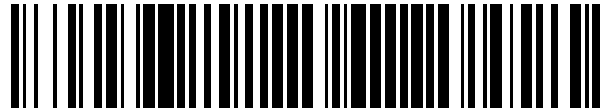


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 567**

51 Int. Cl.:

A61L 26/00 (2006.01)

A61L 15/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2006 E 06812242 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1951328**

54 Título: **Formulación pelicular de liberación sostenida para la curación de heridas que comprende factor de crecimiento epidérmico**

30 Prioridad:

14.11.2005 KR 20050108344

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

08.04.2014

73 Titular/es:

**DAEWOONG CO., LTD. (100.0%)
223-23, Sangdaewon-dong, Joongwon-gu
Sungnam-si, Kyunggi-do 462-120, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SUN HEE;
LEE, SANG KIL;
LEE, MIN SUK y
HONG, JOON PIO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 453 567 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación pelicular de liberación sostenida para la curación de heridas que comprende factor de crecimiento epidérmico.

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a una formulación pelicular de liberación sostenida para la curación de heridas que comprende factor de crecimiento epidérmico; quitosano según se define en las reivindicaciones; uno o más modificadores de la viscosidad seleccionados del grupo que consiste en hidroxipropilmetilcelulosa según se define en las reivindicaciones, goma de gelano, y pululano; y uno o más plastificantes seleccionados del grupo que consiste en glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico) y polivinilpirrolidona; y uno o más antioxidantes
10 seleccionados del grupo que consiste en EDTA y vitamina C.

TÉCNICA PRECEDENTE

- 15 El factor de crecimiento epidérmico es un polipéptido cuyo peso molecular es 6.045, que tiene tres enlaces disulfuro y cincuenta y tres (53) aminoácidos, conocido como urogastrona. Se sabe que el factor tiene actividades tales como promoción de la mitosis y promoción del crecimiento celular en diversas células incluyendo células epidérmicas y células mesenquimales, inhibición de la secreción de ácido gástrico, etc., y de ese modo que es eficaz para tratar heridas cutáneas o corneales, o úlcera gástrica (Carpenter, Experimental Cell Research, 164: 1-10, 1986).

- 20 Sin embargo, el factor de crecimiento epidérmico es demasiado inestable a temperatura ambiente, particularmente en presencia de agua. Y se requiere el período latente de 8 a 12 h a fin de inducir a las células a sintetizar DNA en la zona de la herida. Sin embargo, el período latente del factor de crecimiento epidérmico es aproximadamente 1 h o menos, que es demasiado breve para alcanzar el efecto deseado. Además, el factor de crecimiento epidérmico es difícil de aplicar a heridas de piel externa debido a que el factor es desnaturalizado, descompuesto, condensado y precipitado por una enzima proteolítica existente en la zona de la herida cuando se aplica a la piel, y de ese modo pierde actividad biológica (Manning y cols., Pharmaceutical Res.: 903-917, 1989).

- 25 Para vencer la inestabilidad biológica entre las desventajas anteriores del factor de crecimiento epidérmico y mantener suficientemente el efecto terapéutico, se presentó que se debe mantener uniformemente una concentración eficaz de factor de crecimiento epidérmico en la zona de la herida (Franklin y cols., J. Lab. Clin. Med., 108:103-108, 1986). Así, se han realizado muchos estudios para desarrollar una formulación de liberación sostenida que pueda proporcionar uniformemente factor de crecimiento epidérmico en la zona de la herida. USP nº 4.944.948 divulga una formulación en forma de gel de factor de crecimiento epidérmico/liposomas que proporciona
30 uniformemente factor de crecimiento epidérmico a la zona de la herida usando fosfolípidos neutros, fosfolípidos cargados negativamente y colesterol. En particular, esta invención proporciona un método para liberar uniformemente factor de crecimiento epidérmico durante 12 h o más, pero el método tiene límites para alcanzar una estabilidad de almacenamiento, y de ese modo es difícil de aplicar en la industria. Por lo tanto, para mostrar un efecto terapéutico suficiente, el factor de crecimiento epidérmico como fármaco debe retener una propiedad de liberación de fármaco uniforme, con mantenimiento de la actividad biológica y la estabilidad fisicoquímica en relación
35 con la pureza y el contenido constantes, bajo un almacenamiento a largo plazo.

- 40 Además, EP nº 267015 divulga una película preparada usando factor de crecimiento epidérmico con un polímero celulósico hidrófilo, particularmente con la hidroxipropilmetilcelulosa usada en la presente invención. Sin embargo, la película tiene el problema de que el efecto del factor de crecimiento epidérmico no es suficientemente significativo para la curación de heridas.

EP 0 312 208 A1 divulga una formulación acuosa en forma de gel para la curación de heridas tópicas e incisas, que comprende:

- a) una cantidad eficaz para la curación de heridas de un factor de crecimiento polipeptídico que tiene actividad mitogénica o angiogénica en seres humanos; y
45 b) un polímero farmacéuticamente aceptable soluble en agua o hinchable en agua para proporcionar una viscosidad dentro del intervalo de 1.000 a 12.000.000 cps a temperatura ambiente.

- 50 US 6.124.273 A divulga una "composición de materia" que proporciona una liberación sostenida de proteínas, comprendiendo dicha composición un hidrogel de N,O-carboximetilquitosano covalentemente reticulado que tiene una proteína que se va a aportar incorporada en el mismo en una concentración suficiente para proporcionar dicha liberación sostenida.

WO 01/62276 A1 divulga una composición estable que comprende un factor de crecimiento epidérmico (en lo

sucesivo denominado en la presente memoria "EGF") biológicamente activo como un ingrediente activo y un polímero carboxivinílico como una base.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

MATERIA TÉCNICA

5 El objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación pelicular de liberación sostenida para la curación de heridas que comprende factor de crecimiento epidérmico que puede liberar uniformemente un ingrediente principal durante 1 semana, con mantenimiento de la actividad biológica y la actividad fisicoquímica del factor de crecimiento epidérmico, usando quitosano, según se define en las reivindicaciones, que tiene actividad antibacteriana como base principal para maximizar el efecto de curación de heridas del factor de crecimiento epidérmico; hidroxipropilmetilcelulosa según se define en las reivindicaciones, goma de gelano, o pululano como la base pelicular para liberar uniformemente el ingrediente principal con mantenimiento de la estabilidad del factor de crecimiento epidérmico; un antioxidante que es EDTA y/o vitamina C como agente estabilizante; y uno o más de glicerina, propilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polietilenglicol como plastificante.

10 Cuando la película según la presente invención se aplica a la zona de la herida, la película secada absorbe exudación que se va a transformar en hidrogel, y de ese modo se puede adherir fácilmente al cuerpo. Además, la película puede maximizar el efecto terapéutico del factor de crecimiento epidérmico, y puede mantener la concentración terapéutica eficaz sólo mediante una aplicación al día debido a que la base principal, el quitosano, tiene actividad antibacteriana.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 Las Figs. 1 a 3 son gráficos que muestran la velocidad de liberación in vitro de la película para la curación de heridas que comprende factor de crecimiento epidérmico y quitosano según la presente invención, durante un día.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra las velocidades de producción de impurezas de la película para la curación de heridas que comprende factor de crecimiento epidérmico y quitosano según la presente invención, bajo la condición de almacenamiento en frío durante un año.

25 Las Figs. 5 y 6 son cada una fotografías de una zona de herida antes y después del tratamiento del grupo de control y la película para la curación de heridas que comprende factor de crecimiento epidérmico y quitosano según la presente invención.

MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

30 La presente invención se refiere a una formulación pelicular de liberación sostenida para la curación de heridas que comprende factor de crecimiento epidérmico; quitosano según se define en las reivindicaciones; uno o más modificadores de la viscosidad seleccionados del grupo que consiste en hidroxipropilmetilcelulosa según se define en las reivindicaciones, goma de gelano, y pululano; uno o más plastificantes seleccionados del grupo que consiste en glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico) y polivinilpirrolidona; y uno o más antioxidantes seleccionados del grupo que consiste en EDTA y vitamina C.

35 Y la presente invención se refiere a una formulación pelicular según se define en las reivindicaciones caracterizada porque comprende adicionalmente un apósito de espuma o un apósito de tipo hidrocoloidal para la formulación pelicular de liberación sostenida anterior.

40 El factor de crecimiento epidérmico que es un ingrediente activo de la formulación pelicular de liberación sostenida de la presente invención se puede aplicar bien a proteína natural o bien a proteína de recombinación. El factor de crecimiento epidérmico en la presente formulación pelicular se usa en una cantidad de 0,1 a 10.000 µg/g, más preferiblemente de 1 a 5.000 µg/g, que es una concentración farmacológicamente eficaz. Si el contenido de factor de crecimiento epidérmico es menor de 0,1 µg/g, la formulación pelicular no es farmacológicamente eficaz. Si el contenido es mayor de 10.000 µg/g, la formulación pelicular puede ser tóxica. En la presente, el pH de la formulación pelicular se ajusta preferiblemente hasta de 5 a 7, que es el intervalo para mantener la estabilidad del factor de crecimiento epidérmico.

45 El quitosano que es la base principal de la presente invención es según la presente invención un polímero que tiene de 10 a 150 kDa de peso molecular. Si el peso molecular es menor de 10 kDa, el quitosano no puede mantener la viscosidad del hidrogel. Si el peso molecular es mayor de 150 kDa, la viscosidad de la solución de polímero es tan alta que la preparación es muy difícil. Además, el quitosano en la formulación pelicular se usa en una cantidad de 1,0 a 10,0% p/p basado en el peso total. Si la cantidad de quitosano está fuera de dicho intervalo, la viscosidad es tan baja que la preparación es difícil.

5 El antioxidante usado para estabilizar el factor de crecimiento epidérmico es uno o más seleccionado del grupo que consiste en EDTA y vitamina C. En la presente invención, el antioxidante se usa preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 10% p/p basado en el peso total, más preferiblemente, de 0,05 a 5% p/p. Si la cantidad está fuera de dicho intervalo, es difícil conseguir la estabilidad del factor de crecimiento epidérmico. Además, preferiblemente, la presente formulación pelicular puede comprender adicionalmente uno o más tampones seleccionados del grupo que consiste hidrogenofosfato sódico, hidrogenocarbonato sódico y citrato sódico; o uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L-histidina, L-lisina y L-arginina para estabilizar la formulación.

10 En la presente invención, el modificador de la viscosidad es uno o más seleccionado del grupo que consiste en hidroxipropilmetilcelulosa según se define en las reivindicaciones, goma de gelano, y pululano. En la presente, la hidroxipropilmetilcelulosa se puede clasificar según la viscosidad en hidroxipropilmetilcelulosa de baja viscosidad e hidroxipropilmetilcelulosa de alta viscosidad. La hidroxipropilmetilcelulosa de baja viscosidad funciona como una base auxiliar pelicular y la hidroxipropilmetilcelulosa de alta viscosidad representa un papel para controlar la liberación sostenida. Según la invención, se usan mezclas hidroxipropilmetilcelulosa de baja viscosidad de 10 a 100 cps e hidroxipropilmetilcelulosa de alta viscosidad de 1.000 a 100.000 cps. El modificador de la viscosidad se usa preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 20,0% p/p, más preferiblemente, de 0,01 a 5% p/p. Si la cantidad está fuera de dicho intervalo, la viscosidad de la base antes de secar se ve suficientemente afectada para provocar un problema en la preparación.

20 La formulación pelicular de liberación sostenida de la presente invención comprende adicionalmente uno o más plastificantes seleccionados del grupo que consiste en glicerina, polipropilenglicol, polivinilpirrolidona y polietilenglicol. La cantidad de plastificante es preferiblemente de 1 a 40% p/p, más preferiblemente, de 1 a 20% p/p. Si la cantidad de plastificante es menor de 1% p/p, la película se separaría del papel de revestimiento. Si la cantidad es mayor de 40% p/p, el tiempo de secado y el peso total se incrementan para facilitar la gelificación, lo que puede provocar un problema durante el proceso.

25 Se añade agua a la formulación pelicular de liberación sostenida de la presente invención para hacer el volumen total 100% p/p.

Un apósito de espuma o un apósito de tipo hidrocoloidal conocido en la técnica se puede añadir a la formulación pelicular según la presente invención. Además, para mantener la conformación de la película y evitar la contaminación externa, se puede añadir un apósito que comprende adicionalmente plata o alginato al apósito de espuma o el apósito de tipo hidrocoloidal.

30 La formulación pelicular de liberación sostenida para la curación de heridas según la presente invención se puede preparar mediante los siguientes métodos.

35 Se ponen en un recipiente adecuado quitosano según se define en las reivindicaciones, un modificador de la viscosidad y un plastificante. A continuación, se añade a esto agua destilada y se agita para que se homogeneice completamente. Se añaden a esto un antioxidante como un estabilizante y factor de crecimiento epidérmico, y se mezclan homogéneamente para preparar una composición para preparar la presente película. Aquí, la viscosidad de la composición es preferiblemente de 1.000 a 150.000 cps, más preferiblemente, de 4.000 a 120.000 cps. Si la viscosidad está fuera de dicho intervalo, la propia preparación sería difícil debido a que el vertido es difícil.

40 La composición que se prepara anteriormente se mantiene en una nevera de 4•10°C durante aproximadamente un día, y a continuación se vierte sobre papel revestido y se seca para preparar la formulación pelicular de liberación sostenida para la curación de heridas. El grosor de la película preparada anteriormente es preferiblemente de 0,001 a 1 mm, que es el intervalo fácil para la preparación y el tratamiento, más preferiblemente, de 0,01 a 0,5 mm. El contenido de agua de la película, que es un factor importante que afecta a la estabilidad del factor de crecimiento epidérmico y la condición de preparación de la película, es preferiblemente de 1 a 30%, más preferiblemente, de 10 a 25%.

45 Posteriormente en la presente memoria, la presente invención se describe específicamente mediante ejemplos. Sin embargo, los ejemplos se proporcionan para explicar la presente invención, y de ese modo el alcance de la presente invención no está limitado por ellos de ningún modo.

<Ejemplo 1: Preparación de la formulación pelicular de liberación sostenida según la presente invención>

50 La formulación pelicular de liberación sostenida de la presente invención que comprende factor de crecimiento epidérmico, quitosano, un modificador de la viscosidad, un plastificante y un estabilizante se preparó mediante el siguiente procedimiento:

Se pusieron en un recipiente adecuado quitosano, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), uno o más modificadores de la viscosidad seleccionados del grupo que consiste en goma de gelano, y pululano, y uno o más plastificantes

5 seleccionados del grupo que consiste en glicerina, polipropilenglicol, polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol (PEG). A continuación, se añadió a esto agua destilada, y se agitó para que se homogeneizara completamente. Se añadieron a esto uno o más antioxidantes seleccionados del grupo que consiste en EDTA y vitamina C como estabilizante, y factor de crecimiento epidérmico recombinante, es decir, formulación de factor de crecimiento epidérmico liofilizada (Daewoong Co.) y se mezclaron homogéneamente. A continuación, la mezcla se mantuvo en una nevera de 4•10°C durante aproximadamente un día, y a continuación se vertió sobre papel revestido, y se expuso al aire o se liofilizó para preparar la formulación pelicular de liberación sostenida para la curación de heridas según la presente invención.

10 **<Ejemplo 2: Análisis de la propiedad fisicoquímica de la formulación pelicular de liberación sostenida según la presente invención por ingredientes>**

15 Para analizar la propiedad fisicoquímica de la formulación pelicular de liberación sostenida según la presente invención por ingredientes, se prepararon películas (DWF1 a DWF6) que comprendían factor de crecimiento epidérmico usando los ingredientes descritos en la siguiente Tabla 1 según el mismo método del Ejemplo 1. Solamente, el grosor de las películas era 1,0 mm cuando la película se vierte, y el método de secado era exposición al aire a 40°C durante 1 h.

[Tabla 1]

Composición	Componentes (en 10 g)	
DWF1 (Ejemplo Comparativo)	factor de crecimiento epidérmico	1 mg
	quitosano	1 g
	glicerina	10 g
	agua	cantidad apropiada
DWF2 (Ejemplo Comparativo)	factor de crecimiento epidérmico	1 mg
	quitosano	1 g
	hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps	10 g
	glicerina	10 g
	agua	cantidad apropiada
DWF3	factor de crecimiento epidérmico	1 mg
	quitosano	1 g
	hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps	5 g
	hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps	1 g
	glicerina	10 g
	agua	cantidad apropiada

(continuación)

Composición	Componentes (en 10 g)	
DWF4 (Ejemplo Comparativo)	factor de crecimiento epidérmico	1 mg
	quitosano	1 g
	gelatina	10 g
	glicerina	10 g
	agua	cantidad apropiada
DWF5 (Ejemplo Comparativo)	factor de crecimiento epidérmico	1 mg
	quitosano	1 g
	polietilenglicol	10 g
	glicerina	10 g
	agua	cantidad apropiada
DWF6 (Ejemplo Comparativo)	factor de crecimiento epidérmico	1 mg
	quitosano	1 g
	polivinilpirrolidona	10 g
	glicerina	10 g
	agua	cantidad apropiada

5 La pureza del factor de crecimiento epidérmico en DWF1 a DWF6 preparadas anteriormente se determinó mediante HPLC en fase inversa. Y se midieron la propiedad y la condición, el grosor y el contenido de humedad de la película preparada anteriormente y los resultados se mostraron en la siguiente Tabla 2.

[Tabla 2]

Clasificación	Propiedad y condición	Grosor	Contenido de humedad (%)	Pureza del EGF (%)
DWF1 (quitosano solo)	contracción	50 ± 10 µm	20 ± 5%	92 ± 0,5%
DWF2 ((HPMC 50 cps)	un poco de contracción	100 ± 10 µm	20 ± 2%	94 ± 0,5 %
DWF3 (HPMC 50 cps/HPMC 4000 cps)	buenas	150 ± 10 µm	20 ± 3%	95 ± 0,6%
DWF4 (gelatina)	buenas	140 ± 10 µm	20 ± 4 %	87 ± 0,9%
DWF5 (PEG)	buenas	100 ± 10 µm	20 ± 5%	93 ± 0,5 %
DWF6 (PVP)	buenas	100 ± 10 µm	20 ± 3%	93 ± 0,6%

Según se muestra en la Tabla 2 anterior, se confirmaba que las películas preparadas mezclando otros polímeros

5 tales como HPMC, glicerina, PEG y PVP (DWF2-DWF6) tienen propiedad y condición superiores que la película DWF1 preparada solo mediante quitosano. Solamente cuando se usaba gelatina como polímero (DWF4), el factor de crecimiento epidérmico se degradaba para dar como resultado una disminución de la pureza del factor de crecimiento epidérmico durante el proceso de incremento de la temperatura en el momento de preparar la base pelicular. En particular, cuando se usaba hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) como un modificador de la viscosidad, el factor de crecimiento epidérmico era el superior en la propiedad y la condición y la pureza.

<Ejemplo 3: Propiedad de liberación de factor de crecimiento epidérmico según la viscosidad y el grosor de la película>

10 Para confirmar la propiedad de liberación de factor de crecimiento epidérmico según la viscosidad de la película y el contenido de ingredientes principales, se prepararon las películas (DWF7 a DWF14) usando los ingredientes descritos en la siguiente Tabla 3 según los mismos métodos del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Las películas DWF13 y DWF14 se prepararon en diferentes grosores de vertido, y la viscosidad y el grosor de cada película se midieron y se mostraron en la siguiente Tabla 3.

[Tabla 3]

Composición	Componentes (en 10 g)	Contenido	Viscosidad	Grosor
DWF7	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4.000 cps pululano glicerina agua destilada	10,0 mg 5,0 g 10,0 g 1,0 g 0,05 g 10,0 g cantidad apropiada (en 100 g)	8~10 mps	160 ± 10 µm
DWF8	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps pululano glicerina agua destilada	10,0 mg 5,0 g 10,0 g 1,0 g 0,1 g 10,0 g cantidad apropiada (en 100 g)	12~15 mps	160 ± 10 µm
DWF9	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps	10,0 mg 5,0 g 10,0 g 0,5 g	7~9 mps	155 ± 10 µm

ES 2 453 567 T3

(continuación)

Composición	Componentes (en 10 g)	Contenido	Viscosidad	Grosor
DWF9	pululano glicerina agua destilada	0,05 g 10,0 g cantidad apropiada (en 100 g)		
DWF10	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps pululano glicerina agua destilada	10,0 mg 5,0 g 10,0 g 2,0 g 0,05 g 10,0 g cantidad apropiada (en 100 g)	17~20 mps	165 ± 10 µm
DWF11	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps pululano glicerina agua destilada	5,0 mg 5,0 g 10,0 g 1,0 g 0,05 g 10,0 g cantidad apropiada (en 100 g)	8~10 mps	160 ± 10 µm
DWF12	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps pululano glicerina agua destilada	1,0 mg 5,0 g 10,0 g 1,0 g 0,05 g 10,0 g cantidad apropiada (en 100 g)	8~10 mps	160 ± 10 µm

(continuación)

Composición	Componentes (en 10 g)	Contenido	Viscosidad	Grosor
DWF13 (vertido de 2,0 mm)	factor de crecimiento epidérmico	10,0 mg	12~15 mps	300 ± 10 µm
	quitosano	6,25 g		
	hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps	12,5 g		
	hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps	1,25 g		
	pululano	0,125 g		
	glicerina	12,5 g		
	agua destilada	cantidad apropiada (en 125 g)		
DWF14 (vertido de 3,0 mm)	factor de crecimiento epidérmico	10,0 mg	12~15 mps	455 ± 10 µm
	quitosano	7,5 g		
	hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps	15,0 g		
	hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps	1,5 g		
	pululano	0,15 g		
	glicerina	15,0 g		
	agua destilada	cantidad apropiada (en 150 g)		

5 Para analizar cada cantidad liberada de factor de crecimiento epidérmico desde las películas DWF7 a DWF12 preparadas anteriormente, se efectuó una prueba de liberación. Los resultados se mostraron en la siguiente Tabla 4 y las Figs. 1 y 2.

10 La prueba de liberación se efectuó usando un aparato de difusión de Franz. El medio de liberación se cargó con tampón de ácido fosfórico (pH 7,4, 0,02% de Tween 20), se mantuvo a $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y se ajustó para entrar en contacto directamente con tampón sin membrana. Las películas así preparadas se cortaron hasta el tamaño de prueba para la aplicación. Las mezclas de 300 µl se tomaron cada una de las películas en los momentos señalados de 1, 3, 6, 9, 15, 18 y 24 h. A continuación, las cantidades liberadas de EGF se determinaron mediante HPLC y los valores determinados se mostraron como % de liberación con respecto al valor inicial.

[Tabla 4]

Tiempo (h)	Cantidad liberada de factor de crecimiento epidérmico % (media ± desviación estándar)					
	DWF7	DWF8	DWF9	DWF10	DWF11	DWF12
1	3,5 ± 1,25	2,3 ± 1,23	5,4 ± 2,35	0,9 ± 0,20	2,1 ± 0,91	1,2 ± 0,09
3	5,7 ± 2,34	3,4 ± 1,10	11,3 ± 2,43	2,1 ± 1,12	4,3 ± 1,25	3,2 ± 1,20

(continuación)

Tiempo (h)	Cantidad liberada de factor de crecimiento epidérmico % (media \pm desviación estándar)					
	DWF7	DWF8	DWF9	DWF10	DWF11	DWF12
6	23,0 \pm 2,24	15,2 \pm 3,2	30,2 \pm 3,50	9,2 \pm 1,26	19,2 \pm 2,30	14,1 \pm 2,34
9	47,0 \pm 2,53	36,2 \pm 2,35	56,3 \pm 2,26	15,2 \pm 2,35	38,2 \pm 2,5	29,3 \pm 3,23
15	69,2 \pm 1,92	54,3 \pm 3,26	78,2 \pm 4,30	45,3 \pm 3,24	62,1 \pm 3,63	53,2 \pm 2,12
18	79,3 \pm 1,20	68,2 \pm 4,24	83,2 \pm 3,64	60,2 \pm 3,24	70,21 \pm 4,24	65,3 \pm 2,51
24	97,5 \pm 2,10	89,3 \pm 3,24	98,1 \pm 2,12	78,2 \pm 4,53	91,2 \pm 3,40	81,3 \pm 1,92

5 Según se muestra en la Tabla 4 y la Fig. 1, se confirmaba que cuanto mayor es la viscosidad de la película, más se retrasa la liberación de factor de crecimiento epidérmico. Además, como se muestra en la Fig. 2, se confirmaba que la cantidad liberada de factor de crecimiento epidérmico desde DWF12 (1,0 mg) que contenía las menores cantidades de ingredientes principales era menor que la de DWF11 (5,0 mg), con lo que se concluía que cuanto menores son las cantidades de ingredientes principales, más se retrasa la liberación. Esto confirmaba que la velocidad de liberación de factor de crecimiento epidérmico está controlada por la viscosidad y la cantidad, y de ese modo el factor de crecimiento epidérmico muestra una liberación lineal durante 24 h.

10 Además, se midieron las cantidades liberadas de factor de crecimiento epidérmico desde DWF13 y DWF14 y se muestran en la siguiente Tabla 5 y la Fig. 3. Como se muestra en la Tabla 5, se confirmaba que cuanto más gruesa es la película, más se retrasa la velocidad de liberación de factor de crecimiento epidérmico. En resumen, se confirmaba que la velocidad de liberación de factor de crecimiento epidérmico está controlada por la viscosidad y el grosor de la película.

[Tabla 5]

Tiempo (h)	Cantidad liberada de factor de crecimiento epidérmico % (media \pm desviación estándar)		
	DWF8 (160 \pm 10 μ m)	DWF13 (300 \pm 10 μ m)	DWF14 (455 \pm 10 μ m)
1	2,3 \pm 1,23	0,3 \pm 0,23	0,4 \pm 0,35
3	3,4 \pm 1,10	2,4 \pm 1,10	1,3 \pm 1,43
6	15,2 \pm 3,2	8,2 \pm 3,8	8,2 \pm 2,50
9	36,2 \pm 2,35	21,2 \pm 3,35	12,3 \pm 2,26
15	54,3 \pm 3,26	40,3 \pm 4,26	26,2 \pm 4,30
18	68,2 \pm 4,24	58,2 \pm 2,24	41,2 \pm 3,64
24	89,3 \pm 3,24	79,3 \pm 4,24	68,1 \pm 2,12

<Ejemplo 4: Estabilidad del factor de crecimiento epidérmico en la película según la adición de estabilizante>

20 Para confirmar la estabilidad del factor de crecimiento epidérmico en la formulación pelicular de liberación sostenida de la presente invención según la adición de estabilizante, se midieron el contenido y la actividad del factor de crecimiento epidérmico en el tiempo desde las películas que comprenden factor de crecimiento epidérmico, quitosano, modificador de la viscosidad y plastificante para cada caso que no se añada estabilizante (DWF 15); solo se añada antioxidante (DWF 17 y 18); solo se añada aminoácido (DWF 16); se añadan antioxidante y aminoácido

ES 2 453 567 T3

(DWF 19); y se añadan antioxidante y tampón (DWF 20).

Para este experimento, se prepararon las películas DWF15 a DWF20 usando los ingredientes descritos en la siguiente Tabla 6 según los mismos métodos que en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2.

[Tabla 6]

Composición	Componentes (en 100 g)		Grosor de la película
DWF15 (-)	factor de crecimiento epidérmico	1,0 mg	160 ± 10 µm
	quitosano	5,0 g	
	hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps	10,0 g	
	hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps	1,0 g	
	pululano	0,05 g	
	glicerina	10,0 g	
	agua destilada	cantidad apropiada	
DWF16 (L-histidina)	factor de crecimiento epidérmico	1,0 mg	160 ± 10 µm
	quitosano	5,0 g	
	hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps	10,0 g	
	hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps	1,0 g	
	pululano	0,05 g	
	glicerina	10,0 g	
	L-histidina	0,1 g	
	agua destilada	cantidad apropiada	

ES 2 453 567 T3

(continuación)

Composición	Componentes (en 100 g)		Grosor de la película
DWF17 (EDTA)	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps pululano glicerina EDTA Disódico agua destilada	1,0 mg 5,0 g 10,0 g 1,0 g 0,05 g 10,0 g 0,05 g cantidad apropiada	160 ± 10 µm
DWF18 (ácido ascórbico)	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps pululano glicerina ácido ascórbico agua destilada	1,0 mg 5,0 g 10,0 g 1,0 g 0,05 g 10,0 g 0,05 g cantidad apropiada	160 ± 10 µm
DWF19 (EDTA + L-histidina)	factor de crecimiento epidérmico quitosano hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps pululano glicerina EDTA Disódico L-histidina agua destilada	1,0 mg 5,0 g 10,0 g 1,0 g 0,05 g 10,0 g 0,05 g 0,1 g cantidad apropiada	160 ± 10 µm

(continuación)

Composición	Componentes (en 100 g)		Grosor de la película
DWF20 (EDTA + Tampón de fosfato)	factor de crecimiento epidérmico	1,0 mg	160 ± 10 µm
	quitosano	5,0 g	
	hidroxipropilmetilcelulosa 50 cps	10,0 g	
	hidroxipropilmetilcelulosa 4000 cps	1,0 g	
	pululano	0,05 g	
	glicerina	10,0 g	
	EDTA Disódico	0,05 g	
	hidrogenofosfato sódico	0,142 g	
	agua destilada	cantidad apropiada	

- 5 Las películas DWF15 a DWF20 preparadas anteriormente se cerraron herméticamente mediante papel de aluminio de envasado, y a continuación se almacenaron a temperatura ambiente (25°C) durante 3 meses, y a temperatura fría (2-8°C) durante 1 año. El contenido y la actividad del factor de crecimiento epidérmico en cada película se midieron a lo largo del tiempo, y se muestran en la siguiente Tabla 7 y la Fig. 4.

[Tabla 7]

Clasificación	25°C (3 meses)		2-8°C (1 año)	
	Contenido (%)	Actividad (%)	Contenido (%)	Actividad (%)
DWF15	77,0	68,0	87,3	87,1
DWF16	90,9	89,1	94,4	93,3
DWF17	93,7	91,2	98,1	97,2
DWF18	92,8	91,5	96,9	97,1
DWF19	95,0	94,5	99,9	98,9
DWF20	94,5	93,9	98,2	99,1

- 10 Según se muestra en la Tabla 7 anterior, se confirmaba que la velocidad de producción de impurezas de otras películas distintas a DWF15 que no comprenden estabilizante era muy baja. Además, las estabilidades de la película DWF16 que comprende aminoácido y las películas DWF17 y DWF18 que comprenden antioxidante eran un poco mejores. La película DWF19 que comprende tanto aminoácido como antioxidante o la película DWF20 que comprende tanto antioxidante como tampón mostraban la estabilidad más alta.

- 15 <Ejemplo 5: Prueba en animales>

5 Para confirmar el efecto farmacológico del factor de crecimiento epidérmico en la formulación pelicular de liberación sostenida de la presente invención, la prueba de comparación se efectuó usando la película de factor de crecimiento epidérmico preparada con hidroxipropilcelulosa como grupo de control y la película DWF20 descrita en la Tabla 6 del Ejemplo 4 preparada mediante el mismo método del Ejemplo 1 como grupo de prueba. Las condiciones de la prueba de comparación se mostraron en la siguiente Tabla 8.

[Tabla 8]

	Grupo de control	Grupo de prueba
	Película general [lámina de 25 mg/l (20 cm ²)]	Formulación pelicular sostenida de la presente invención (DWF20) [lámina de 50 mg/l (20 cm ²)]
Utilización y dosificación	1 lámina se adhiere a la zona de la herida dos veces al día	1 lámina se adhiere a la zona de la herida una vez al día
Período de tiempo	4 días	
Área de la zona de la herida	aproximadamente 20 cm ²	

10 La fotografía de la zona de la herida después de 1 día desde la lesión se mostraba en la Fig. 5, y las fotografías de la zona de la herida después de 4 días desde el tratamiento de los grupos de control y de prueba se mostraban en la Fig. 6. Según se mostraba en las figuras, se confirmó que la herida de rata tratada con la presente película que comprende factor de crecimiento epidérmico, quitosano, modificador de la viscosidad, plastificante, antioxidante y tampón se curaba mucho más rápidamente que la tratada con el control. El resultado anterior se debía a que el EGF se liberaba uniformemente desde la presente película, y se mantenía una concentración eficaz en la zona de la herida, tratando con la presente película sostenida una vez, en comparación con tratar con el control dos veces.

15 Además, el efecto del tratamiento se mejoraba incrementando la actividad antifúngica a través de la adición de quitosano.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

20 La presente invención puede maximizar el efecto de curación de heridas proporcionando una formulación pelicular de liberación sostenida que comprende quitosano, modificador de la viscosidad, plastificante y estabilizante, además de factor de crecimiento epidérmico como ingrediente eficaz. Y la presente formulación pelicular sostenida puede mantener una concentración eficaz mediante la adhesión una vez al día a una zona de herida a diferencia de una formulación de pomada/crema o una formulación en forma de gel que se debe aplicar dos o tres veces al día. Así, no se requiere que la presente película se retire de la zona de la herida para disminuir la exposición de la zona de la herida y proporciona más comodidad a los pacientes y los profesionales médicos.

25 Además, la presente película absorbe exudación, y de ese modo se transforma en un hidrogel para mantener la zona de la herida húmeda, y crear una condición favorable para la curación de la herida. Y la presente película tiene una propiedad de adhesión al cuerpo humano, una actividad antifúngica y una estabilidad bajo una condición de almacenamiento durante uno o más años superiores. Así, la presente película tiene más ventajas que una simple formulación de pomada/crema o formulación en forma de gel.

30

REIVINDICACIONES

1. Una formulación pelicular de liberación sostenida, para la curación de heridas, que comprende factor de crecimiento epidérmico; uno o más modificadores de la viscosidad seleccionados del grupo que consiste en hidroxipropilmetilcelulosa, goma de gelano, y pululano; uno o más plastificantes seleccionados del grupo que consiste en glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, poli(alcohol vinílico) y polivinilpirrolidona; y uno o más antioxidantes seleccionados del grupo que consiste en EDTA y vitamina C,
- 5
- caracterizada porque
- la formulación pelicular de liberación sostenida comprende además quitosano,
- en donde el peso molecular del quitosano es de 10 kDa a 150 kDa,
- 10
- en donde el contenido de quitosano es de 1 a 10% p/p basado en el peso total, y
- en donde dicha hidroxipropilmetilcelulosa comprende hidroxipropilmetilcelulosa de baja viscosidad de 10 a 100 cps e hidroxipropilmetilcelulosa de alta viscosidad de 1.000 a 100.000 cps.
2. La formulación pelicular según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente uno o más tampones seleccionados del grupo que consiste en hidrogenofosfato sódico, hidrogenocarbonato sódico y citrato sódico.
- 15
3. La formulación pelicular según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L-histidina, L-lisina y L-arginina.
4. La formulación pelicular según la reivindicación 1, en la que el contenido de factor de crecimiento epidérmico es de 0,1 a 10.000 mg/g basado en el peso total.
5. La formulación pelicular según la reivindicación 1, en la que el contenido de modificador de la viscosidad es de 0,01 a 20% p/p basado en el peso total.
- 20
6. La formulación pelicular según la reivindicación 1, en la que el contenido de plastificante es de 1 a 40% p/p basado en el peso total.
7. La formulación pelicular según la reivindicación 1, en la que el contenido de antioxidante es de 0,01 a 10% p/p basado en el peso total.
- 25
8. La formulación pelicular según la reivindicación 1, en la que la viscosidad de la formulación pelicular es de 1.000 a 150.000 cps.
9. La formulación pelicular según la reivindicación 1, en la que el grosor de la película es de 0,001 a 1 mm.
10. La formulación pelicular según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente un apósito de espuma o un apósito de tipo hidrocoloïdal.
- 30
11. La formulación pelicular según la reivindicación 10, en la que se añade plata o alginato al apósito de espuma o el apósito de tipo hidrocoloïdal.

Fig. 1

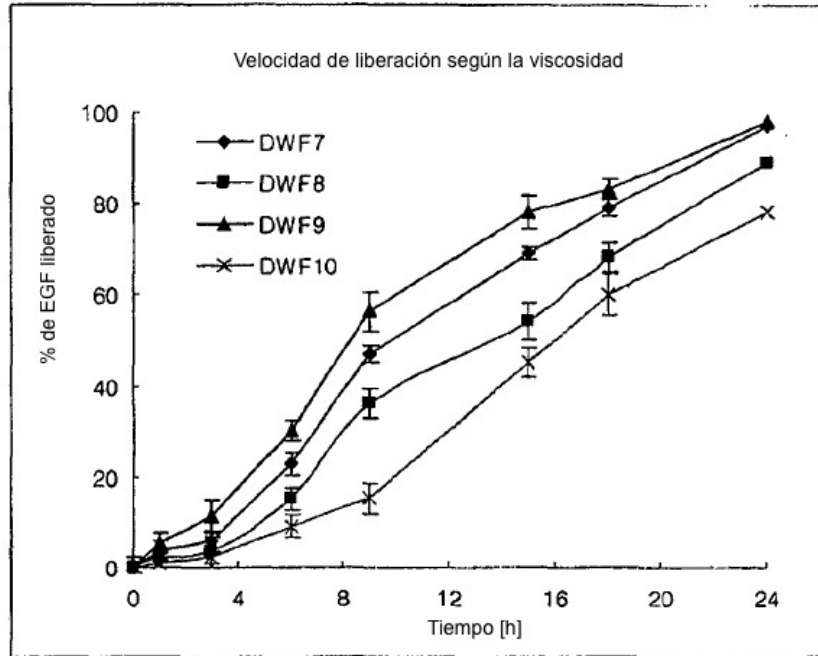


Fig. 2

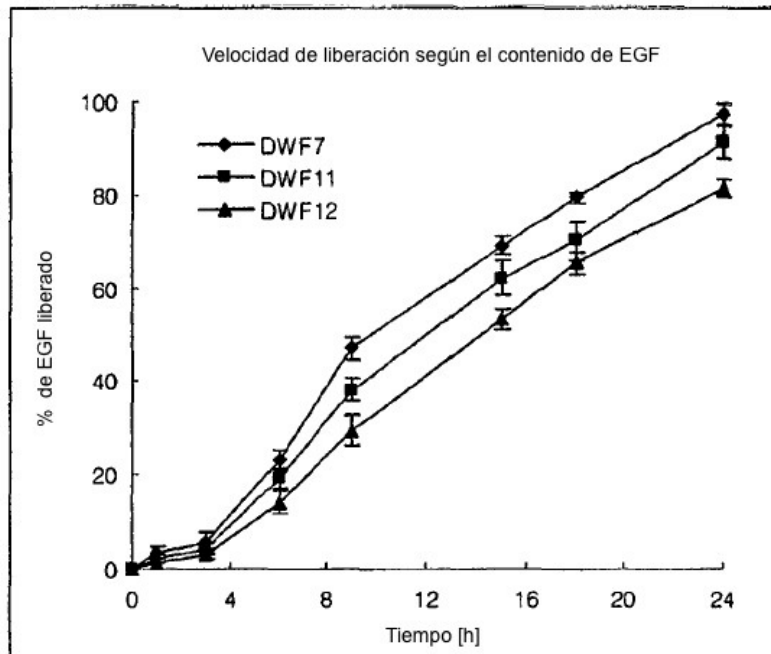


Fig. 3

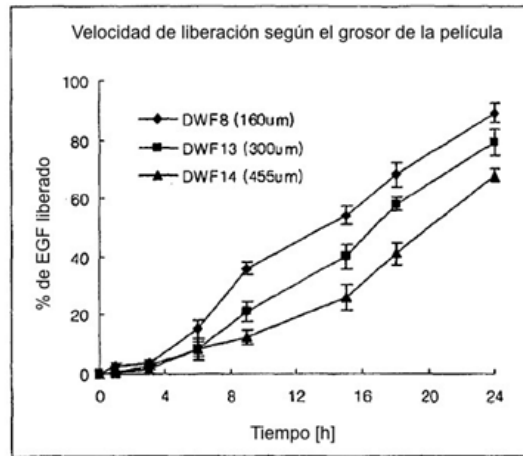


Fig. 4

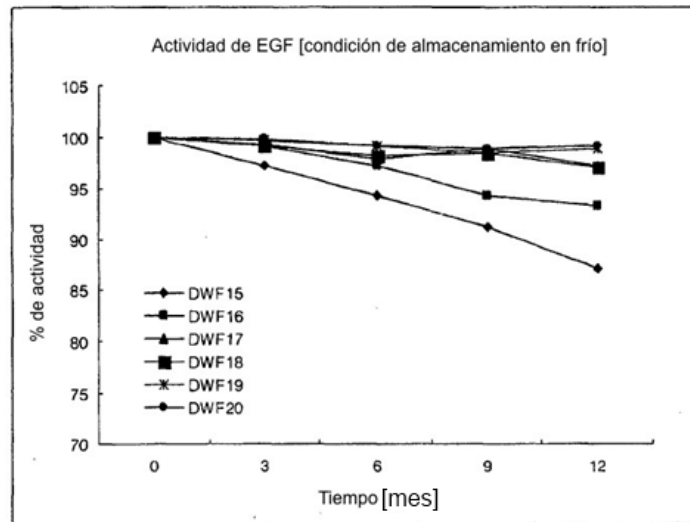


Fig. 5



Fig. 6

