(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 527 747**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2006** **E 06828470 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 1970071**

(54) Título: **Uso tópico de una composición que contiene el factor de crecimiento epidérmico para prevenir la amputación del pie diabético**

(30) Prioridad:

29.12.2005 CU 28205

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2015

(73) Titular/es:

CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA (100.0%)
AVENIDA 31 ENTRE 158 Y 190 CUBANACAN, PLAYA
CIUDAD DE LA HABANA 10600, CU

(72) Inventor/es:

BETANCOURT RODRIGUEZ, BLAS, YAMIR;
PUPO ESCALONA, ELDER;
PÁEZ MEIRELES, ROLANDO y
BERLANGA ACOSTA, JORGE, AMADOR

(74) Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 527 747 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

Uso tópico de una composición que contiene el factor de crecimiento epidérmico para prevenir la amputación del pie diabético

Campo de la técnica

La presente invención se relaciona con formulaciones tópicas que contienen Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE) encapsulado en o asociado a liposomas deformables o convencionales para ser aplicadas en la superficie de y alrededor de lesiones cutáneas isquémicas crónicas, para prevenir la amputación del pie diabético.

Antecedentes de la invención

La Diabetes Mellitus y sus complicaciones son la principal causa no traumática de las amputaciones de los miembros inferiores. Este es un problema médico de importancia cada vez mayor, ya que la incidencia y la prevalencia de la diabetes deben crecer a la luz del envejecimiento de las poblaciones y el estilo de vida cada vez más sedentario. En el transcurso de sus vidas al menos el 15% de los diabéticos desarrolla úlceras crónicas en los pies, y de éstos se estima que el 20% requiere la amputación del miembro inferior (Reiber G. E., Boyko E. J., Smith D. G. (1995) Lower extremity foot ulcers and amputations in diabetes. En: Harris M. I., Cowie CC, Reiber G., Boyko E., Stern M., Bennett P., editores. Diabetis in America, Washington, DC: US Government Prínting Office, 409-28; Moss S.E., Klein R, Klein B.E. (1992) The prevalence and incidence of lower extremity amputation in a diabetic population. Arch Int Med. 152:610-6).

Se han utilizado diversos métodos para el tratamiento de pacientes con pie diabético que incluyen el control metabólico estricto, profilaxis de los factores de riesgo modificables, desbridamiento, empleo de apósitos, tratamiento antimicrobiano de las infecciones, eliminación de la presión existente en el área lesionada, uso de injertos de piel, factores de crecimiento y el empleo de métodos de revascularización en caso de existir indicación.

Luego del control metabólico estricto, el desbridamiento es el paso más importante para la curación de las úlceras del diabético y es necesario realizarlo antes de cualquier otra modalidad de tratamiento local. Este consiste en la remoción de todo el tejido muertooinfectado (incluyendo huesos) que puede existir dentro de la región lesionada, y el tejido calloso circundante.

El empleo de apósitos en las úlceras del pie diabético está bien establecido y aunque se han estudiado diversos tipos de apósitos, se desconocen las ventajas de uno sobre otro. Además, ya que los estudios sobre el uso de apósitos han sido pocos y más bien se han dirigido a úlceras de bajo grado se requieren más evidencias a partir de ensayos clínicos para demostrar su eficacia. Entre los nuevos tipos de apósitos estudiados en ensayos clínicos se encuentran los apósitos que se basan en una membrana polimérica semipermeable, promogran (una matriz de colágeno), alginato, carboximetilcelulosa, hialuronano y los que usan presión subatmosférica (Eldor R., y col. (2004) New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies. Diabet Med. 21(11):1161-73).

Se han empleado también tratamientos conadyuvantes, tales como la terapia hemorreológica y la terapia vasoactiva, que han brindado algún efecto favorable tanto en la fase de cronicidad de la úlcera como también en susreagudizaciones, pero que no se han generalizado para el tratamiento del pie diabético. La terapia hemorreológica tiene su fundamento en la prevalencia demostrada en el paciente diabético de las alteraciones hemorreológicas y su papel potenciador en las infecciones. Por otro lado, la terapia vasoactiva se ha utilizado en las alteraciones locales de perfusión, debidas tanto a la macro- como a la micro-angiopatía, en las que actúan ciertos prostanoides a nivel tisular.

Para ciertas afecciones se han empleado los antiagregantes plaquetarios, y los agentes trombolíticos. Por otra parte, la técnica de revascularización en el paciente isquémico (diabético o no diabético) es riesgosa, costosa y no aplicable a todos los pacientes. Su indicación es muy limitada, al igual que la cirugía endovascular, la cual ha mostrado limitaciones de viabilidad, tanto en los sectores arteriales Aorto-Ilíaco como Femoral-Poplítea, atribuibles a calcificación y mayor sectorialidad de la lesión.

Otro invento para el tratamiento de lesiones cutáneas agudas extensas, tales como las úlceras venosas, ha sido la creación de sustitutos de piel bioartificial humana. Sin embargo, es limitada la información de su aplicación en úlceras isquémicas del pie diabético, y es poco concebible que estos productos puedan controlar el proceso isquémico que subyace como causa del fracaso de la cicatrización (New Skin for Old. Developments in Biological Skin Substitutes. Arch Dermatol. 1998 134:344-348).

Otra alternativa ha sido la aplicación de factores de crecimiento. Recientemente la Administración Federal de Drogas y Alimentos (FDA) de EEUU, aprobó el uso del factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) recombinante humano, para estimular la cicatrización de úlceras neuropáticas del pie diabético. Sin embargo, los resultados del más reciente ensayo clínico a doble ciegas, multicéntrico y aleatorizado, en el que el FCDP, en forma de gel, se aplicó en la superficie de las lesiones, demuestra una eficacia de sólo un 50% (Wieman T.J., Smiell J. M., Su Y. (1998) Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A phase III randomized placebo-controlled double-blind study. Diabetes Care. 21(5):822-7).. Adicionalmente, las lesiones tratadas en el ensayo clínico fueron de sólo hasta grado III y IV y con un normal suministro de sangre arterial. Además, un aspecto crítico fueel elevado índice de recurrencia (un 30% en tres meses) reportado en este ensayo.

Los resultados más satisfactorios en el tratamiento de las úlceras neuropáticas del pie diabético han sido descritos por Berlanga, J. y col. (WO 03/053458 A1). WO-A-03075949 describe un método para tratar las úlceras diabéticas grado 1-2 con FCE, en donde FCE puede combinarse con liposomas. Dicha invención demuestra una alta efectividad (mayor que el 50%) en el tratamiento de lesiones de mayor grado (IV y V) y con un severo componente isquémico, previniendo así la amputación del pie diabético. En el ensayo clínico el FCE se infiltró usando agujas hipodérmicas dentro y alrededor de lesiones. El método de infiltración es muy efectivo en la administración del FCE ya que puede liberar una gran cantidad del FCE directamente en el tejido viable. Sin embargo, este método tiene como desventaja el dolor causado por el pinchazo, que conduce a que algunos pacientes abandonen el tratamiento, y el riesgo de producir sepsis.

Los liposomas han sido propuestos para su uso en una gran variedad de aplicaciones tópicas ya que éstos facilitan la absorción de las drogas a través de la piel, reducen los efectos tóxicos asociados a las drogas y proporcionan una liberación sostenida y más prolongada de éstas. Las propiedades coloidales de los liposomas, que determinan la eficiencia del transporte de las drogas por vía tópica, dependen en gran medida, entre otros factores, de su composición lipídica. Generalmente, se ha encontrado que los liposomas convencionales que están compuestos por fosfolípidos y esteroles pueden modular la penetración de las drogas a través de la piel ya que éstas vesículas, aunque generalmente no penetran en la piel viable, pueden acumularse en el estrato córneo y otras capas cercanas a la superficie de la piel (Barry B.W. (2001) Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. Eur J Pharm Sci. 14(2):101-14; van den Bergh, B.A.I., de Vries, I.S., Bouwstra, JA, (1998) Interactions between liposomes and human stratum corneum studied by freeze-substitution electron microscopy. Int. J. Pharm. 167, 57-67). Cuando se incluyen agentes tensoactivos, tales como los detergentes en liposomas, las vesículas demuestran una mayor deformabilidad (liposomas deformables) y éstos pueden penetrar, de forma intacta y más eficiente a través de los poros del estrato córneo hasta capas profundas y viables de la piel (Cevc G., Schatzlein A., Richards en H. (2002) Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. Biochim. Biophys. Acta 1564(1):21 -30; Cevc G. (2004) Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. Adv Drug Deliv Rev. 56(5):675-711). Sin embargo, la utilidad de los liposomas convencionales, compuestos por fosfolípidos y esteroles, para la administración por vía tópica de FCE ha sido demostrada en aplicaciones que difieren notablemente por su naturaleza de las descritas en esta invención. En particular, se ha descrito anteriormente por Uster, P. S. y col. (US 4944948) en estudios en conejos que la asociación de FCE a una dispersión de liposomas de gran viscosidad puede prolongar la concentración local de FCE en el sitio de aplicación. Se ha demostrado además que la formulación del FCE con Su Yu Ping, en el cual el liposoma es el principal componente, acelera, con respecto al tratamiento con FCE solo, la curación de pacientes con quemaduras de grado II cuando el medicamento es aplicado por vía tópica (Liao Y., Guo L., Ding E.Y. (2003) A comparative study on burn wound healing treated by different methods of recombinant human epidermal growth factor. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 17(4):301-2).

Por otro lado, no se ha descrito o propuesto el uso de los liposomas deformables para la aplicación tópica de FCE en lesiones cutáneas isquémicas crónicas de alto riesgo de amputación en pacientes de pie diabético. A pesar que se ha demostrado que estos liposomas cargados con otros fármacos diferentes al FCE pueden penetrar con mayor eficiencia en la piel normal, no puede deducirse de estas experiencias que éstas vesículas puedan transportar con suficiente eficacia el FCE hasta regiones profundas debajo de las lesiones cutáneas crónicas de grados IV y V neuropáticas o isquémicas de forma que permita su curación y la prevención de la amputación del pie diabético. La estructura de la piel en estas lesiones es muy diferente a la piel normal lo que puede modificar de forma adversa la penetrabilidad e integridad de los liposomas en dichas lesiones. Además, las composiciones farmacéuticas activas pueden ser degradadas enzimáticamente en mucha mayor medida, ya que el tejido de estas lesiones del pie diabético contienen un nivel de enzimas proteolíticas mucho mayor que el tejido de la piel normal (Yager D. R., Chen S. M., Ward S.I., y col. (1997) Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of enastase activity and disminished levels of proteinase inhibitors. Wound Rep. Reg. 5:23-32).

No se ha demostrado, por lo tanto, una formulación efectiva que contenga FCE, para el tratamiento de las úlceras isquémicas crónicas del pie diabético que logre una alta biodisponibilidad del FCE en el tejido profundo debajo de la lesión, similar a la obtenida mediante la infiltración del FCE con agujas hipodérmicas, que evite la amputación de la extremidad, y al mismo tiempo el dolor y el riesgo de infección asociado al pinchazo.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención resuelve el problema antes mencionado, a través del uso de formulaciones tópicas que contienen Factor de Crecimiento Epidérmico encapsulado o asociado a liposomas deformables o convencionales, las cuales permiten una alta biodisponibilidad del FCE en el tejido profundo debajo de lesiones cutáneas, similar a la obtenida mediante la infiltración del FCE con agujas hipodérmicas. La aplicación de estas formulaciones tópicas se realiza en la superficie y alrededor de lesiones cutáneas isquémicas crónicas y tiene la ventaja de que evita el dolor del pinchazo y el riesgo asociado con la infección de la lesión.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la formulación farmacéutica tópica, la cual contiene una cantidad efectiva de Factor de Crecimiento Epidérmico encapsulado o asociado a liposomas deformables o convencionales, en la que el liposoma está compuesto por uno o más lípidos farmacéuticamente aceptables. El FCE aplicado a través de las formulaciones de esta invención es transportado eficientemente hacia el tejido viable profundo debajo de las lesiones y es protegido eficazmente contra la degradación mediada por proteasas, lo cual es importante ya que estas enzimas están presentes en altos niveles en estas lesiones del pie diabético.

En una modalidad preferida, la cantidad efectiva de FCE está entre 0.025 y 0.075 mg/gramo de sustancia. Las formulaciones permiten de forma irreversible la cicatrización de lesiones cutáneas crónicas, previniendo así la práctica de amputaciones cuando no existe otra alternativa para la extremidad isquémica.

En otra modalidad preferida, el liposoma de la formulación farmacéutica tópica está compuesto por uno o más lípidos farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste de un lípido neutro, un lípido de carga negativa, un lípido de carga positiva, un lípido conjugado a polietilenglicol o un lípido conjugado a un carbohidrato. Los liposomas también pueden estar compuestos por uno o más lípidos farmacéuticamente aceptables y uno o más agentes surfactantes no iónicos, zwitteriónicos, aniónicos o catiónicos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Localización de las ulceras inducidas en el modelo animal.

Exposición detallada de las modalidades / Ejemplos

Ejemplo 1. Obtención de liposomas convencionales cargados con FCE.

Fosfatidilcolina, a una concentración de 10 mg/mL, se disolvió en etanol absoluto en un matraz balón de 50 mL. El lípido se eliminó mediante roto-evaporación hasta que se formó una capa seca de lípido en las paredes del matraz. Para encapsular el FCE en liposomas, la capa seca de lípido se hidrató con una solución tamponada acuosa que contenía FCEy se homogenizó por agitación. Para disminuir el tamaño de los liposomas, la preparación de liposomas cargados con FCE se sometió a varios pases de extrusión a través de una membrana de policarbonato con poros de 100 nm de diámetro hasta que el tamaño promedio de los liposomas estuvo alrededor de 100 nm.

Para separar el FCE encapsulado del FCE no encapsulado, la suspensión de liposomas cargados con FCE se centrifugó a 100 000 x g durante 40 min a 4^0C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el precipitado se resuspendió con una solución salina tamponada con fosfato a pH 7.2. La centrifugación se repitió una vez más en las mismas condiciones y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y mezcló con el sobrenadante de la primera etapa de centrifugación. El precipitado (que contiene liposomas cargados con FCE) se resuspendió en una solución salina tamponada con fosfato a pH 7.2. Esta preparación final se almacenó a 4^0C hasta su uso.

Obtención de liposomas deformables cargados con FCE.

Un total de 85.8 mg de fosfatidilcolina y 11.7 mg de desoxicolato de sodio se disolvieron en 100 µL de etanol absoluto tibio, luego éstos se diluyeron en 900 µL de tampón fosfato, y se agitaron en forma de remolino hasta que se obtuvo una

suspensión homogénea de apariencia lechosa. Esta preparación de liposomas se sometió a varios pases de extrusión a través de una membrana de policarbonato con poros de 100 nm de diámetro hasta que el tamaño promedio de los liposomas fue aproximadamente de 100 nm. Para cargar FCE en los liposomas deformables se mezclaron 100 µL de la suspensión de liposomas con 25 µL de una solución que contiene varias cantidades (250, 500 o 1000 µg) de FCE y las mezclas se incubaron durante 24 h a 4^0C.

Ejemplo 2. Determinación de la eficiencia de encapsulación del FCE en los liposomas.

Para determinar la eficiencia de incorporación del FCE en los liposomas, las preparaciones se centrifugaron a alta velocidad y se determinó el contenido de proteína en el precipitado (liposomas con FCE incorporado) y en el sobrenadante (FCE libre) obtenido. La suspensión de liposomas se centrifugó a 100 000 x g durante 40 min. a 4^0C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y el precipitado se resuspendió con una solución salina tamponada con fosfato a pH 7.2. La centrifugación se repitió una vez más en las mismas condiciones y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y mezcló con el sobrenadante de la primera centrifugación. El precipitado se resuspendió en 500 µL de una solución salina tamponada con fosfato a pH 7.2. A continuación se extrajo la proteína presente en el sobrenadante o el precipitado y separó de los lípidos añadiendo Tritón X-100 al 0.5% (v/v) a las muestras y se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC). Se cuantificó el contenido proteico por correlación con el área bajo la curva de la absorbancia a 226 nm obtenida RP-HPLC. La eficiencia de incorporación de FCE en los liposomas se calculó como el cociente del contenido de proteína en el precipitado (liposomas con FCE incorporado) entre el contenido total de proteína añadido al inicio del proceso de encapsulación x 100%.

Tabla 1. Eficiencia de incorporación del FCE en los liposomas.

Cantidad de FCE añadido (µg)	Eficiencia de incorporación (%) (Ave ± STDEV, *n*=3)	
	Liposomas convencionales	Liposomas deformables
250	7.6 ± 1.2	18.2 ± 1.5
500	10.4 ± 0.8	25.7 ± 3.3
1000	8.2 ± 1	23.4 ± 5.2

Ejemplo 3. Determinación del tamaño y la morfología de los liposomas.

Las muestras de liposomas se analizaron mediante microscopia electrónica de transmisión para determinar el tamaño de los liposomas y su morfología. Los liposomas se visualizaron a través de la tinción negativa con acetato de uranilo. Las muestras teñidas negativamente se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol-JEM 2000EX que operó a 80 KV. La micrografías de cada preparación de liposomas digitalizaron mediante un escáner de imágenes y se midió el diámetro de los liposomas utilizando el programa DIGIPAT versión 3.3 (EICISOFT, La Habana, Cuba). El tamaño de partícula promedió por el número total de liposomas presentes en cada micrografía y se representó como la media + la desviación estándar de tres determinaciones independientes.

Tanto los liposomas deformables como los convencionales cargados con FCE estuvieron constituidos por una población homogénea de vesículas de forma esférica o elipsoidal. El tamaño promedio de las vesículas fue de 130±7 nm y 123±4 nm, para los liposomas convencionales y los liposomas deformables, respectivamente.

Ejemplo 4. Preparación de una formulación de gel que contiene liposomas cargados con FCE.

Para preparar este gel, la suspensión de liposomas deformables o convencionales cargados con FCE se diluyó 1.5 veces en tampón fosfato pH 7.2 y se añadió Carbómero (Carbopol 940) tamponado a pH 7.2 a una concentración final de 1.25% (p/v). La formulación contenía además 0.02% (p/v) hidroxitolueno de butilo (BHT), 0.1 % (p/v) EDTA, 0.25% (p/v) parahidroxibenzoato de metilo, 0.525% (p/v) alcohol bencílico, 0.2% (p/v) hidróxido de sodio y 3% (p/v) glicerol.

Las formulaciones de gel tuvieron una viscosidad de aproximadamente 840 mPas y 730 mPas, para los liposomas convencionales y los liposomas deformables, respectivamente.

Ejemplo 5. Demostración del efecto protector de la encapsulación del FCE en liposomas contra la degradación enzimática del FCE *in vitro*.

Este experimento tuvo el objetivo de evaluar si la encapsulación del FCE en liposomas convencionales y deformables es ventajosa para conservar la integridad del FCE en el ambiente proteolítico del tejido del pie diabético.

Para esto se tomaron biopsias del tejido ulceroso de pie de pacientes diabéticos después de la anestesia local y se resuspendieron con una solución salina tamponada con fosfato pH 7.2. Un total de 25 µg de FCE libre en solución o encapsulado en liposomas se añadió a las muestras e incubó durante 20, 40, o 60 min a 37^{0}C. Después, para terminar la reacción se añadió 50% (v/v) ácido acético. Después de añadir Tritón X-100 al 5%(v/v), las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min y filtraron con filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 0.2-0.45 µm. El contenido de FCE en las muestras se cuantificó por correlación con el área bajo la curva de la absorbancia a 226 nm obtenida mediante RP-HPLC. El por ciento de FCE remanente después de la incubación se calculó como el cociente entre el contenido de FCE remanente en las muestras entre el contenido de FCE añadido inicialmente x 100%. Los resultados mostrados en la Tabla 2 evidencian que después de exponer las biopsias del pie diabético, las muestras que contienen el FCE encapsulado tanto en liposomas convencionales como en liposomas deformables preservan una mayor cantidad de FCE intacto que las muestras que contienen FCE no encapsulado.

Tabla 2. FCE remanente después de su incubación con biopsias de tejidos ulcerosos de pie de pacientes diabéticos.

	FCE remanente (%)		
	20 min	**40 min**	**60 min**
FCE encapsulado en liposomas convencionales	95.1 ± 1.1	83.4 ± 4.7	58.6 ± 3.4
FCE encapsulado en liposomas deformables	93.4 ± 2.1	80.6 ± 3.8	55.9 ± 2.5
FCE libre	82.5 ± 2.5	66.9 ± 3.6	37.8 ± 1.3

Ejemplo 6. Demostración de la eficacia de las formulaciones que contienen FCE en modelos animales experimentales de lesiones agudas y tórpidas controladas.

Modelo animal de lesiones experimentales agudas controladas.

El experimento que a continuación se describe se realizó con el objetivo de evaluar el efecto cicatrizante de la nueva formulación farmacéutica de uso tópico basada en liposomas deformables o convencionales que contienen FCE en lesiones agudas de pronóstico satisfactorio.

Biomodelo experimental: Ratas Wistar machos de peso corporal entre 225-250 gramos. Los animales se mantuvieron en áreas controladas del Bioterio del CIGB y bajo régimen estable de iluminación de 12 x 12 horas, ciclos de cambios de aire, así como libre acceso a la dieta. Las ratas se alojaron individualmente en cajas T3 con reemplazo del encamado cada 48 horas previa esterilización.

Inducción de las ulceras: los animales se anestesiaron con la combinación de ketamina/xilazina por via intraperitoneal. Se realizó la depilación mecánica y química de la zona de la espalda desde el espacio retro-escapular hasta la altura del sacro. La región se aseptizó con una solución de yodo-povidona y alcohol isopropílico. El área de la piel seleccionada para inducir las ulceras se delimitó con tinta china, para poder inducir lesiones de grosor total, circulares con biótomos desechables de 9 mm de diámetro (AcuDrem, Fl, USA).

Como se indica en la Figura 1, se crearon 6 lesiones simétricas y equidistantes en cada animal. Luego de creadas, se lavaron con solución salina estéril y su borde interno se delineó con tinta permanente para el cálculo posterior del área de la herida en tiempo cero. Las lesiones de todos los animales de cada grupo se higienizaron diariamente con etanol al 70% y salina estéril antes de aplicar el tratamiento en caso que correspondiese.

Grupos experimentales:

Luego de creadas las ulceras en los animales se asignaron aleatoriamente a los siguientes grupos experimentales mediante una tabla de entrada cruzada orden /grupo:

Grupo I- no tratados.

Grupo II- placebo (formulación de liposomas deformables vacíos que no contienen FCE) aplicado tópicamente.

Grupo III- tratamiento mediante infiltración de una solución de FCE conteniendo 75 microgramos por microlitro usando agujas hipodérmicas. Las infiltraciones se realizaron sobre el borde y fondo de la herida.

Grupo IV- tratamiento con la formulación de liposomas convencionales que contienen 25 microgramos de FCE por gramo de sustancia aplicada tópicamente.

Grupo V- tratamiento con la formulación de liposomas convencionales que contienen 75 microgramos de FCE por gramo de sustancia aplicada tópicamente.

Grupo VI- tratamiento con la formulación de liposomas deformables que contienen25 microgramos de FCE por gramo de sustancia aplicada tópicamente.

Grupo VII- tratamiento con la formulación de liposomas deformables que contienen75 microgramos de FCE por gramo de sustancia aplicada tópicamente.

Se incluyeron 10 ratas para cada uno de los grupos, de modo tal que se estudiaron60 heridas por grupo. Los tratamientos se realizaron diariamente, previa sedación de los animales con diazepam administrado por vía intraperitoneal.

Determinación del nivel de cierre de las heridas. Procesamiento histológico:

Las lesiones se calcaron en láminas transparentes de acetato para el cálculo cinético de la contracción en los siguientes tiempos: Tiempo 0- representa el 100% del área de lesión abierta y el 0% de contracción de la herida, Tiempo 1- a las 72 horas de inducidas las lesiones, Tiempo 2- al 5to día de inducidas las lesiones, Tiempo 3- al 7mo día de inducidas las lesiones, Tiempo 4- al 9no día de inducidas las lesiones. Se toma el día nueve como final del estudio y en el cual se sacrificaron los animales de acuerdo a las experiencias previas de la cinética de cicatrización espontánea de estas lesiones. Las imágenes de los bordes de las lesiones calcados se digitalizaron. El área de las lesiones y el porciento de contracción se calcularon mediante el programa de análisis de imágenes DIGIPAT. Los cálculos estadísticos de cada parámetro se realizaron mediante el paquete SPSS empleando la prueba no paramétrica de Mann Whitney U, estableciendo un nivel de significación de $p<0.05$.

Los animales se sacrificaron mediante una sobre-dosis de pentobarbital sódico (250 mg/kg) vía intraperitoneal. Las lesiones se resecaron desde el panículo carnoso y fijaron en formalina neutra al 10% para su posterior inclusión en parafina.

Se utilizaron las coloraciones de hematoxilina/eosina, van Giesson y tricrómica deMasson. Se determinó el número de animales en cada grupo con un 100% de epitelización de la lesión, epidermis estratificada y diferenciada.

Los resultados de la cinética de contracción de las heridas se muestran en la Tabla 3 (los valores de contracción en mm se expresan en porciento del cambio de tamaño de la herida con respecto al tamaño de la herida en el Tiempo 0).

Tabla 3. Valores cinéticos de la contracción de las úlceras controladas agudas.

	Valores cinéticos de contracción de ulceras controladas agudas (%)				
Grupos	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4
Grupo I	0	5.3 ± 1.8	9.6 ± 1.1	31.5 ± 2	59.8 ± 2.1
Grupo II	0	6.1 ± 1.2	9.3 ± 0.7	30.2 ± 1.6	61.2 ± 3
Grupo III	0	12.3 ± 2.1*[a]	23 ± 2.7*[a]	67.5 ± 3.1*[a]	76.5 ± 2.2*[a]
Grupo IV	0	14.6 ± 1.8*[b]	31.6 ± 1.2**	74.5 ± 2.4**	86.2 ± 1.7**
Grupo V	0	15.9 ± 1.5*[b]	33.2 ± 1.9**	78.2 ± 4.1**	88.6 ± 2.2**
Grupo VI	0	16.1 ± 1.7*[b]	35.4 ± 2.5**	81.7 ± 3.6**	90.5 ± 1.3**
Grupo VII	0	16.5 ± 1.6*[b]	36.7 ± 1.9**	85.2 ± 4.1**	94.3 ± 1.8**

(*[a]) Significa diferencia estadística de p<0.05 con los grupos I y II. (*[b]) Significa diferencia estadística de p<0.05 con los grupos I, II y III. (**) Significa diferencia estadística de p<0.01 con los grupos I, II y III. Prueba de Mann-Whitney U.

Como puede observarse en la Tabla 3, las formulaciones basadas en liposomas ejercen el más potente efecto de contracción en los bordes de las heridas lo que en otras palabras significa que las formulaciones liposomales ejercen el más favorable efecto en la aceleración de la cicatrización total, ya que la contracción representa la convergencia de varios eventos consolidados que aproximan la herida a la fase de remodelación.

En la Tabla 4, puede observarse el porciento de área cubierta por el tejido de granulación maduro y organizado de las ulceras en cada grupo experimental. El cálculo de este parámetro se llevó a cabo usando las muestras colectadas en Tiempo 6 cuantificando el número de campos microscópicos positivos coincidentemente a las reacciones de tinción de van Giesson y Tricrómica de Masson en cada muestra. Las valoraciones se realizaron por dos patólogos de forma independiente y a ciegas.

Tabla 4. Porciento de área granulada en tiempo 6 en cada grupo experimental.

	(% de área cubierta con tejido de granulación maduro)
Grupo I	53.2±3.15
Grupo II	51.8±2.6
Grupo III	66.7±3.22
Grupo IV	89.8±3.14
Grupo V	91.2±1.63
Grupo VI	94.8±2.08
Grupo VII	96.1±1.75
Estudio de 60 heridas por grupo usando reacciones positivas a fibras de colágeno	

Como puede observarse en la Tabla 4, el tratamiento con las formulaciones basadas en liposomas ejerce el más potente efecto sobre el proceso de establecimiento y maduración del tejido de granulación, lo que viene a corresponderse con lo ya descrito para el proceso de contracción de las heridas.

El efecto de los tratamientos se estudió también en el proceso de epitelización de las lesiones. Se valoró el aspecto del epitelio estratificado considerando la re-epitelización total de la úlcera, la presencia de un epitelio estratificado, y la existencia de un estrato de queratina. Para el estudio microscópico las lesiones se sometieron a una hemisección longitudinal central e incluyeron en el mismo bloque de parafina. Se estudiaron un total de 120 cortes histológicos por grupo, que en esencia representan 60 lesiones. Los resultados del estudio se expresan en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de los tratamientos sobre el proceso de epitelización de las heridas.

	No. de heridas con un 100% de epitelización	No. de heridas con epitelio maduro
Grupo I	27	22
Grupo II	29	26
Grupo III	37	25
Grupo IV	53	45
Grupo V	55	47
Grupo VI	55	48
Grupo VII	57	50

Como es apreciable los grupos IV, V, VI y VII con las formulaciones de los liposomas muestran los mejores indicadores de respuesta epitelial, dados por la re-epitelización total y por la madurez del epitelio.

Podemos concluir que el tratamiento con los liposomas favorece (*i*) el proceso de contracción de heridas agudas, controladas; (*ii*) el proceso de granulación y su maduración; (*iii*) el proceso de re-epitelización y de diferenciación de la epidermis y *iv*) los procesos no estuvieron asociados a la formación del tejido de granulación aberrante, de granulomas o cuerpos extraños.

Modelo experimental de úlceras cutáneas crónicas.

El experimento que a continuación se describe se realizó con el objetivo de evaluar el efecto cicatrizante de las nuevas formulaciones farmacéuticas de uso tópico basadas en liposomas deformables o convencionales que contienen FCE en lesiones crónicas de pronóstico pobre que simulan lesiones de los pacientes diabéticos.

Biomodelo experimental: ratas Wistar machos de peso corporal entre 225-250 gramos. Los animales se mantuvieron en áreas controladas del Bioterio del CIGB y bajo régimen estable de iluminación de 12 x 12 horas, ciclos de cambios de aire, así como libre acceso a la dieta. Las ratas se alojaron individualmente en cajas T3 con reemplazo del encamado cada 48 horas previa esterilización. Los animales se trataron previamente durante dos meses con una solución de metilglioxal al 0.01 % para crear un ambiente de glicosilación comparable con el que ocurre en un paciente diabético de larga evolución. Entre otros daños orgánicos se describe el enlentecimiento del proceso de granulación y remodelación de las heridas (Berlanga J., Cibrian D., y col.(2005) Methylglyoxal administration induces diabetes-like microvascular changes and perturbs the healing process of cutaneous wounds. Clin Sci (Lond). 109(1):83-95).

Inducción de las úlceras: Los animales se anestesiaron con la combinación de ketamina/xilazina por via intraperitoneal. Se realizó la depilación mecánica y química de la zona de la espalda de las ratas desde el espacio retro-escapular hasta la altura del sacro. La región se aseptizó con una solución de yodo-povidona y alcohol isopropílico. El área de la piel seleccionada para inducir las úlceras se delimitó con tinta china, para poder inducir lesiones de grosor total, circulares con biótomos desechables de 9 mm de diámetro (AcuDrem, Fl, USA). Como se indica en la Figura 1, se crearon 6 lesiones simétricas y equidistantes en cada animal. Luego de creadas, las lesiones se lavaron con solución salina estéril y su borde interno se delineó con tinta permanente para el cálculo del área de la herida en tiempo cero. Las lesiones de todos los

animales de cada grupo se higienizaron diariamente con etanol al 70% y salina estéril antes de aplicar el tratamiento en caso que correspondiese.

Grupos experimentales:

Luego de creadas las ulceras en los animales se asignaron aleatoriamente mediante una tabla de entrada cruzada orden /grupo a los siguientes grupos experimentales:

Grupo I- no tratado.

Grupo II- placebo (formulación de liposomas deformables vacíos que no contienen FCE) aplicado tópicamente.

Grupo III- tratamiento mediante infiltración de una solución de FCE conteniendo 75 microgramos por mililitros usando agujas hipodérmicas. Las infiltraciones se realizaron sobre el borde y fondo de la herida.

Grupo IV- tratamiento con la formulación de liposomas tradicionales que contienen 25 microgramos de FCE por gramo de sustancia aplicado tópicamente.

Grupo V- tratamiento con la formulación de liposomas tradicionales que contienen 75 microgramos de FCE por gramo de sustancia aplicado tópicamente.

Grupo VI- tratamiento con la formulación de liposomas deformables que contienen 25 microgramos de FCE por gramo de sustancia aplicado tópicamente.

Grupo VII- tratamiento con la formulación de liposomas deformables que contienen 75 microgramos de FCE por gramo de sustancia aplicado tópicamente.

Se incluyeron 10 ratas para cada uno de los grupos, de modo tal que se estudiaron 60 heridas por grupo. Los tratamientos se realizaron diariamente, previa sedación de los animales con diazepam por vía intraperitoneal.

Determinación del nivel de cierre de las heridas. Procesamiento histológico:

Las lesiones se calcaron en láminas transparentes de acetato para el cálculo cinético de la contracción en los siguientes tiempos: Tiempo 0- representa el 100% del área de lesión abierta y el 0% de contracción, Tiempo 1- a las 72 horas de inducidas las lesiones, Tiempo 2- al 5^{t0} día de inducidas las lesiones, Tiempo 3- al 7mo día de inducidas las lesiones, Tiempo 4- al 9no día de inducidas las lesiones. Se toma el día 9 como final del estudio y en el cual se sacrificaron los animales de acuerdo a las experiencias previa de la cinética de cicatrización espontánea de estas lesiones. Las imágenes de los bordes de las lesiones se digitalizaron. El área de las lesiones y el porciento de contracción se calcularon mediante el programa de análisis de imágenes DIGIPAT. Los cálculos estadísticos de cada parámetro se realizaron mediante el paquete SPSS empleando la prueba no paramétrica de Mann Whitney U, estableciendo un nivel de significación de $p<0.05$. Los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (250 mg/kg) vía intraperitoneal. Las lesiones se resecaron desde el panículo carnoso y fijaron en formalina neutra al 10% para su posterior inclusión en parafina. Se utilizaron las coloraciones de hematoxilina/eosina, van Giesson y tricrómica de Masson. El número de animales de cada grupo con un 100% de epitelización de la lesión, con epidermis estratificada y diferenciada se determinó. Los resultados de la cinética de contracción de las heridas se muestran en la Tabla 6 (los valores de contracción en mm se expresan en porciento de cambio del tamaño de la herida con respecto al tamaño de la herida en el Tiempo 0).

Tabla 6. Valores cinéticos de la contracción de las úlceras crónicas.

	Valores cinéticos de contracción de ulceras crónicas (%)				
Grupos	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 4	Tiempo 6
Grupo I	3.1 ± 1.1	4.1 ± 1.15	5.23 ± 1.3	11.5 ± 2.6	16.8 ± 2.4
Grupo II	4.1 ± 2.2	3.77 ± 1.6	6.3 ± 1.13	12.2 ± 1.04	18.6 ± 1.6
Grupo III	6.55 ± 1.14	10.25 ± 3.1*	25 ± 2.7*	53.5 ± 3.5*	61.7 ± 2.14*
Grupo IV	13.7 ± 0.9**	24.2 ± 0.78**	30.3 ± 2.4**	68.6 ± 1.08**	80.3 ± 1.87**
Grupo V	14.6 ± 1.6**	25.8 ± 0.81**	31.4 ± 3.2**	69.5 ± 3.4**	83.2 ± 2.12**
Grupo VI	15.3 ± 2.3**	27.3 ± 1.1**	33 ± 2.5**	70.52 ± 2.2**	83 ± 3.14**
Grupo VII	16.7 ± 1.8**	28.6 ± 0.95**	35 ± 3.8**	73.7 ± 2.15**	86 ± 4.1**

(*) Significa diferencia estadística de $p<0.05$ con los grupos I y II. (**) Significa diferencia estadística de $p<0.01$ con los grupos I, II y III. Prueba de Mann-Whitney U.

Como puede observarse en la Tabla 6, las formulaciones basadas en liposomas ejercen el más potente efecto de contracción de los bordes de las heridas lo que en otras palabras significa que las formulaciones liposomales ejercen el más favorable efecto en la aceleración de la cicatrización total ya que la contracción representa la convergencia de varios eventos consolidados que aproximan la herida a la fase de remodelación. Nótese que estas heridas experimentales simulan el micro-ambiente bioquímico de las heridas diabéticas en el que el mecanismo de contracción se encuentra de forma patológica parcial o totalmente abolido.

Determinación de la concentración de FCE en el tejido viable profundo debajo de las lesiones cutáneas

Para determinar la concentración de FCE se realizaron cortes histológicos del tejido profundo (1 cm) debajo de las lesiones a un tiempo de 20 min, 1 h, 4 h, 8 h, 16 h y 24 h después de inducidas las lesiones. El tejido se homogenizó en una solución salina tamponada con fosfato. La concentración de FCE se determinó mediante un ensayo inmuno-enzimático (ELISA). Como se muestra en la Tabla 6a, las formulaciones de FCE en liposomas permitieron el transporte de altas concentraciones de FCE (grupos experimentales IV, V, VI y VII) a regiones profundas del tejido debajo de las lesiones, comparables a las obtenidas mediante el método de infiltración de FCE usando agujas hipodérmicas (grupo experimental III).

Tabla 6a. Concentración de FCE en el tejido viable profundo debajo de las lesiones cutáneas.

	Concentración de FCE (μg/ml)					
Grupos	**20 min**	**1 h**	**4 h**	**8 h**	**16 h**	**24 h**
Grupo I	0.01 ± 0.003	0.012 ± 0.005	0.008 ± 0.002	0.009 ± 0.003	0.007 ± 0.002	0.008 ± 0.003
Grupo II	0.013 ± 0.002	0.01 ± 0.001	0.012 ± 0.005	0.009 ± 0.002	0.01 ± 0.003	0.008 ± 0.001
Grupo III	27.55 ± 0.14*	5.47 ± 0.1*	1.55 ± 0.1*	0.26 ± 0.04*	0.07 ± 0.01*	0.02 ± 0.005*
Grupo IV	1.1 ± 0.4*	2.8 ± 0.2*	3.9 ± 0.2**	9.1± 0.3**	2.9 ± 0.1**	0.08 ± 0.01**
Grupo V	5.6 ± 0.7*	8.2 ± 0.3*	11.3 ± 0.5**	20.1 ± 1.6**	9.6 ± 1.7**	0.23 ± 0.05**
Grupo VI	1.5 ± 0.3*	4.3 ± 0.7*	7.7 ± 0.2**	11.1 ± 0.8**	4.6 ± 0.2**	0.1 ± 0.03**
Grupo VII	8.8 ± 0.4*	12.7 ± 1.1*	19.5 ± 2.9**	28.6 ± 1.6**	13.2 ± 2.1**	0.42 ± 0.06**

(*) Significa diferencia estadística de p<0.05 con los grupos I y II. (**) Significa diferencia estadística de p<0.01 con los grupos I, II y III. Prueba de Mann-Whitney

En la Tabla 7, puede observarse el porciento de área cubierta por tejido de granulación maduro y organizado de las ulceras crónicas en cada grupo experimental. Los cálculos del parámetro se realizaron usando las muestras colectadas en Tiempo 4cuantificando el número de campos microscópicos positivos coincidentemente a las reacciones de tinción de van Giesson y Tricrómica de Masson en cada muestra. Las valoraciones se realizaron por dos patólogos de forma independiente y a ciegas.

Como puede observarse en la Tabla 7, el tratamiento con las formulaciones basadas en liposomas ejerce el más potente efecto sobre el proceso de establecimiento y maduración del tejido de granulación, lo que viene a corresponderse con lo ya descrito para el proceso de contracción de las heridas.

Tabla 7. Porciento de área granulada en tiempo 4 en cada grupo experimental.

	(% de área cubierta con tejido de granulación maduro)
Grupo I	33.1±4
Grupo II	28.6±1.16
Grupo III	41.7±2.25
Grupo IV	63.8±2.3
Grupo V	65.1±1.8
Grupo VI	68.7±2.2
Grupo VII	69.6±1.15
Estudio de 60 heridas por grupo usando reacciones positivas a fibras de colágeno	

El efecto de los tratamientos se estudio también en el proceso de epitelización de las lesiones. Se valoró el aspecto microscópico del epitelio estratificado considerando la re-epitelización de la úlcera, la presencia de un epitelio estratificado, y la existencia de un estrato de queratina. Para el estudio microscópico las lesiones se sometieron a una hemisección longitudinal central e incluyeron en el mismo bloque de parafina. Se estudiaron un total de 120 cortes histológicos por grupo, que en esencia representan 60 lesiones. No hubo necesidad de eliminar ninguna de las lesiones por contaminación bacteriana. Los resultados se expresan en la Tabla 8.

Tabla 8. Efecto de los tratamientos sobre el proceso de epitelización de las heridas.

	No. de heridas con un 100% de epitelización	No. de heridas con epitelio maduro
Grupo I	0	0
Grupo II	0	0
Grupo III	16	11
Grupo IV	29	24
Grupo V	31	27
Grupo VI	33	28
Grupo VII	35	30

Como es apreciable en la Tabla 8, los grupos IV, V, VI y VII tratados con las formulaciones de los liposomas muestran los mejores indicadores de respuesta epitelial, dados por la re-epitelización total y por la madurez del epitelio.

Se puede concluir que el tratamiento con formulaciones de liposomas favorece (*i*) el proceso de contracción de heridas crónicas que simulan fielmente el microambiente bioquímico de las úlceras del paciente diabético; (*ii*) el proceso de granulación y su maduración. Notoriamente el tratamiento permite el establecimiento de una red vascular neo-formada y (*iii*) estimula de forma moderada el proceso de re-epitelización y de diferenciación de la epidermis en lesiones que habitualmente son resistentes a la reepitelización.

Ejemplo 7. Demostración de eficacia de las formulaciones tópicas que contienen FCE en liposomas en pacientes con úlceras avanzadas del pie diabético.

La administración en base a la relevancia de las formulaciones de liposomas convencionales o deformables que contienen 25 o 75 microgramos de FCE por gramo de sustancia en pacientes con úlceras del pie diabético ha mostrado resultados similares a los obtenidos con la formulación inyectable con agujas hipodérmicas desechables pero con la ventaja de evitar el dolor asociado a la inyección y el riesgo de infección.

La nueva formulación de liposomas deformables que contiene 75 microgramos de FCE por gramo de sustancia se aplicó en un paciente con úlcera del pie diabético, evidencias de compromiso del flujo sanguíneo y riesgo de amputación mayor. El producto se administró tópicamente luego de realizar el desbridamiento completo de la úlcera. La lesión se cubrió durante el tiempo entre los dos tratamientos con un apósito y vendaje estéril. Se observó una evolución satisfactoria, siendo evidente desde la primera semana de tratamiento la aparición de un tejido de granulación y contracción de los bordes de la úlcera. El producto fue efectivo para lograr la epitelización completa de la lesión y prevenir la amputación del pié. No se identificaron reacciones adversas asociadas al tratamiento.

Otro paciente diabético con lesiones cutáneas isquémicas en los miembros inferiores que excedían los 20 cm^2 y con una profundidad que comprometía hasta el periostio se trató con la formulación de liposomas tradicionales que contiene 75 microgramos de FCE por gramo de sustancia. El producto se administró tópicamente, tres veces por semana, luego de realizar el desbridamiento completo de la úlcera. La lesión se cubrió durante el tiempo entre los tratamientos con un apósito y vendaje estéril. A partir de la cuarta administración del producto, se observó un cambio sustancial del aspecto de la lesión, en la cual comenzó a prevalecer un tejido de granulación productivo, que a los pocos días se cubrió por epitelio. Al final del tratamiento de la epidermización total el paciente se le dio de alta hospitalaria y evolucionó satisfactoriamente sin recaídas.

Por otra parte, otro paciente diabético con úlceras avanzadas que tuvo intolerancia a las inyecciones locales de FCE y abandonó el tratamiento de infiltración después de la tercera aplicación, se le comenzó a administrar la nueva formulación de 25 microgramos de FCE con liposomas deformables. El paciente pudo continuar el tratamiento con evolución satisfactoria hasta lograr el cierre completo de la lesión. Este paciente no reportó complicaciones de su enfermedad ni reacciones adversas asociadas al tratamiento.

Reivindicaciones

1. Uso de una cantidad efectiva de Factor de Crecimiento Epidérmico encapsulado en o asociado a liposomas deformables o convencionales para la obtención de una formulación farmacéutica tópica para el tratamiento de lesiones cutáneas isquémicas crónicas de grado IV y V en pacientes diabéticos.

2. El uso según la reivindicación 1, en donde se logra alta biodisponibilidad del Factor de Crecimiento Epidérmico en el tejido profundo debajo de las lesiones.

3. El uso según las reivindicaciones 1 y 2, para prevenir la amputación del pie diabético, en donde la formulación es aplicada en la superficie y alrededor de lesiones cutáneas isquémicas crónicas.

4. Una formulación farmacéutica tópica que contiene una cantidad efectiva de Factor de Crecimiento Epidérmico encapsulado en o asociado a liposomas deformables o convencionales, en donde el liposoma está compuesto por uno o más lípidos farmacéuticamente aceptables y logra alta biodisponibilidad del Factor en el tejido profundo debajo de lesiones cutáneas isquémicas crónicas y es útil en la prevención de la amputación del pie diabético.

5. Una formulación farmacéutica tópica según la reivindicación 4, en donde la cantidad efectiva de Factor de Crecimiento Epidérmico está en el intervalo de 0.025 a 0.075 mg/gramo de sustancia.

6. Una formulación farmacéutica tópica según la reivindicación 4, en donde la cantidad efectiva de Factor de Crecimiento Epidérmico es 0.075 mg/gramo de sustancia.

7. Una formulación farmacéutica tópica según la reivindicación 4, en donde el liposoma está compuesto por uno o más lípidos farmacéuticamente aceptables seleccionado del grupo que consiste de un lípido neutro, un lípido de carga negativa, un lípido de carga positiva, un lípido conjugado a polietilenglicol o un lípido conjugado a un carbohidrato.

8. Una formulación farmacéutica tópica según la reivindicación 4, en donde el liposoma está compuesto por uno o más lípidos farmacéuticamente aceptables y uno o más agentes surfactantes no iónicos, zwitteriónicos, aniónicos o catiónicos.
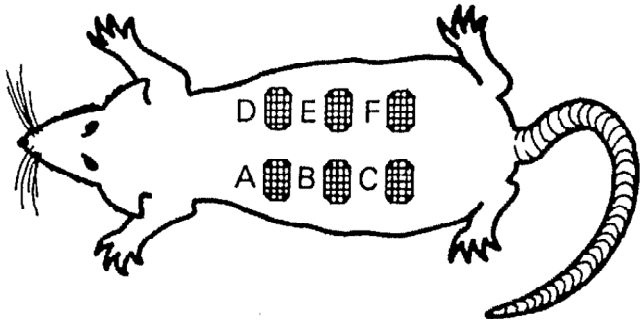
Figura 1.