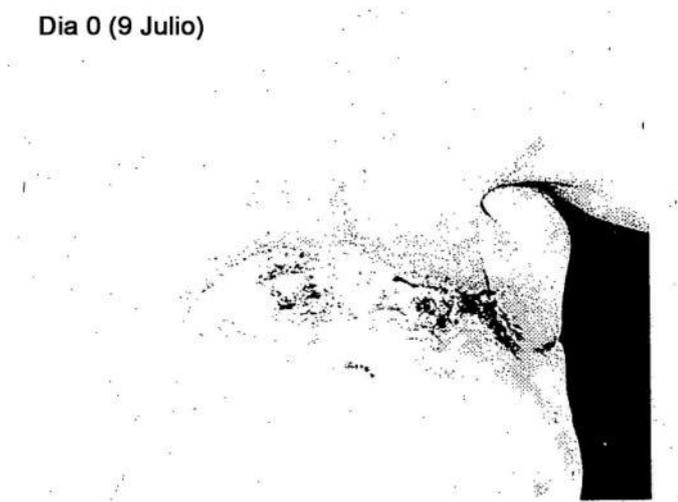
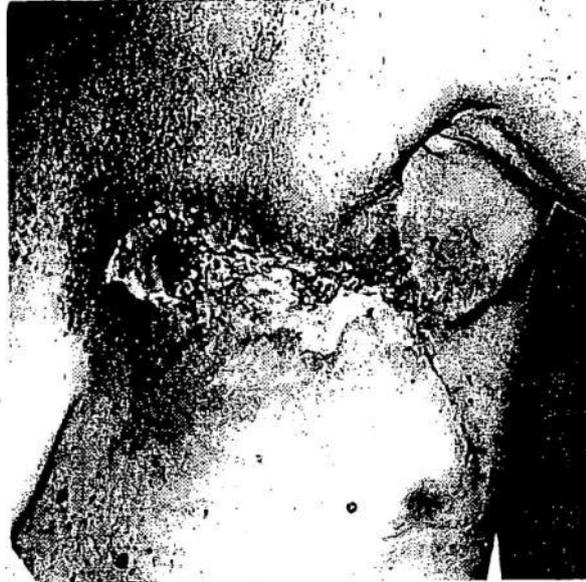


FIGURA 12A

Día 21 (30 Julio)



Día 30 (11 Agosto)

FIGURA 12B

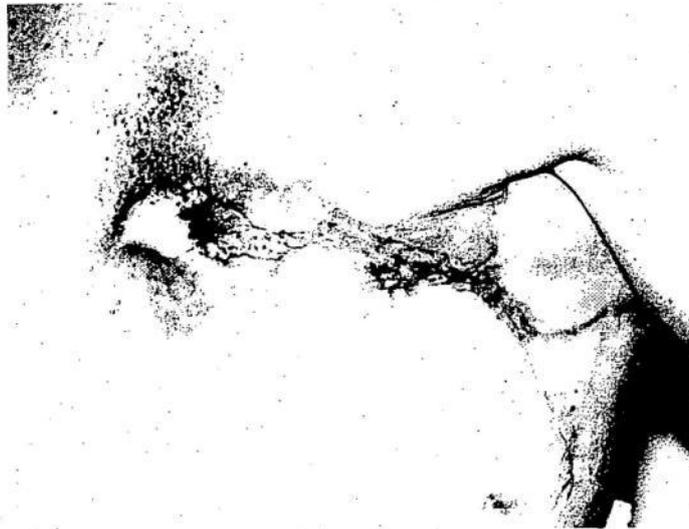


FIGURA 12C

Dia 59 (8 Septiembre)



FIGURA 12D