

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 942**

51 Int. Cl.:

A61L 27/14 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2010** **E 10709265 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014** **EP 2405952**

54 Título: **Soportes**

30 Prioridad:

11.03.2009 GB 0904174

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2015

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF SHEFFIELD (100.0%)
Firth Court Western Bank
Sheffield S10 2TN, South Yorkshire, GB

72 Inventor/es:

MACNEIL, SHEILA y
RYAN, ANTHONY

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 527 942 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

Soportes

5 La presente invención se relaciona generalmente con apósitos para heridas que comprenden un soporte electrocentrifugado y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.

Antecedentes

10 La incidencia de heridas crónicas aumenta con el envejecimiento de la población en el mundo occidental. El número de pacientes con úlceras crónicas en las piernas, la mayoría de las cuales están asociadas con una enfermedad venosa, se estima que está entre 1 y 2 por cada 1000 habitantes (En cualquier momento el 20 % de las personas con una ulceración activa en las piernas tendrá una úlcera abierta). Además la incidencia de la diabetes está en aumento y tanto como el 10-20 % de estos pacientes desarrollarán úlceras del pie diabético no cicatrizantes. Además, hay pacientes con muy poca movilidad en hospitales con riesgo de desarrollar escaras. Para todos estos pacientes, nuevos enfoques para acelerar la curación y reducir el dolor son absolutamente necesarios.

15 El dolor es un problema importante para la mayoría de los pacientes con úlceras crónicas (las excepciones son los pacientes con diabetes y lesiones de la médula que no experimentan dolor asociado con la herida debido al daño de los nervios). La mayoría de las úlceras crónicas se manejan en la comunidad y desde el punto de vista del paciente los problemas del día a día son el dolor doble en los cambios de los apósitos y el fracaso de la curación de las úlceras. Los pacientes con heridas crónicas frecuentemente experimentan dolor con los cambios de los apósitos (Noonan y Burge, Plebology. 1998;3:14-9, Price y otros, Int Wound J. 2008 jun;5(2):159-71) y el retiro del apósito en sí mismo puede asociarse con una reacción inflamatoria. Las razones por las que las heridas crónicas no cicatrizan son varias y están interrelacionadas - frecuentemente las heridas están mal vascularizadas e hipóxicas, comúnmente están inflamadas, frecuentemente se infectan y, como consecuencia son agresivas y resistentes a la curación.

20 Un cierto nivel de inflamación puede acelerar la curación de heridas ya que la liberación de citocinas pro-inflamatorias atrae a células a la zona de la herida. Sin embargo, un nivel de inflamación demasiado alto puede retardar la curación de heridas particularmente en muchas heridas crónicas agresivas donde meses e incluso años de actividad de metaloproteasas de la matriz y de secreción de citocinas pro-inflamatorias crean ambientes del lecho de la herida en el que las células normales de la piel en el perímetro de la herida no logran sobrevivir (Werner y Grose, Physiol. Rev. 2003;83:835-870, Diegelmann y Evans, Frontiers in Bioscience. 2004;9:283-289). Por lo tanto, las células capaces de la curación de las heridas pueden fracasar en su movimiento a los lechos de heridas agresivas ya que la matriz extracelular presente está bajo una degradación constante debido a las metaloproteasas de matriz (Armstrong y Jude, Journal of the American Podiatric Medical Association 2002;92(1):12-18).

30 La introducción de un soporte de fibras sintéticas capaz de soportar la unión, la migración y la proliferación normales de las células de la piel, puede ayudar a acelerar la curación de las heridas al proporcionar un sustrato alternativo inmediato para que las células de la piel no afectada en los márgenes de la herida migren a través del mismo.

40 El alivio del dolor en la curación de las heridas es positivo para el paciente en un número de maneras ya que el dolor promueve un estrés psicológico en los pacientes mientras que el alivio del dolor permite que los pacientes toleren una terapia de compresión, que frecuentemente es beneficiosa en la curación de heridas crónicas (Christian y otros, Neuroimmunomodulation. 2006;13(5-6):337-46) (Price y otros, Int Wound J. 2007 abr;4 Supl 1:1-3 e Int Wound J. 2008 jun;5(2):159-71). Desafortunadamente, el alivio del dolor sistémico no ha demostrado ser muy eficaz en la lucha contra el dolor de heridas crónicas ya que el alivio del dolor de la mayoría de los medicamentos sólo dura minutos u horas y hay preocupaciones relacionadas con la adicción de los pacientes a los analgésicos (Cardenas y Jensen, J Spinal Cord Med. 2006;29(2):109-17).

50 Los apósitos diseñados para reducir el dolor y acelerar la curación se introdujeron por primera vez en 1948 (Gilje, Acta Derm Venereol. 1948;28(5):454-67). Los apósitos permiten una reepitelización más rápida al reducir la formación de costras, y reducir la ocurrencia de que los apósitos se peguen a las heridas y provocar una nueva lesión tras la retirada del apósito (Hinman y Maibach, Nature. 1963 oct 26;200:377-8). Sin embargo, estos apósitos aún requieren ser removidos. Sigue habiendo una necesidad de un apósito para heridas mejorado que es capaz de reducir el dolor mientras promueve la curación de heridas.

Breve resumen de la descripción

En un primer aspecto la invención proporciona un apósito para heridas que comprende un soporte electrocentrifugado, caracterizado porque dicho soporte comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un polioctoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico. Preferentemente, dicho polímero o copolímero biodegradable es co-electrocentrifugado junto con dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo es capaz de catalizar la degradación de dicho polímero o copolímero.

Dicho polímero o copolímero biodegradable es biocompatible. Más específicamente, dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un polioctoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos.

Preferentemente, dicho polímero es ácido polilactato. Alternativamente, el polímero es ácido poliglicólico. Alternativamente, dicho copolímero es un copolímero de ácido polilactato y ácido poliglicólico. Con mayor preferencia dicho copolímero es un poli(D,L-láctico-co-glicólida). Aún con mayor preferencia, dicho poli(D,L-láctico-co-glicólida) tiene una relación de 75:25 lactida a glicólida. Alternativamente, dicho poli(D,L-láctico-co-glicólida) tiene una relación de 50:50 lactida a glicólida.

En una modalidad preferida, dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) es un NSAID propiónico en donde dicho NSAID es ácido [2-(4-isobutilfenil)propiónico]. Alternativamente, dicho NSAID es ácido acetilsalicílico.

Preferentemente, dicho soporte comprende de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % en peso de NSAID. Alternativamente, dicho soporte comprende de aproximadamente 10 % a 20 % en peso de NSAID. Aún con mayor preferencia, dicho soporte comprende aproximadamente 10 % en peso de NSAID.

Dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse en un disolvente común.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un soporte electrocentrifugado, dicho soporte que comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un polioctoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico. Preferentemente, dicho polímero o copolímero biodegradable es co-electrocentrifugado junto con dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo es capaz de catalizar la degradación de dicho polímero o copolímero.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un soporte electrocentrifugado, dicho soporte comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, para usar como un medicamento en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un polioctoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico. Preferentemente, dicho polímero o copolímero biodegradable es co-electrocentrifugado junto con dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo es capaz de catalizar la degradación de dicho polímero o copolímero.

Aún en un aspecto adicional, la invención proporciona un soporte electrocentrifugado, dicho soporte comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, para usar en el tratamiento de una herida en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un polioctoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico. Preferentemente, dicho polímero o copolímero biodegradable es co-electrocentrifugado junto con dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo es capaz de catalizar la degradación de dicho polímero o copolímero.

Preferentemente, dicha herida es una herida crónica o en donde dicha herida es una herida aguda.

En un aspecto adicional la invención proporciona un soporte electrocentrifugado que comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, para usar en el tratamiento de dolor o inflamación, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un

poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico. Preferentemente, dicho polímero o copolímero biodegradable es co-electrocentrifugado junto con dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo es capaz de catalizar la degradación de dicho polímero o copolímero.

Dicho polímero o copolímero biodegradable es biocompatible.

Más específicamente, dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos.

Preferentemente dicho polímero es ácido polilactato. Alternativamente, dicho polímero es ácido poliglicólico. Alternativamente, dicho copolímero es un copolímero de ácido polilactato y ácido poliglicólico.

Preferentemente dicho copolímero es un poli(D,L-láctico-co-glicólida). Preferentemente, dicho poli(D,L-láctico-co-glicólida) tiene una relación de 75:25 lactida a glicólida. Alternativamente, dicho poli(D,L-láctico-co-glicólida) tiene una relación de 50:50 lactida a glicólida.

Preferentemente dicho NSAID es un NSAID propiónico. Preferentemente, dicho NSAID es [ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico]. Alternativamente, dicho NSAID es ácido acetilsalicílico.

Preferentemente, dicho soporte comprende de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % en peso de NSAID.

Aún con mayor preferencia dicho soporte comprende aproximadamente 10 % en peso de NSAID.

Dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse en un disolvente común.

Se describe además un método de tratar una herida que comprende el uso de un apósito para heridas o un soporte electrocentrifugado de acuerdo con cualquiera de las modalidades antes mencionadas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para producir un soporte electrocentrifugado para usar en la curación de heridas que comprende:

- i) disolver un polímero o co-polímero y un NSAID en un disolvente común en donde dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, y en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico; y
- ii) electrocentrifugar la solución resultante de la Etapa i).

En un aspecto adicional, la invención proporciona un soporte electrocentrifugado producido de acuerdo con el método descrito en la modalidad antes mencionada. En un aspecto adicional el soporte electrocentrifugado producido de acuerdo con el método descrito en la modalidad antes mencionada se usa como un medicamento, o se usa en el tratamiento de una herida, tal como una herida crónica o en donde dicho herida es una herida aguda. Alternativamente, el soporte electrocentrifugado producido de acuerdo con el método descrito en la modalidad antes mencionada se usa en el tratamiento del dolor o inflamación.

En un aspecto adicional la invención proporciona el uso de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo para catalizar la degradación de un soporte electrocentrifugado que comprende un polímero o co-polímero, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico. Preferentemente, dicho fármaco antiinflamatorio no esteroideo es electrocentrifugado junto con dicho polímero o copolímero.

A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta especificación, las palabras "comprende" y "contiene" y las variaciones de las palabras, por ejemplo "que comprende" y "comprende", significan" que incluyen pero no se limitan a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos, componentes, enteros o etapas.

A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta especificación, el singular abarca el plural a menos que el contexto

requiera otra cosa. En particular, donde se use el artículo indefinido en la especificación, se entiende que contempla los plurales así como los singulares, a menos que el contexto requiera otra cosa.

Los rasgos, enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos en conjunto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente a menos que se incompatible con éste.

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las siguientes figuras.

Figura 1. Imágenes SEM de fibras PLGA electrocentrifugadas A) 50/50 PLGA con 10 % en peso de ibuprofeno; B) 50/50 PLGA con 10 % en peso de sal sódica de ibuprofeno; C) 50/50 PLGA sin ibuprofeno; D) 1:1 mezcla de 50/50 y 75/25 PLGA con 10 % en peso de ibuprofeno; E) mezcla 1:1 de 50/50 y 75/25 PLGA sin ibuprofeno; F) 75/25 PLGA con 10 % en peso de ibuprofeno; G) 75/25 PLGA sin ibuprofeno. Barra de escala = 50 μm .

Figura 2. Efecto de las condiciones ambientales sobre soportes de PLGA 75:25 electrocentrifugado. Tinción con rojo sirio para la deposición de colágeno de los fibroblastos humanos (F), queratinocitos (K) y co-cultivos de ambos (F+K) cultivados durante 1 semana (en suero o en condiciones libres de suero) en soportes de PLGA 75:25 centrifugados en diferentes condiciones. A) los soportes se centrifugaron en humedad alta (>85 %); B) Similar a A, pero inmediatamente después de la centrifugación, los soportes se secaron bajo alto vacío a temperatura ambiente durante 24 horas.

Figura 3. Perfiles de liberación de ibuprofeno para tres tipos de soportes de PLGA: 75/25 (o), 50/50 (x) y una mezcla 1: 1 de estos dos (+). Las concentraciones de ibuprofeno se midieron mediante espectroscopía UV/Visible a 222 nm en varios puntos de tiempo durante una semana.

Figura. 4. Degradación *in vitro* de soporte de PLGA 75:25 en solución de Ringer con el tiempo. Microfotografías ópticas de soportes con 10 % en peso de ibuprofeno en el lado derecho A, C y E en el día 0, 1 y 6 de incubación en solución de Ringer. Soportes sin ibuprofeno en el lado izquierdo B, D y F. Barra de escala = 100 mm

Figura 5. Inmunomarcaje de NFkB de cultivos HDF en 2D después del tratamiento con TNF- α , LPS e ibuprofeno. Marcaje inmunofluorescente de fibroblastos humanos para la subunidad p65 de NF- κ B, que demuestra una actividad relativa del factor de transcripción. (a) Células no estimuladas control. (b) LPS (100 ngml⁻¹) células estimuladas. (c) TNF- α (1000 Uml⁻¹) células estimuladas. (d) LPS (100 ngml⁻¹) más ibuprofeno (10⁻³ M) células estimuladas. (e) TNF- α (1000 Uml⁻¹) e ibuprofeno (10⁻³ M) células estimuladas. (f) LPS (100 ngml⁻¹) y sal sódica de ibuprofeno (10⁻⁴ M) células estimuladas. (g) TNF- α (1000 Uml⁻¹) y sal sódica de ibuprofeno (10⁻⁴ M) células estimuladas.

Figura 6. Efecto antiinflamatorio del ibuprofeno en células HDF evaluado por inmunomarcaje de NF- κ B. Efecto de (a) ibuprofeno y (b) sal sódica de ibuprofeno en la señalización inflamatoria de NFkB. Los fibroblastos humanos se incubaron con medios o compuestos de ibuprofeno (10⁻⁴ a 10⁻³ M) durante 15 minutos antes de la estimulación con LPS (100 ngml⁻¹, barras blancas) o TNF- α (1000 Uml⁻¹, barras con rayas diagonales), o solo compuestos de ibuprofeno (barras rellenas) durante 90 minutos. La señalización inflamatoria se determinó mediante el uso de la localización intracelular de NF- κ B. Clave: *** p < 0.001 en comparación con LPS solo, # p < 0.05, ## p < 0.001 en comparación con TNF- α solo.

Figura 7. Efecto de soportes cargados de ibuprofeno sobre la activación de NFkB estimulada por TNF- α y LPS en fibroblastos.

La translocación nuclear del factor de transcripción proinflamatorio NFkB se examinó como se ilustra en las fotos a-e en A y cuantificado en B para cultivos 2D de fibroblastos expuestos a soportes de liberación de ibuprofeno.

En A (a) se muestran fibroblastos controles no estimulados (b) muestra fibroblastos estimulados con LPS (100 ngml⁻¹) (exposición de 2h) (c) muestra células expuestas a LPS (100 ngml⁻¹) durante 2 horas después de una pre-incubación con soportes de PLA/PGA con ibuprofeno durante 24 h. En c el soporte era una mezcla 50/50 de PLA/PGA 75/25 y 50/50 cargado con ibuprofeno (d) muestra fibroblastos estimulados con LPS (100 ngml⁻¹) expuestos a PLA/PGA 75/25 cargado con ibuprofeno y (e) muestra fibroblastos estimulados con LPS (100 ngml⁻¹) expuestos a PLA/PGA 50/50 cargado con ibuprofeno.

La cuantificación de la translocación nuclear de NFkB se muestra para estos fibroblastos en los histogramas debajo en B para células bajo condiciones sin estimulación (donde el porcentaje de NFkB en el núcleo no excedió del 5 %) y para células estimuladas con LPS (100 ngml^{-1}) durante 2 horas después de una pre-incubación con soportes de PLA/PGA con ibuprofeno durante 24 h. Los resultados mostrados son la media $\pm$ SEM de cultivos por triplicado y la significación estadística se indica como * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

Figura 8. Inmunomarcaje de NFkB de cultivos HDF en 3D después del tratamiento con LPS y soportes con ibuprofeno. Los fibroblastos se cultivaron en soportes Azowipe 3D (detalles en Materiales y Métodos) y se expusieron a soportes cargados de ibuprofeno. El marcaje por inmunofluorescencia de células para la subunidad p65 de NF-kB se usó para demostrar la actividad relativa del factor de transcripción. (a) Células no estimuladas control. (b) HDF estimuladas con LPS (100 ngml^{-1}) por 2h. (c) HDF estimuladas con LPS (100 ngml^{-1}) por 2h después de pre-incubación con una mezcla de soportes de ibuprofeno PLA/PGA 50/50 de 75/25 y 50/50 por 24 h. (d) HDF estimulada con LPS (100 ngml^{-1}) por 2h después de pre-incubación con soportes de ibuprofeno PLA/PGA 75/25 (e) HDF estimuladas con LPS (100 ngml^{-1}) por 2h después de pre-incubación 50/50 soportes de ibuprofeno PLA/PGA.

Figura 9. Cultivo de fibroblastos en soportes cargados de ibuprofeno. Los fibroblastos se cultivaron en soportes controles y soportes de PLGA 75:25 cargados de ibuprofeno (detalles en Materiales y Métodos) durante 48hr (A) o 7 días (B) y su supervivencia se evaluó mediante el ensayo de MTT-ESTA. En A los soportes se cargaron con 0, 1, 2, 5 o 10 % de ibuprofeno y después se lavaron por inmersión en medios durante 0, 24 o 48 horas antes de cultivar las células en ellos. En B los soportes o no estaban cargados o estaban cargados con 10 % de ibuprofeno y después se lavaron durante 0, 1 o 24 horas antes del cultivo celular. Los resultados mostrados son la media $\pm$ SD de pocillos de células por triplicado.

Figura 10. Liberación de aspirina de soportes PLGA electrocentrifugados.

Perfil de liberación de aspirina de tipos de soporte PLGA: 75/25. La concentración de aspirina liberada a partir de las fibras se controló mediante el uso de espectroscopía UV/Visible (intensidad a 240 nm) en varios puntos de tiempo durante un período de una semana y se comparó con valores de una curva de calibración.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un apósito para heridas que comprende un soporte electrocentrifugado, el soporte que comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un polioctoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico. Los inventores han identificado de manera sorprendente que los NSAID son capaces de catalizar la degradación del polímero o copolímero y por lo tanto la ruptura de un soporte, lo que vuelve a estos soportes cargados particularmente útiles en la curación de heridas y en superar las dificultades relacionadas con la retirada del apósito.

El apósito de heridas inicialmente libera el NSAID mientras que actúa simultáneamente como una guía de tejido temporal para la regeneración de la piel. Los apósitos de heridas pueden degradarse en el lecho de la herida lo que deja las células de la piel en su lugar de manera que no hay necesidad de quitar el apósito de la herida.

El nivel de NSAID liberado es suficiente para reducir la respuesta de las células a las principales citocinas pro-inflamatorias sin comprometer la capacidad básica de los soportes para actuar como soportes dérmicos sustitutos para la unión y la migración de los fibroblastos dérmicos humanos.

Los inventores han demostrado la carga de ibuprofeno en soportes los que liberan el ibuprofeno durante varios días. Los niveles de ibuprofeno liberado son suficientes para reducir la respuesta de las células a las principales citocinas pro-inflamatorias sin comprometer la capacidad básica de los soportes para actuar como soportes dérmicos sustitutos para la unión y la migración de los fibroblastos dérmicos humanos.

Para cargar el ibuprofeno en los soportes la forma ácida del ibuprofeno se disolvió en el mismo disolvente que el polímero de PLGA (DCM) y esto dio una distribución homogénea del ibuprofeno a través de las fibras del soporte. En contraste las sales de sodio no se disolvieron en DCM y produjeron soportes muy irregulares en los que la liberación del fármaco fue mucho menos predecible. Por lo tanto, los fármacos que pueden disolverse en el disolvente orgánico del polímero pueden centrifugarse directamente en las fibras de soporte.

Los inventores han demostrado que aproximadamente el 10 % del ibuprofeno cargado se liberó de las fibras del soporte lo largo de varios días y que la incorporación de ibuprofeno aceleró la descomposición de las fibras. Se demostró que la concentración del ibuprofeno liberado fue suficiente para atenuar la respuesta inflamatoria de los fibroblastos a una importante citocina pro-inflamatoria, el TNF- α , y a los lipopolisacáridos que normalmente se derivan de las bacterias.

Los soportes que liberan ibuprofeno aún conservaban la capacidad de actuar como soportes para la unión, la migración y la proliferación de células de la piel. Esto se confirmó al examinar la unión y la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos sobre los soportes. Los resultados mostraron que aunque se redujo la unión de las células a los soportes cargados de ibuprofeno recién preparados a la mayor concentración de ibuprofeno cargada (10 %), esto se restauró una vez que los soportes habían estado en PBS durante 24 horas después de la esterilización, cuando la unión de células aumentó de nuevo a los niveles observados en los soportes controles no cargados. Esto muestra que la carga de ibuprofeno en los soportes no cambia su capacidad básica de actuar como fibras para la unión y la migración de células de la piel e indica que estas fibras pueden usarse como guías de tejido para aplicaciones en la curación de heridas.

Con respecto a la curación de heridas un cierto nivel de inflamación acelera la curación de las heridas ya que la liberación de citocinas pro-inflamatorias atrae células en el área de la herida - lo contrario también es cierto y un nivel de inflamación demasiado alto puede retardar la curación de las heridas (Werner y Grose *Physiol. Rev.* 2003;83:835-870, Diegelmann y Evans, *Frontiers in Bioscience* 2004;9:283-289.). Sin duda se piensa que este es el caso en muchas heridas crónicas agresivas donde meses e incluso años de actividad de metaloproteasas de la matriz y de secreción de citocinas pro-inflamatorias crean ambientes del lecho de la herida en el que las células normales de la piel en el perímetro de la herida no logran sobrevivir si migran hacia el lecho de la herida. Por lo tanto, las células capaces de curar las heridas fallan en su movimiento hacia estos lechos de heridas agresivas ya que la matriz extracelular presente está bajo constante degradación debido a las metaloproteasas de la matriz (por ejemplo Armstrong y Jude, *Journal of the American Podiatric Medical Association* 2002;92(1):12-18).

La introducción de un soporte de fibras sintéticas capaz de soportar la unión normal de las células de la piel y la migración y proliferación ayudará a acelerar la curación de heridas proporcionando un sustrato alternativo inmediato para células de piel no afectadas en los márgenes de la herida para migrar a través. La liberación simultánea de un agente antiinflamatorio de estas fibras servirá para reducir la inflamación agresiva observada en estos lechos de herida inflamadas agresivas.

La curación de heridas involucra las etapas de formación de coágulos, tapar la herida, invasión del coágulo por las células inflamatorias, fibroblastos y capilares, dibujar los bordes de la herida juntos, seguido por la migración hacia delante de los bordes de la epidermis de la herida para cubrir la superficie de la herida por reepitelización.

Como se usa en la presente descripción, el término "herida" se refiere a, pero sin limitarse a: lesiones o trauma del tejido interno o externo, preferentemente lesión o trauma de la epidermis y/o dermis de la piel. La herida puede ser una herida aguda o una herida crónica. A modo de ejemplo, una herida aguda puede ser una incisión, laceración, abrasión o quemadura, una herida por punción, una herida por penetración o una herida debido a las enfermedades dermatológicas tales como psoriasis, acné y eczema. A modo de ejemplo, una herida crónica puede ser una úlcera venosa, una úlcera diabética, una úlcera por presión, úlcera de la córnea, úlcera digestiva o heridas como resultado de isquemia y envenenamiento por radiación.

Es una práctica común en el tratamiento de las heridas cubrir una herida con un apósito para heridas. Como se usa en la presente descripción, el término "apósito para heridas" se refiere a un apósito para la aplicación a una herida, en donde dicho apósito facilita los procesos curativos de la herida al proporcionar una superficie del soporte electrocentrifugado que actúa como una guía del tejido para la reparación de heridas y reepitelización. El soporte electrocentrifugado comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico.

Preferentemente, un apósito para heridas será capaz de adherirse al sitio de la herida. También debería ser no tóxico y provocar no más que una respuesta alérgica mínima. Además, el apósito debería prevenir que las infecciones bacterianas o virales entren a la herida. Los ejemplos de apósitos para heridas de la invención se relacionan con cualquier estructura adecuada para la aplicación a una herida caracterizado por la presencia del soporte electrocentrifugado para la aplicación a una herida que comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es

capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde: a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un polioctoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico. A modo de ejemplo solamente, el apósito puede ser prótesis, implante, matriz, endoprótesis, placas de cultivo celular, gasa, vendaje, yeso, matriz biodegradable y la película polimérica.

El término "soporte", como se usa en la presente, se refiere a cualquier material que permite la adhesión de las células, preferentemente la adhesión de las células involucradas en la curación de heridas. "Adhesión", "adherir" o "adhiere" como se usa en la presente descripción, se refiere a las células que se adhieren directamente o indirectamente a un sustrato así como también a células que se adhieren a otras células.

Preferentemente el soporte es tridimensional.

Los soportes adecuados incluyen mallas, otras estructuras filamentosas, no tejidos, esponjas, materiales tejidos o no tejidos, materiales de punto o no, fieltros, materiales porosos eluidos de sal, materiales porosos moldeados, soportes generados por impresión en 3D, espumas, láminas perforadas, rejillas, fibras paralelas con otras fibras que cruzan en varios grados, y combinaciones de estos. El núcleo del soporte puede presentarse en una variedad de formas que incluyen láminas, cilindros, tubos, esferas o perlas. El núcleo del soporte puede fabricarse a partir de materiales absorbibles o no absorbibles.

Los soportes pueden estar formados de fibras de polímero, tejido o no tejido en mallas que pueden ser utilizadas para soportar la adhesión de las células y el crecimiento. Estos soportes pueden formarse por fundición, tejido, lavado de sales, hilado, o moldeado.

El soporte comprende un soporte electrocentrifugado. Los términos "electrocentrifugar" o "electrocentrifugado", como se usa en la presente se refiere a cualquier método en el que los materiales son derramados, rociados, bombardeados, goteados, o de otra manera transportados en la presencia de un campo eléctrico. El material electrocentrifugado puede depositarse a partir de la dirección de un contenedor cargado hacia un objetivo conectado a tierra, o desde un recipiente conectado a tierra en la dirección de un objetivo cargado. En particular, el término "electrocentrifugar" se refiere a un proceso en el que las fibras se forman a partir de una solución cargada que comprende al menos un material biológico natural, al menos un material polímero sintético, o una combinación de estos enviando la solución con carga eléctrica a través de una abertura u orificio hacia un objetivo a tierra.

Como se usa en la presente descripción, los términos "solución" y "fluido" se refiere a un líquido que es capaz de ser cargado y que comprende al menos un material natural, al menos un polímero sintético, o una combinación de estos).

El polímero electrocentrifugado puede ser un copolímero. El término "copolímero" como se usa en la presente descripción abarca copolímeros, terpolímeros, y composiciones poliméricas múltiples de orden superior formadas por bloque, injerto o combinación aleatoria de componentes poliméricos.

Las propiedades de los materiales electrocentrifugados pueden ajustarse de acuerdo con las necesidades y especificaciones de las células a suspender y cultivar dentro de estas. La porosidad, por lo tanto, puede variar de acuerdo con el método de fabricación de la matriz de los materiales electrocentrifugados.

Como se usa en la presente descripción, el término un material biológico natural puede ser un material orgánico de origen natural que incluyen cualquier material que se encuentra naturalmente en el cuerpo de un mamífero, planta, u otro organismo. Un material polímero sintético puede ser cualquier material preparado a través de un método de síntesis, procesamiento, o fabricación artificial. Preferentemente, el polímero es un material biológicamente compatible. Los materiales biológicos y poliméricos son capaces de ser cargados bajo un campo eléctrico.

Los materiales de origen natural adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, polipéptidos, péptidos desnaturalizados tales como la gelatina de colágeno desnaturalizado, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, glicoproteínas, lipoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, y proteoglicanos. En una modalidad, el material de origen natural es un material de matriz extracelular, por ejemplo, colágeno, fibrina, elastina, laminina, fibronectina, heparina. Dicho material de matriz extracelular puede aislarse de células, tales como células de mamífero, por ejemplo de origen humano. Preferentemente, el material de origen natural es colágeno.

Preferentemente, el soporte comprende un polímero sintético biocompatible. Los ejemplos de polímeros sintéticos biocompatibles incluyen, pero sin limitarse a, poli(uretanos), poli(siloxanos) o siliconas, poli(etileno), polivinilo pirrolidona, poli(2-hidroxi metacrilato de etilo), poli(N-vinilo pirrolidona), poli(metacrilato de metilo), alcohol polivinílico (PVA), poli(ácido acrílico), acetato de polivinilo, poli(acrilamina), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(etilenglicol), poli(ácido metacrílico), ácido

poliláctico (PLA), ácidos poliglicólicos (PGA), poli(láctido-co-glicólido) (PLGA), nilons, poliamidas, polianhídridos, poli(etileno-co-alcohol vinílico) (EVOH), policaprolactona, poli(acetato de vinilo), hidróxido de polivinilo, poli(óxido de etileno) (PEO) y poliortoésteres preferentemente, el polímero biocompatible es PGLA.

5 La invención incluye soportes que comprende una combinación de polímeros sintéticos y material biológico de origen natural, por ejemplo, una combinación de colágeno y PLGA. Las cantidades relativas de los polímeros sintéticos y del material biológico de origen natural en la matriz pueden ajustarse para aplicaciones específicas.

10 Hay muchos factores que intervienen en el proceso de electrocentrifugación que puede afectar el diámetro de la fibra y tamaño de poro de los soportes. Las variables claves son la viscosidad de la solución, tensión superficial, y viscoelasticidad de la solución centrifugada. Estos están directamente relacionadas con la concentración de, y peso molecular del polímero, así como también con el solvente usado. Las propiedades dieléctricas de la solución también juegan un papel clave (Kowalczyk y otros, Biomacromolecules. julio de 2008;9(7):2087-90; Thompson y otros, J.Polymer. 2007;48:6913-6922; Mitchell y Sanders, J Biomed Mater Res A. julio de 2006;78(1):110-20).

15 Otra fuente de variación en la electrocentrifugación que tal vez no está bien documentada es que una vez que el polímero está en solución puede cambiar o degradarse durante el almacenamiento y la misma concentración de polímero no siempre produce una solución con la misma viscosidad. Por lo tanto, el peso molecular del polímero disminuirá rápidamente con el tiempo (particularmente el PLGA 50/50). Por lo tanto, preferentemente se usa polímero fresco para la centrifugación.

20 Preferentemente, la invención incluye soportes formados a partir de la co-electrocentrifugación de dicho polímero o copolímero biodegradable junto con dicho NSAID. Como se usa en la presente, los términos "co-electrocentrifugar" y "co-electrocentrifugado" se refieren a la producción de fibras que comprenden múltiples componentes a partir de una única solución que comprende cada uno de dichos componentes, por ejemplo una única solución que comprende un polímero o copolímero biodegradables junto con dicho NSAID. Dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común. Preferentemente dicho NSAID es directamente centrifugado en un soporte que comprende dicho polímero o copolímero.

30 Como se usa en la presente descripción, el término "biodegradable" se refiere al material o polímero que puede degradarse, preferentemente adsorberse o degradarse en el cuerpo del paciente. El soporte es biodegradable, es decir, se forma de materiales biodegradables, tales como polímeros biodegradables y material biológico de origen natural. Los ejemplos de materiales biodegradables incluyen, pero sin limitarse a colágeno, poli(alfa ésteres) tales como poli(ácido de lactato), poli(ácido glicólico), poliortoésteres, polianhídridos, ácido poliglicólico y poliglactina, y copolímeros de estos.

35 Otros polímeros biodegradables adecuados descritos en la presente descripción incluyen éter celulosa, celulosa, éster celulósico, polietileno fluorado, fenólico, poli-4- metilpenteno, poliácronitrilo, poliamida, poliamidaimida, poliácrlato, polibenzoxazol, policarbonato, policianoarieter, poliéster, poliéstercarbonato, poliéter, polieteretercetona, polieterimida, poliétercetona, poliétersulfona, polietileno, polifluoroolefina, poliimida, poliolefina, polioxadiazol, óxido de polifenileno, sulfuro de polifenileno, polipropileno, poliestireno, polisuluro, polisulfona, politetrafluoretileno, politioeter, politriazol, poliuretano, polivinilo, fluoruro de polivinilideno, celulosa regenerada, silicona, urea formaldehído, o copolímeros de estos.

Preferentemente, el material electrocentrifugado es un poliláctido, o un derivado de este.

45 Preferentemente, el soporte electrocentrifugado es funcionalizado, por ejemplo, por la adición de agentes pasivos o activos tales como agentes terapéuticos o biológicos adicionales.

50 Como se usa en la presente descripción, el término "NSAID" y "compuesto antiinflamatorio no esteroide" NSAID, incluye sales farmacéuticamente aceptables, complejos, ésteres, isómeros farmacéuticamente aceptables de estos, y formas cristalinas de estos. El término se relaciona con cualquier NSAID capaz de catalizar la degradación de dicho soporte de polímero o copolímero biodegradable.

Los NASID son un grupo bien definido de analgésicos no opioides caracterizados porque son medicamentos no esteroides que actúan como agentes antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos.

55 Los ejemplos de NSAIDs incluyen, pero sin limitarse a NSAIDs que inhiben preferentemente Cox-1, tales como ácidos propiónicos, ácido acético, ácido fenámico, ácidos bifenilcarboxílicos y oxicams.

Los NSAIDs de ácido propiónico incluyen, pero sin limitarse a, ibuprofeno, naproxeno, benoxaprofeno, flurbiprofén,

fenoprofeno, fenbufeno, cetoprofeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozin, prapoprofeno, mioprofeno, tioxaprofeno, suprofeno, alminoprofeno, ácido tiaprofónico, fluprofeno, y ácido buclórico. Preferentemente el ácido propiónico es ibuprofeno.

- 5 Los ácidos acéticos incluyen, pero sin limitarse a, indometacina, sulindaco, tolmetina, zomepirac, diclofenaco, fenclofenaco, alclofenaco, ibufenac, isoxepaco, furofenaco, tiopinaco, zidometacina, acemetacina, fentiazac, clidanac y oxipinac.

- 10 Los ácidos fenámicos incluyen pero sin limitarse a, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico. Los miembros preferidos del grupo ácido fenámico incluyen ácido mefenámico y ácido meclofenámico. Los ácidos bifenilcarboxílicos incluyen, pero sin limitarse a, diflunisal y flufenisal. Oxicams incluyen meloxicam, piroxicam, sudoxicam, isoxicam.

- 15 Alternativamente, el NASID es un NSAID que inhibe preferentemente Cox-2, tal como lumiracoxib, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib.

Alternativamente, el NASID es un salicilato, tal como aspirina.

- 20 Como se usa en la presente descripción, el término "degradación" se relaciona con la descomposición de la estructura del polímero del soporte. Esta descomposición de la integridad estructural se acompaña de la liberación del soporte de productos de degradación del polímero y una reducción en la resistencia mecánica del soporte.

Ejemplos

Materiales y Métodos

- 25 1. Síntesis y caracterización del soporte

A. Polímeros

- 30 Para este estudio tres copolímeros de poli(D,L-lactida-co-glicólida) (PLGA) con diferentes relaciones de lactida a glicólida 75:25 (Mw 66-107k), 50:50 (Mw 40-75k) y una mezcla 1:1 de estos dos se usó. Todos los copolímeros PLGA se adquirieron de Sigma Aldrich. Los polímeros se disolvieron en diclorometano (DCM) para formar soluciones de viscosidades adecuadas para la electrocentrifugación; 75:25 y 50:50 para formar soluciones de 20 % y 25 % (p/p), respectivamente, y volúmenes iguales de estas soluciones se usaron para formar la mezcla. Se añadió ibuprofeno en polvo (Sigma Aldrich) a las
- 35 soluciones de polímero en DCM para formar mezclas homogéneas (de 1-10 % en peso de ibuprofeno añadido con relación al peso del polímero).

B. Condiciones de electrocentrifugación

- 40 Las soluciones de polímeros se cargaron en jeringas de 2 ml equipadas con agujas de acero inoxidable de punta roma con un diámetro interno de 0.8 mm (I&J Fisnar Inc.). Las soluciones se liberaron a una velocidad de alimentación constante de 3.5 ml/hr mediante el uso de una bomba de jeringa programable (Aladdin 1000) y se electrocentrifugaron horizontalmente con un voltaje de aceleración de 15 kV suministrado por una fuente de energía de alto voltaje (Brandenburg, Alpha serie III). Se recolectaron esterillas fibrosas en láminas de papel de aluminio (18 cm por 16 cm) envueltas alrededor de un colector
- 45 giratorio de aluminio conectado a tierra (que gira a 300 rpm) 20 cm de la punta de la aguja. La formación/estabilidad del chorro se ayudó por medio de un anillo de enfoque de aluminio a un voltaje de 15 kV, 5 mm detrás de la punta de la aguja. Los soportes se produjeron en una habitación con aire acondicionado a 21 °C con una humedad relativa de ~30 %, seguido de secado a vacío a temperatura ambiente durante un mínimo de 24 horas. Para analizar el efecto del medio ambiente (humedad y temperatura) sobre la reproducibilidad del soporte, ocasionalmente los soportes se centrifugaron en condiciones
- 50 de alta humedad (>85 % de humedad relativa) y no se secaron al vacío.

C. Detección de la liberación de ibuprofeno a partir de soportes mediante espectroscopía UV/Visible

- 55 La liberación del ibuprofeno a partir de los tres tipos de soporte (cada uno cargado con 10 % de ibuprofeno) se controló mediante espectroscopía UV/Visible. Una pieza de 25 mg de soporte se cortó de cada soporte producido y se sumergió en 3 ml de agua pura. Se midió la intensidad a 222 nm (la λ_{max} de IBU) en varios puntos de tiempo hasta una semana, y los valores se compararon con una curva estándar de ibuprofeno calculada previamente.

D. Degradación de los soportes in vitro

Los soportes con o sin ibuprofeno se cortaron en discos de 18 mm mediante el uso de un perforador de tejido y se esterilizaron al atomizarlos suavemente con EtOH al 70 % y se dejaron secar en una campana de flujo estéril. Después los soportes se sumergieron en 1 ml de solución de Ringer con 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y se incubaron a 37 °C. Para probar el efecto del pH sobre la degradación del soporte, se colocaron en solución de Ringer en 3 valores de pH diferentes (6, 7.4 y 8.5). Se tomaron muestras de esta solución diariamente para monitorear los cambios de pH. Los cambios físicos en las esterillas del soporte también se registraron diariamente al tomar microfotografías ópticas de los soportes.

2. Respuesta de las células a los soportes en cultivos 2D y 3D

A. Cultivo de queratinocitos y fibroblastos humanos normales

Los fibroblastos humanos normales se aislaron y cultivaron como se describió previamente (Ralston y otros, 1997). Se usaron fibroblastos de 3-7 pases. Los queratinocitos se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FCS), 2 mM de glutamina, 0.625 µg/ml de anfotericina B, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. La preparación de construcciones de ingeniería de tejidos en 3D ya sea en soportes Azowipe® (soportes de microfibras de rayón viscoso no tejido unidos con un copolímero de estireno-butadieno, Vernon-Carus, Chorley, Reino Unido) o soportes de PLGA 75:25 se realizó como se describió previamente (Blackwood y otros, Biomateriales. 2008; 29(21):3091-104).

B. Detección de la actividad metabólica celular a través del ensayo de MTT-ESTA

El efecto del ibuprofeno (sal sódica o mezcla de isómeros; Sigma-Aldrich, Reino Unido) sobre la actividad metabólica celular, se estudió al añadir ibuprofeno directamente sobre las células o al examinar su liberación a partir de los soportes tanto en monocapas (2D) como en soportes 3D. Para el análisis 2D, se cultivaron 3×10^4 células HDF/pocillo en placas de 24 pocillos hasta un 80 % de confluencia. Para el análisis 3D, se cultivaron 3×10^5 células HDF/pocillo en placas de 12 pocillos en 2 capas de un soporte de rayón viscoso durante 48 horas. Los soportes (con y sin ibuprofeno) se colocaron por encima de las células cultivadas mediante el uso de insertos de co-cultivo de manera que los soportes estaban inmersos en los mismos medios que las células durante 24 horas, pero estaban separados físicamente de los fibroblastos. La actividad metabólica celular (en 2D o 3D) se evaluó mediante el uso de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio) (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Brevemente, las células se lavaron tres veces en PBS, y después se incubaron con solución de MTT (0.5 mg/ml de MTT en PBS, 1 y 2 ml por pocillo de las placas de 24 y 12 pocillos, respectivamente) durante 1 hora a 37 °C en una incubadora humidificada (5 % de CO₂/ 95 %de aire). En las células viables sanas, el MTT se reduce a una sal de formazán de color púrpura por la actividad de la enzima mitocondrial succinil deshidrogenasa. Después de 60 minutos, la solución se aspiró y el producto de formazán intracelular insoluble se solubilizó y se liberó de las células mediante la adición de iso-propanol (0.5 ml por pocillo de la placa de 24 pocillos o 1 ml / cm² de tejido cultivado) y se incubaron durante 10 min. La densidad óptica a 540 nm se midió después mediante el uso de un espectrofotómetro de lectura de placas.

C. Visualización de las células cultivadas dentro de los soportes mediante una tinción para la producción de colágeno

Para analizar el efecto de las condiciones ambientales de centrifugación (humedad y temperatura) sobre la estructura física de los soportes y sobre el crecimiento celular, se probaron cultivos 3D en soportes PLGA electrocentrifugados bajo diferentes condiciones para determinar la deposición de colágeno. La deposición de colágeno sobre las fibras del soporte se analizó como se describe en Blackwood y otros, 2008. Brevemente, las construcciones se cultivaron durante 7 días, después se lavaron 3 veces en PBS y se fijaron en formalina al 4 %. Después de 3 lavados con PBS las construcciones se tiñeron para determinar la deposición de colágeno en una solución de 0.1 % de rojo sirio F3B (C.I. 35780, Direct Red 80, Sigma-Aldrich) en ácido pícrico saturado durante 18 horas. Después de eso, las construcciones se lavaron con agua hasta que no se eluyó más coloración roja. Los soportes teñidos con rojo picosirio se fotografiaron después con una cámara digital.

D. Investigación del efecto antiinflamatorio del ibuprofeno y de soportes cargados de ibuprofeno mediante inmunomarcaje de fibroblastos para la detección de la activación de NF-κB/p65

Se usó LPS de E. coli serotipo O111:B4 (Sigma-Aldrich) a 100 ng/mL o TNF-α (Sigma-Aldrich) a 1000 U/ml como control positivo para la activación de NF-κB en fibroblastos. En experimentos preliminares, se usó ibuprofeno (10⁻³ y 10⁻⁴ M, sal sódica y mezcla de isómeros; Sigma-Aldrich, UK) para regular negativamente la activación de NF-κB. Después se

examinaron los soportes de PLGA (75/25, 50/50 y una mezcla 1: 1 de estos dos) cargados de 10 % de ibuprofeno. Los controles negativos se produjeron al incubar las células en DMEM normal. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5 Tras los tratamientos con ibuprofeno, las monocapas se lavaron en PBS y las células se fijaron en formalina al 10 % (500 µL por pocillo) durante 30 minutos. Las monocapas celulares se lavaron otras tres veces en PBS, antes de la permeabilización celular con Triton X100 al 0.1 % durante 20 minutos. Subsecuentemente, las células se lavaron tres veces con PBS. Los sitios de unión no reactivos se bloquearon al añadir una solución de leche en polvo al 5 % a cada pocillo durante 1 hora. Se realizaron otros tres lavados en PBS antes de la incubación con la solución del primer anticuerpo. El primer anticuerpo (IgG policlonal de conejo anti NF-κB p65 C-20 humano, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA) se añadió a una concentración de 1:100 en PBS-leche en polvo al 1 %. Las células se incubaron en la solución de anticuerpo a 4 °C durante 18 horas. Las células se lavaron tres veces más en PBS. Posteriormente, las células se incubaron con anticuerpo de cabra anti-conejo biotinilado (1: 1000) (Vector Laboratories, CA) en PBS-leche en polvo al 1 %. Después las células se lavaron otras tres veces en PBS. Se añadió después el conjugado estreptavidina-FITC (Vector Laboratories, CA) a los pocillos a una concentración de 1:100 en PBS. Se realizaron otros tres lavados en PBS. Después de este tiempo, la tinción fluorescente se visualizó mediante el uso de un sistema expreso de imágenes AXON (Axon Instruments/Molecular Devices, Union City, CA). Brevemente, las microfotografías de fluorescencia de muestras inmunomarcadas se tomaron mediante el uso de iluminación de epifluorescencia en λ_{ex} 495 nm λ_{em} 515 nm (para la visualización de FITC); λ_{ex} 358 nm λ_{em} 461 nm (para la visualización de DAPI). La fluorescencia de DAPI se usó para identificar la posición nuclear. El límite entre el núcleo y el citoplasma se delimitó con un programa informático de análisis (ImageXpress Console 1.0) mediante el uso de microfotografías de DAPI en una muestra de al menos 100 conteos celulares por campo visual. Dentro de la región definida, se usó la intensidad del marcaje de FITC (NF-κB/p65) para calcular la activación para cada microfotografía y muestra. El cálculo de la activación de NF-κB se realizó manualmente de acuerdo con la posición intracelular (como se describió anteriormente en Moustafa y otros, J Invest Dermatol. 2002 Dic; 119(6):1244-53 y Canton y otros, Tissue Ing. 2007;13(5):1013-24), donde la localización nuclear total indica la plena activación de NF-κB y la ausencia de localización nuclear indica NF-κB inactivo. El marcaje de p65 tanto en núcleo como en citosol se tomó como una activación parcial. El análisis de las microfotografías se realizó por triplicado.

30 Para las células cultivadas en soportes 3D las metodologías usadas fueron las descritas en Sun y otros, J Mater Sci Mater Med. 2004;15(7): 743-9. Para la investigación de la unión y la migración de fibroblastos sobre soportes cargados de ibuprofeno - esto se examinó al cargar células sobre soportes que contenían 0, 2, 5 y 10 % de ibuprofeno y cultivar las células durante 7 días antes de la evaluación de la viabilidad celular mediante el uso de MTT ESTA. En estos experimentos algunas muestras de soportes se lavaron mediante inmersión en los medios durante varios períodos de 1 a 48 horas antes de la adición de las células como se indicó.

35 E. Estadísticas

Se usó la prueba t de Student no pareada para evaluar la significación de las diferencias entre los resultados.

40 3. Soportes cargados de aspirina

A. Materiales

45 Ácido acetilsalicílico (Aspirina) y poli(D,L-lactida-co-glicólida) (75/25) se adquirieron de Sigma Aldrich y se usaron como se recibieron.

B. Fibras cargadas con aspirina electrocentrifugadas

50 A una solución de 20 % en peso de PLGA (75/25) en diclorometano, se añadió 10 % en peso de ácido acetilsalicílico (con relación al polímero) y se agitó hasta que se disolvió completamente, lo que produjo una solución homogénea. Las condiciones de electrocentrifugación fueron similares a las de los soportes fibrosos de PLGA 75/25 cargados de ibuprofeno, descritas anteriormente.

55 C. Liberación de Aspirina

La liberación de aspirina a partir de las fibras se monitoreó mediante el uso de espectroscopía UV/Visible (intensidad a 240 nm) en varios puntos de tiempo durante un período de una semana y se comparó con valores de la curva de calibración.

Para cada experimento, se cortó una sección de soporte (10 mg) y se sumergió en agua pura (3 ml). Esto corresponde a aproximadamente 1.0 mg de aspirina que es equivalente a una concentración máxima calculada de 1.68 mM.

5 Resultados

1. Síntesis y caracterización del soporte

10 A. Desarrollo de condiciones reproducibles de centrifugación para la producción de material electrocentrifugado con ibuprofeno

15 Los soportes de PLGA se electrocentrifugaron a partir de soluciones de DCM cargados con 1-10 % en peso de ibuprofeno con relación al polímero para producir fibras en la que el ibuprofeno se dispersó uniformemente (ver la Figura 1A, D y F). La presencia de la forma ácida de ibuprofeno no alteró significativamente la apariencia de los soportes fibrosos como se muestra en la Figura 1. Se usó la forma ácida ya que la sal sódica de ibuprofeno era insoluble en disolventes adecuados para el procesamiento del polímero. Se encontró que este último resultó en una dispersión heterogénea del fármaco en la solución de centrifugación y en la centrifugación, el fármaco tenía una tendencia de llegar a la superficie de las fibras debido a las fuerzas electrostáticas involucradas en el proceso (ver la Figura 1 B).

20 Se ha observado que las fibras producidas de esta manera tienen una liberación rápida abrupta cuando se sumergen en medios acuosos (Taepaiboon, y otros, Nanotechnology. 2006;17:2317-232). En consecuencia para lograr una liberación más sostenida, se prepararon soluciones homogéneas del polímero y de la mezcla de isómeros de ibuprofeno (forma ácida) en diclorometano (DCM) para todos los estudios posteriores.

25 Las concentraciones de los varios polímeros y los parámetros de electrocentrifugación fueron similares a los descritos anteriormente por nosotros (Blackwood y otros, Biomaterials. 2008; 29(21):3091-104). Se añadió 1-10 % en peso de ibuprofeno (con relación al polímero) y cada solución se disolvió completamente antes de la centrifugación. Para la 'mezcla' de polímeros 1:1, se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones de PLGA 50/50 (con ibuprofeno) y 75/25 (con ibuprofeno).

30 La temperatura y la humedad del medio ambiente en las que se realizó la electrocentrifugación influenciaron fuertemente las propiedades físicas del soporte. Debido a la rápida evaporación del disolvente de la solución de centrifugación a medida que las fibras expulsadas se secan, se vuelve más fría que sus alrededores y el vapor de agua se condensa sobre ella. La centrifugación en condiciones de humedad produjo soportes en los que las células se contrajeron independientemente del tipo de células cultivadas sobre ellos o la presencia o ausencia de suero en el medio (Figura 2A). Aquí puede observarse que después de sólo unos pocos días en cultivo con células (fibroblastos, queratinocitos y co-cultivos de ambos), los soportes experimentaron modificaciones físicas obvias (contracción, pérdida de grosor y las fibras fusionadas entre sí para producir una morfología similar a una película porosa). Sin embargo, el secado al vacío de los soportes inmediatamente después de la centrifugación con el objetivo de eliminar completamente cualquier agua superficial produjo soportes que eran mucho más resistentes a la contracción de las células como se observa en la Figura 2B.

B. Liberación de ibuprofeno a partir de los soportes y degradación in vitro de soportes

45 La liberación del ibuprofeno a partir de los tres tipos de soporte (cada uno que contenía ibuprofeno al 10 %) se monitoreó mediante espectrometría UV/Visible. Para cada experimento, se cortó una pieza de soporte de 25 mg y se sumergió en 3 ml de agua pura. Esto correspondió a alrededor de 2.5 mg de ibuprofeno por muestra, que es equivalente a una concentración máxima calculada de 4.1 mM, 3.9 mM y 3.2 mM para el 50/50, 75/25 y la mezcla respectivamente. La liberación de ibuprofeno a partir de las muestras se monitoreó con espectroscopía UV/Visible a 222 nm (la λ_{max} de ibuprofeno) en varios puntos de tiempo y se comparó con los valores de la curva de calibración. Los perfiles de liberación para los tres soportes se muestran en la Figura 3 a y b.

50 Todos los soportes mostraron un comportamiento similar, con una liberación rápida inicial del fármaco durante las primeras 8 horas (como se muestra en una escala ampliada en la Figura 3b). Esta liberación rápida inicial de ibuprofeno se siguió después por una liberación sostenida durante los seis días siguientes (como se muestra en la Figura 3a), punto en el cual ninguno de los soportes había liberado totalmente el fármaco; de hecho, las concentraciones del fármaco en solución fueron alrededor de un orden de magnitud inferior a los valores calculados para la cantidad total del fármaco presente. En consecuencia los soportes parecen haber perdido aproximadamente una décima parte de su carga de ibuprofeno durante 7 días.

Cuanto mayor sea el porcentaje de glicólido con respecto a lactida en el copolímero, más rápida será la descomposición de los soportes tanto *in vivo* como *in vitro* (Blackwood y otros, Biomaterials. 2008; 29(21):3091-104). El soporte de 50/50 se descompuso muy rápidamente (dentro de una semana *in vitro*) en comparación con aquellos compuestos por 75 % de lactida y 25 % de glicólido que tomaron alrededor de 3 meses. Por lo tanto inicialmente el trabajo se centró en el soporte 50/50 como el mejor candidato para un apósito de liberación de ibuprofeno que se degradaría en el lecho de la herida. Sin embargo, la degradación hidrolítica de PLGA se cataliza por ácido y se consideró que la presencia de ibuprofeno (ácido) dentro del soporte podría tener un efecto sobre la velocidad de descomposición del soporte.

En consecuencia, se investigó el efecto de incluir ibuprofeno en los soportes sobre la degradación *in vitro* de los soportes con diferentes proporciones de glicólido (50/50, 75/25 y una mezcla 1:1 de 50/50 y 75/25). Además como se ha informado que el pH en heridas que no cicatrizan puede variar de ácido a básico (Dissemond y otros, Hautarzt. 2003 Oct;54(10):959-65), estas variaciones en el pH se imitaron *in vitro* en solución de Ringer a pH 6, 7.4 y 8.5. En la Figura 4 mostramos microfotografías ópticas de algunas de las fibras de soporte 75:25 en los tiempos 0, 1 y 6 días con y sin ibuprofeno. La Tabla 2 resume los datos de degradación de estos experimentos.

Para comenzar, todos los soportes tenían un aspecto similar (con fibras en el intervalo de 2-5 μm) lo mismo si los soportes contenían ibuprofeno o no (Figura 4). Sin embargo, para el día 6 los soportes que llevaban ibuprofeno habían perdido toda su integridad estructural. En contraste los soportes de PLGA (independientemente del contenido de glicólido) sin ibuprofeno mantenían apariencias similares a los observados en el día 0 (Figura 4 y Tabla 1).

Tabla 1. pH[†] de la solución de Ringers alrededor del soporte

	pH inicial	pH 6		pH 7.4		pH 8.5	
	ibuprofeno	-	+	-	+	-	+
Day 1	75:25	4.7	4.4	5.5	5.0	5.0	5.6
	50:50	4.4	4.4	5.0	4.5	4.4	5.6
	mezcla	4.1	3.2	5.0	5.3	4.7	5.6
Día 6	75:25	3.6	2.6	4.1	3.5	3.5	4.7
	50:50	4.1	4.1	4.4	3.5	4.1	4.7
	mezcla	3.5	2.6	3.4	4.4	2.9	4.7

†soportes (con o sin ibuprofeno; 50:50, 75:25, y la mezcla) se cortaron en discos de 18 mm de diámetro mediante el uso de un perforador de tejido. Los soportes se sumergieron en 1 ml de solución de Ringer con antibióticos (1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anfotericina B, 200 IU/ml penicilina y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomicina) y se incubaron a 37 °C. El pH de la solución alrededor del soporte se monitoreó los días 0 (pH inicial)-no mostrado y los días 1 y 6.

Esta degradación fue independiente, además, del pH inicial de la solución de Ringer que no cambió significativamente del pH de 4-5 observado en la solución de Ringer alrededor del soporte en el día 1. Esto no cambió significativamente durante los 6 días del experimento (Tabla 2).

Como se resume en la Tabla 2 el contenido de glicólido fue un factor clave en la aceleración de la velocidad de degradación de las fibras. El soporte de PLGA 50/50 tuvo la mayor velocidad de degradación con ibuprofeno presente, de hecho en el día uno la estructura física del soporte 50/50 con ibuprofeno mostró cierta fusión de las fibras (como se muestra en la Figura 4C y se resume en la Tabla 2).

Tabla 2 Efecto del ibuprofeno y del pH en la degradación *in vitro* de los soportes de PLGA

		Extensión visible de la degradación					
		Soportes Control			+ soportes de ibuprofeno		
Día	Polímero	pH 6	pH 7.4	pH 8.5	pH 6	pH 7.4	pH 8.5
0	50:50	0	0	0	0	0	0
	75:25	0	0	0	0	0	0
	1:1 de anteriormente	0	0	0	0	0	0
1	50:50	0	0	0	+	+	+
	75:25	0	0	0	+	+	+
	1:1 de anteriormente	0	0	0	+	+	+
6	50:50	0	0	0	++	++	++
	75:25	0	0	0	++	++	++
	1:1 de anteriormente	0	0	0	++	++	++
La degradación visible se clasificó como ninguna = 0, alguna + o extensa ++							

2. Respuesta de la célula a los soportes

A. Respuestas citotóxica y anti-inflamatoria de las células al ibuprofeno

Inicialmente fue necesario determinar qué concentraciones de ibuprofeno serían anti-inflamatorias sin ser citotóxicas para las células. En consecuencia, tanto la sal sódica de ibuprofeno como una mezcla de isómeros de ibuprofeno (forma ácida) se ensayaron para determinar sus efectos sobre la viabilidad de los fibroblastos (los resultados se resumen en la Tabla 3). Ambas formas de ibuprofeno se desempeñaron de manera similar, donde las células toleraron concentraciones de ibuprofeno hasta 10^{-3} M ($p < 0.05$), pero mostraron una respuesta citotóxica a concentraciones de 10^{-2} M. Para estudios futuros las concentraciones de ibuprofeno investigadas no excedieron 10^{-3} M.

Tabla 3. Efecto de Nalbu y una mezcla de isómeros de ibuprofeno sobre la viabilidad de HDF (Ensayo MTT-ESTA)

El efecto de una exposición de 24 h a ibuprofeno sobre la viabilidad de fibroblastos humanos se evaluó mediante el uso del ensayo MTT-ESTA. Los resultados mostrados son la media +- SEM de tres pocillos. Los valores que difieren de los controles se indican como * $p < 0.05$						
Tratamiento	Sal sódica de ibuprofeno			Mezcla de isómeros de ibuprofeno		
	%Viabilidad	SEM	valor p	%Viabilidad	SEM	valor p
control	100	16.43		100	16.43	
10^{-6}	102.17	17.71		109.43	15.53	
10^{-5}	100.43	18.55		111.80	13.19	
10^{-4}	98.21	14.04		108.56	15.71	
10^{-3}	90.33	11.70		101.11	18.30	
10^{-2}	38.25	5.79	$p < 0.05$	7.20	2.47	$p < 0.05$

Seguidamente, examinamos los efectos del ibuprofeno sobre la activación de NF- κ B inducida por LPS y TNF en fibroblastos (Figuras 5 y 6). Las concentraciones de ibuprofeno de 10^{-4} y 10^{-3} M - tanto la sal de ibuprofeno como la mezcla de isómeros de ibuprofeno -fueron capaces de reducir significativamente la respuesta a LPS y TNF- α como se ilustra en la Figura 5 y los datos cuantitativos se muestran en la Figura 6. En estos experimentos LPS y TNF- α produjeron un 80 % de activación del NF- κ B.

B. Respuestas citotóxica y anti-inflamatoria de las células a los soportes con ibuprofeno.

La siguiente etapa de experimentación fue colocar soportes de PLLA-PGA tanto no cargados como cargados con ibuprofeno encima de cultivos de fibroblastos en soportes 3D. Después se investigó el efecto de los soportes de PLGA sobre la viabilidad celular y sobre la respuesta de las células a una estimulación pro-inflamatoria. Los soportes cargados se examinaron de dos maneras. Algunos se dejaron sin lavar deliberadamente de manera que se obtendría cualquier liberación abrupta inicial de ibuprofeno en estos experimentos. Otros se lavaron vigorosamente en EtOH al 70 % y después se lavaron tres veces en PBS para eliminar cualquier ibuprofeno débilmente unido.

No hubo un efecto significativo de los soportes lavados y sin lavar sobre la viabilidad de las monocapas de fibroblastos colocadas bajo estos soportes independientemente de si los soportes se cargaron con 10 % de ibuprofeno o no.

Cualquier liberación abrupta inicial de ibuprofeno a partir de los soportes no parece ser lo suficientemente alta como para afectar negativamente la viabilidad celular adyacente en un grado significativo. Los cálculos de la liberación máxima de ibuprofeno hacia el ml uno de los medios durante 24 horas dieron un máximo teórico de 0.4 mM (como se deriva de la Sección 2 anterior suponiendo aproximadamente un 10 % de liberación del 10 % de ibuprofeno cargado en los soportes).

Con respecto a los efectos anti-inflamatorios del ibuprofeno la incubación de las monocapas 2D de fibroblastos con los soportes que contenían ibuprofeno redujo significativamente la translocación de NF- κ B estimulada por LPS en todos los casos ($p < 0.05$) (Figura 7). La inhibición observada con los tres soportes diferentes no fue diferente significativamente, y comparable a la observada cuando las células se incubaron con una mezcla de isómeros de ibuprofeno a 10^{-4} M como se muestra en la Figura 6. Por lo tanto parece que el 10 % de ibuprofeno cargado en soportes se liberó a partir de los soportes en concentraciones apropiadas para inhibir la señalización inflamatoria en los fibroblastos.

Se examinó el efecto de los soportes que contienen ibuprofeno sobre células cultivadas en 3D. En la Figura 8 se muestran imágenes ilustrativas de la apariencia de estas células en 3D. Si bien es técnicamente difícil estimar la activación de NF- κ B mediante el uso de la translocación de p65 en 3D, pudieron notarse dos puntos de este estudio. En primer lugar hubo una menor activación de las células con LPS en 3D que en 2D (como se ha informado por este y otros laboratorios) las células frecuentemente hacen frente mejor a los insultos cuando están en 3D en lugar de 2D (Sun y otros, J Mater Sci Mater Med. 2004;15(7): 743-9) y en segundo lugar los soportes con 10 % de ibuprofeno fueron capaces de reducir la activación de NF- κ B por LPS en estas células en 3D.

C. Capacidad de soportes cargados de ibuprofeno para soportar la unión y la proliferación de células

Finalmente una comparación de la unión y la proliferación de fibroblastos sobre los soportes mostró que los fibroblastos se unieron y proliferaron sobre los soportes cargados con 1,2 y 5 % en peso de ibuprofeno, así como sobre soportes no cargados (Figura 9a). Sin embargo la carga de los soportes con 10 % de ibuprofeno sí redujo la unión celular inicial, pero esto pudo restaurarse parcialmente (ver la Figura 9a) o totalmente (ver la Figura 9b) a niveles controles mediante el lavado de los soportes durante 24 horas (en consonancia con los soportes que liberan algo de su ibuprofeno).

Esto muestra que las fibras cargadas con ibuprofeno siguen siendo capaces de proporcionar un sustrato para que estas células se unan y migren sobre él y se confirma por los resultados que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de los soportes cargados con ibuprofeno en la viabilidad de los fibroblastos en cultivos 3D

	Tratamiento del soporte	Composición del soporte	% viabilidad normalizado
Soportes control sin carga	Lavado	Mezcla	94.0±1.1
		75/25	94.4±4.5
		50/50	73.8±7.2
	No lavado	Mezcla	74.8±7.0
		75/25	70.6±9.2
		50/50	74.2±11.9
Soportes cargados de ibuprofeno	Lavado	mezcla	108.5±4.5
		75/25	112.4±0.2
		50/50	82.1±11.3
	No lavado	Mezcla	85.5±10.4
		75/25	98.5±7.2
		50/50	101.1±7.2

Los fibroblastos se cultivaron en cultivos en 3D (por triplicado) y los efectos de los soportes cargados o no cargados con ibuprofeno se examinaron en estos cultivos durante 24 horas al evaluar la viabilidad celular por el ensayo MTT ESTA. Los resultados mostrados son la media $\pm$ SEM de triplicados de la viabilidad celular con relación a los cultivos controles no expuestos a los soportes.

Las composiciones de los soportes fueron copolímeros de poli(D,L-lactida-co-glicólido) (PLGA) se electrocentrifugaron para producir los soportes con diferentes proporciones de lactida con respecto al glicólido [75:25 (Mw 66-107k), 50:50 (Mw 40-75k) y una mezcla 1:1 de estos dos.

Los tratamientos de los soportes fueron los siguientes. Todos los soportes con o sin ibuprofeno se esterilizaron inicialmente mediante el uso de EtOH al 70 %. Los soportes se lavaron después en medio de células durante unos pocos segundos antes de colocarlos sobre los cultivos en 3D. Para los soportes con ibuprofeno referidos como soportes lavados, éstos se lavaron en PBS durante 1 hora para permitir cualquier liberación inicial de ibuprofeno y después se lavaron brevemente en medio de células durante unos pocos segundos antes de colocarlos sobre los soportes en 3D que contenían fibroblastos.

3. Soportes cargados de aspirina

A. Resultados

La concentración total de aspirina en la muestra de 10 mg de soporte (en 3 ml de agua) fue de 1.68 mM y tras una semana sólo el 37 % de esta se había liberado. Al igual que con los soportes cargados de ibuprofeno, hubo una liberación inicial rápida en las primeras 8 horas más o menos, seguida de una liberación más sostenida y gradual durante los siguientes 7 días.

B. Discusión

El perfil de liberación de la aspirina a partir de los soportes fibrosos de PLGA fue muy similar al observado para los soportes cargados de ibuprofeno, con una liberación rápida inicial durante las primeras 8 horas. Después de la liberación abrupta inicial, se observa una liberación más sostenida ya que las fibras comienzan a degradarse pero en cada caso los soportes

sólo habían liberado un porcentaje (aproximadamente el 10 % para el ibuprofeno y el 37 % para la aspirina) después de 7 días sumergidos en agua, como se ilustra en la Figura 10.

Reivindicaciones

- 5 1. Un soporte electrocentrifugado, que comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde:
 - a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y
 - b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico.
- 10 2. Un soporte electrocentrifugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polímero es ácido polilactato o ácido poliglicólico.
- 15 3. Un soporte electrocentrifugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho NSAID es [ácido 2-(4-isobutilfenil)propiónico].
- 20 4. Un soporte electrocentrifugado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho copolímero es un copolímero de ácido polilactato y ácido poliglicólico.
- 25 5. Un soporte electrocentrifugado de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho copolímero es un poli(D,L-láctico-co-glicólida), y opcionalmente en donde dicho poli(D,L-láctico-co-glicólida) tiene una relación de 75:25 lactida a glicólida o dicho poli(D,L-láctico a co-glicólida) tiene una relación de 50:50 lactida a glicólida.
- 30 6. Un soporte electrocentrifugado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho soporte comprende de aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 % en peso de NSAID, de aproximadamente 10 % a 20 % en peso de NSAID, o aproximadamente 10 % en peso de NSAID.
- 35 7. Un apósito para heridas que comprende el soporte electrocentrifugado of cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. Un soporte electrocentrifugado, dicho soporte que comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), para usar como un medicamento, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde:
 - a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y
 - b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico.
- 45 9. Un soporte electrocentrifugado, dicho soporte que comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) para usar en el tratamiento de una herida, preferentemente una herida crónica o una herida aguda, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde:
 - a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y
 - b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico.
- 50 10. Un soporte electrocentrifugado que comprende un polímero o copolímero biodegradable y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), para usar en el tratamiento del dolor o inflamación, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, en donde:
 - a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y
 - b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico.
- 55 11. Un método para producir un soporte electrocentrifugado para usar en curación de heridas que comprende:

i) disolver un polímero o copolímero y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) en un solvente común, en donde dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero y

5

a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y

b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico; y

ii) electrocentrifugar la solución resultante de la Etapa i).

10

12. Un soporte electrocentrifugado producido de acuerdo con el método de la reivindicación 11.

15

13. Uso de un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) para catalizar la degradación de un soporte electrocentrifugado que comprende un polímero o co-polímero, en donde dicho polímero o copolímero y dicho NSAID son capaces de disolverse cada uno en un disolvente común y dicho NSAID es capaz de catalizar la degradación del polímero o copolímero, y en donde

a) dicho polímero biodegradable es un colágeno, un poli alfa éster, un poliortoéster o un polianhídrido o un copolímero de estos, y

20

b) dicho NSAID es ácido acetilsalicílico o un NSAID propiónico, opcionalmente en donde dicho NSAID es electrocentrifugado junto con dicho polímero o copolímero.

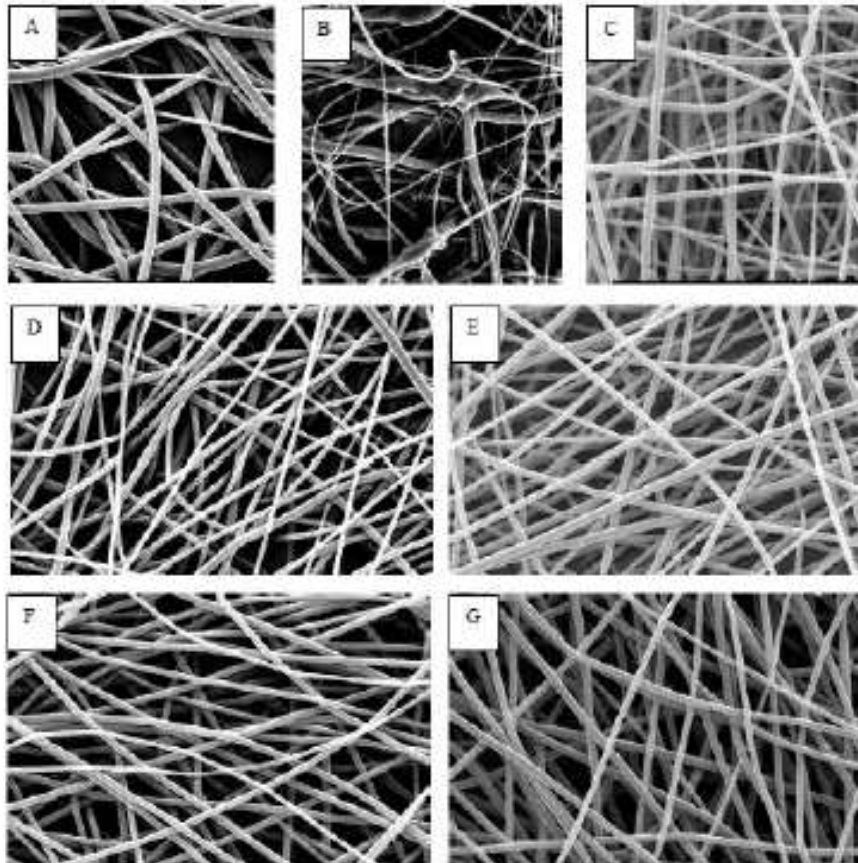


Fig. 1.

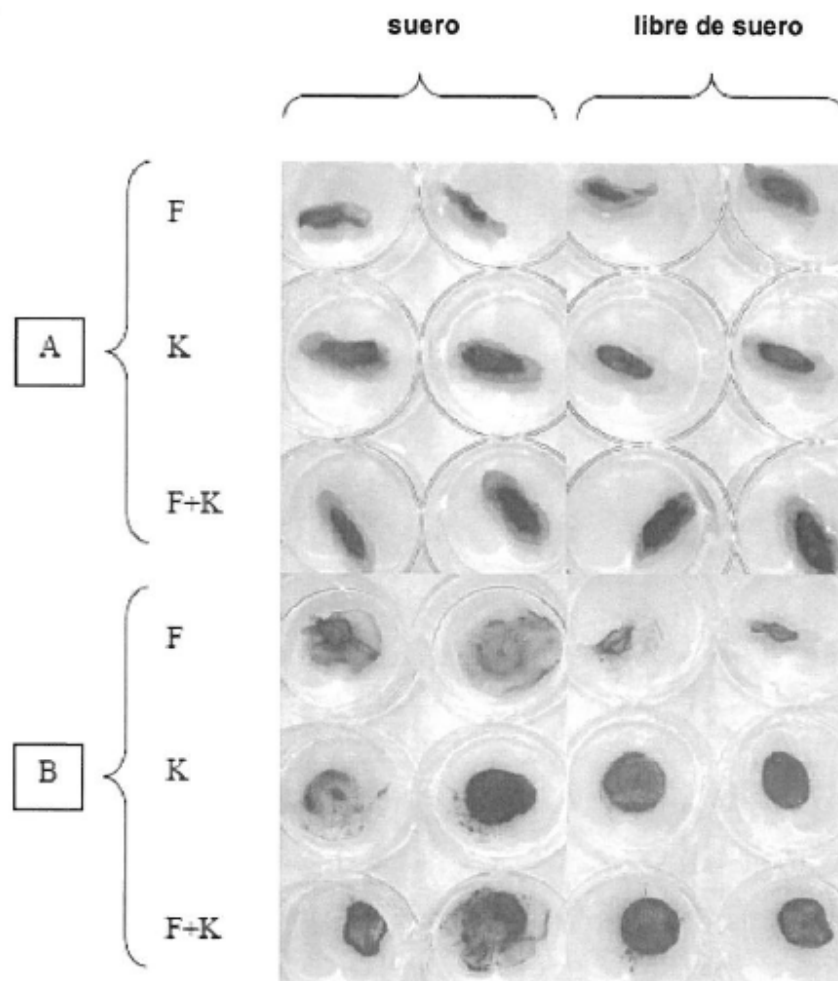


Fig. 2.

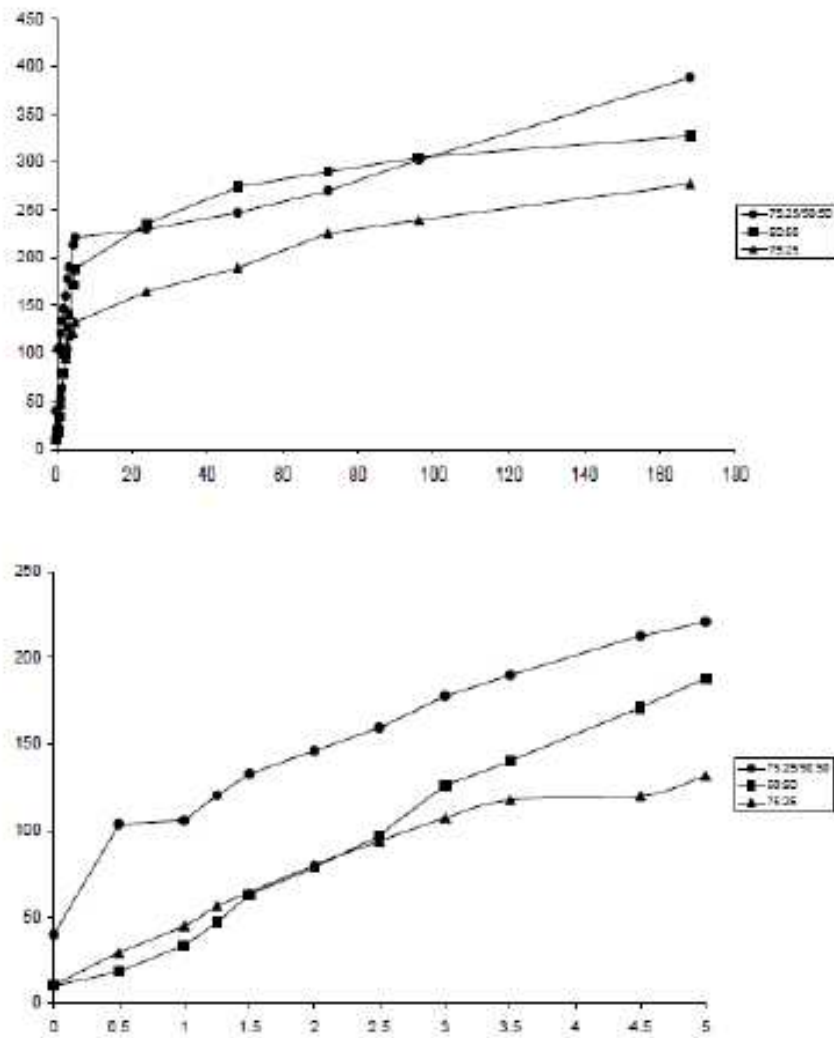


Fig. 3.

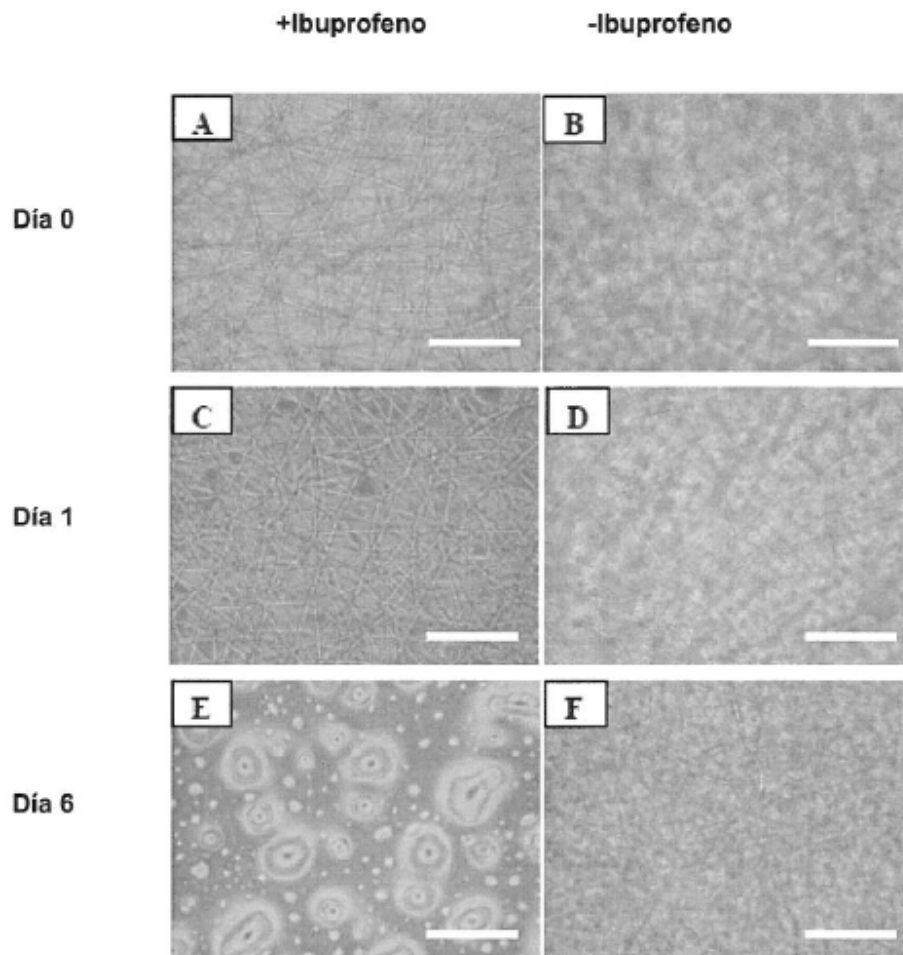


Fig. 4

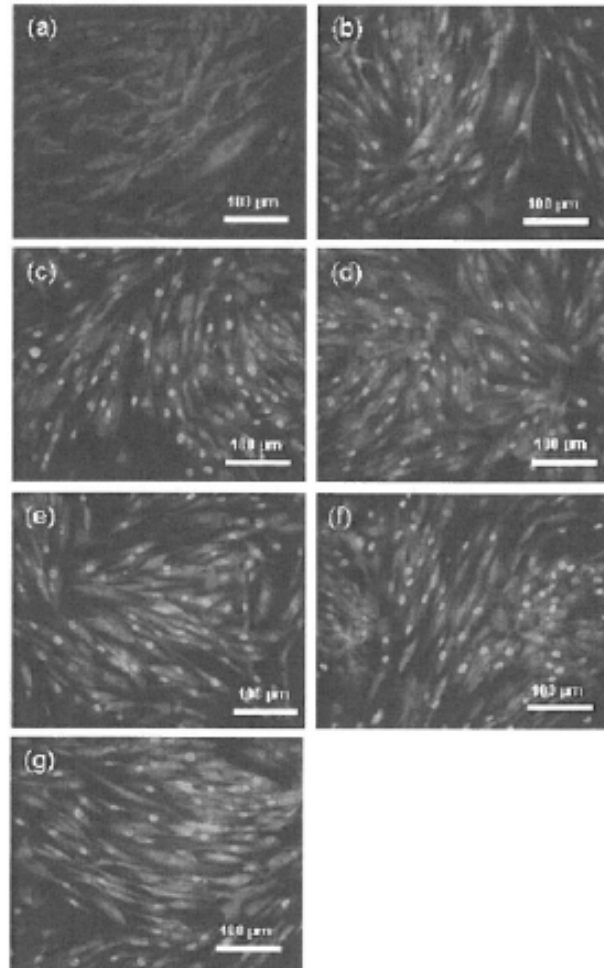


Fig. 5

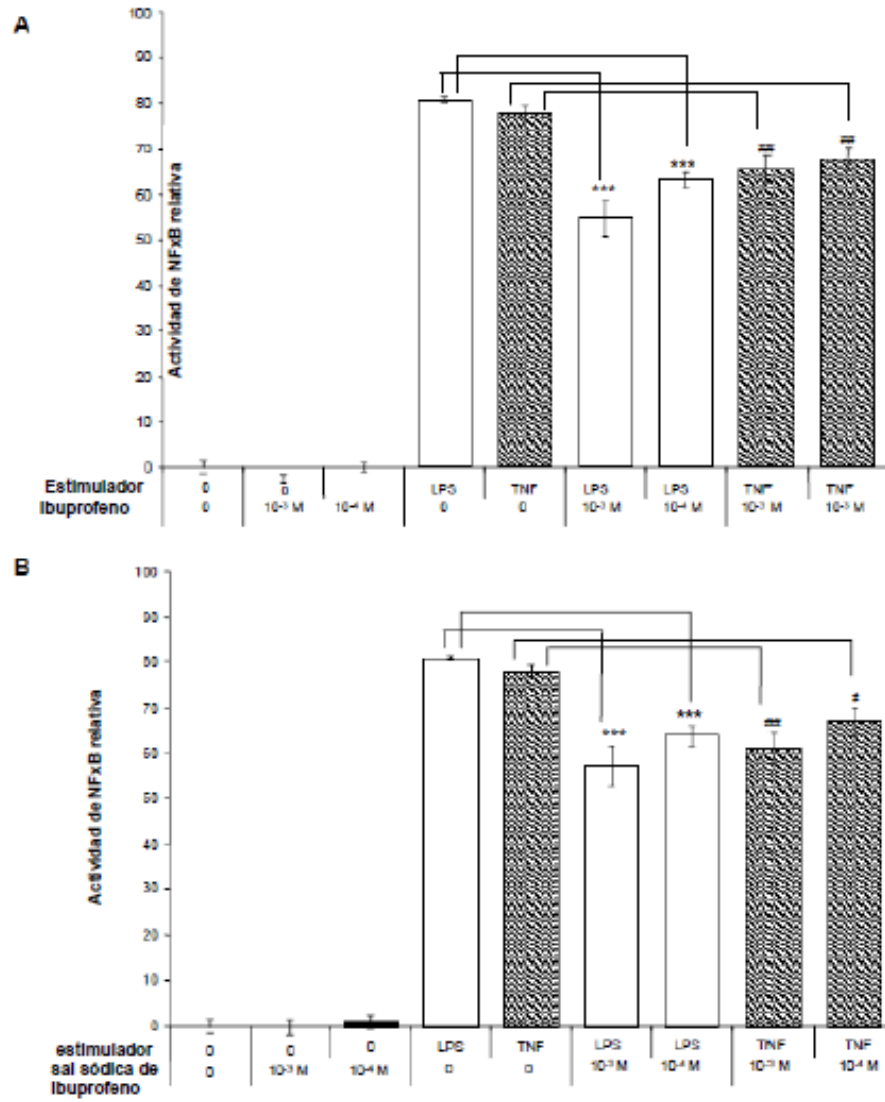


Fig. 6

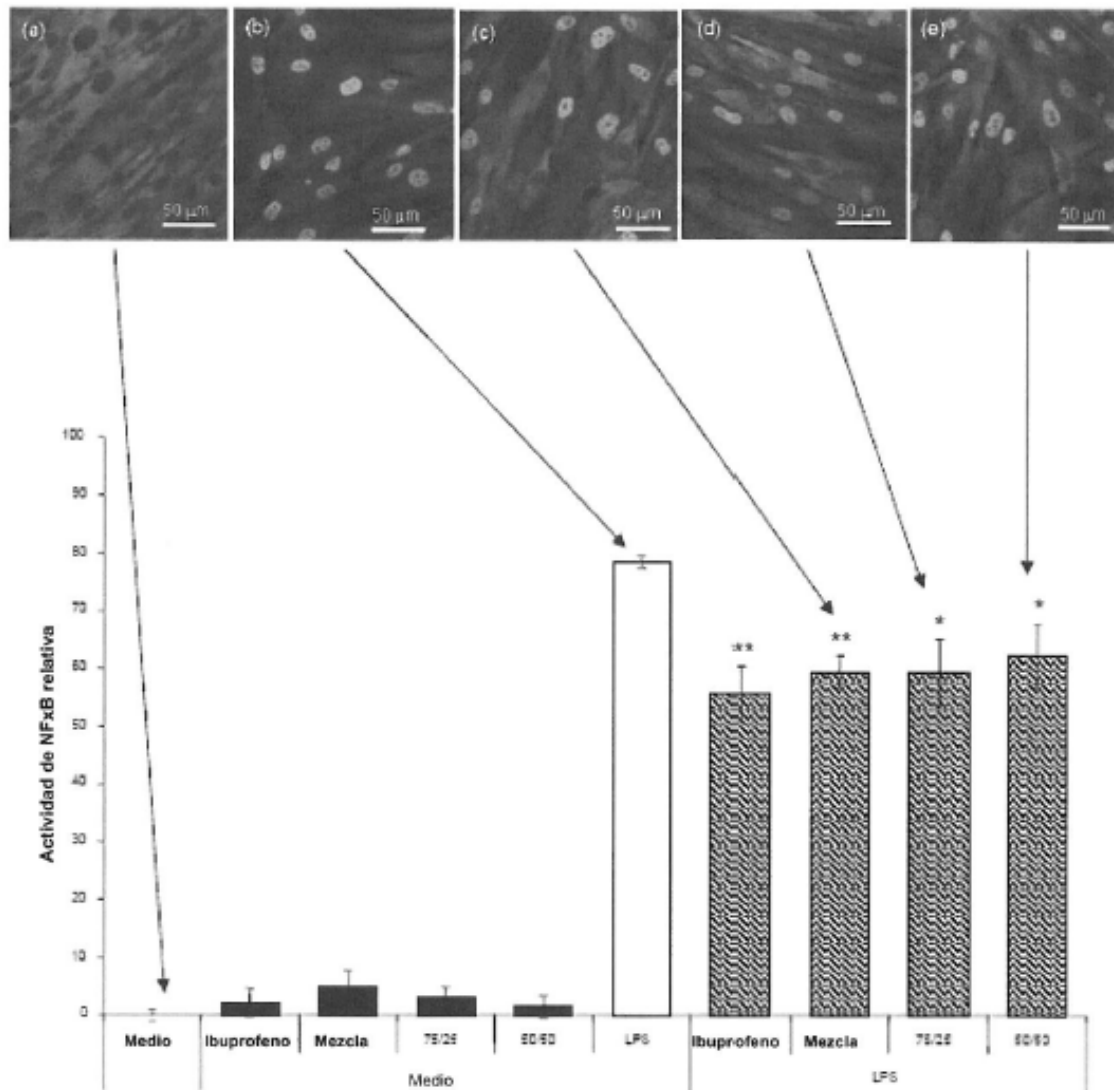


Fig. 7.

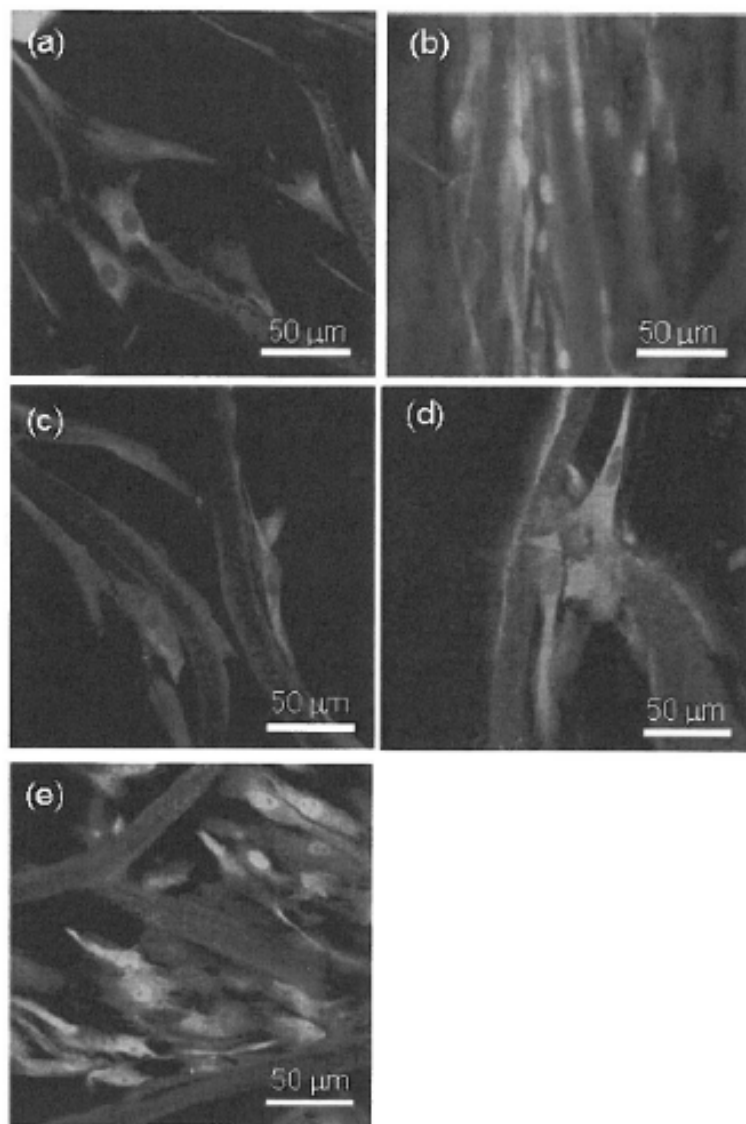


Fig. 8.

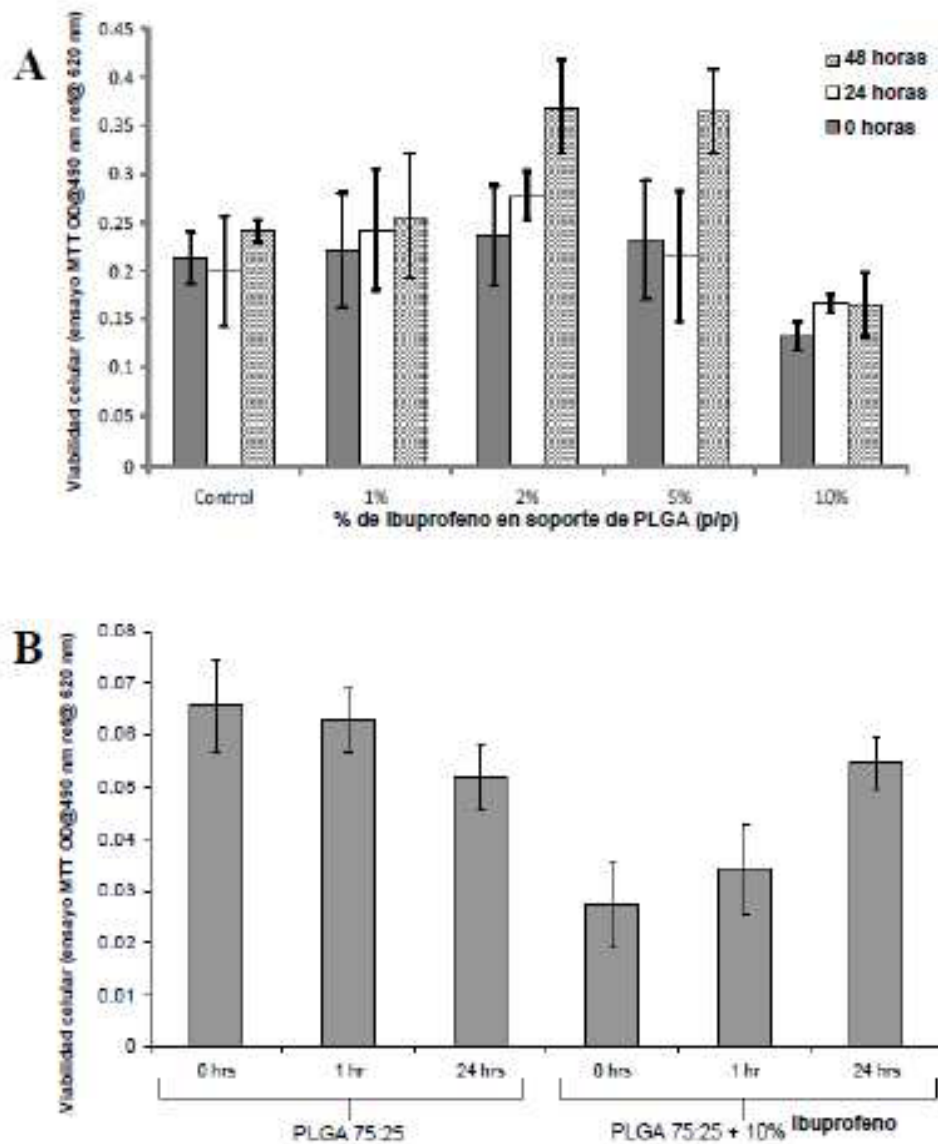


Fig. 9.

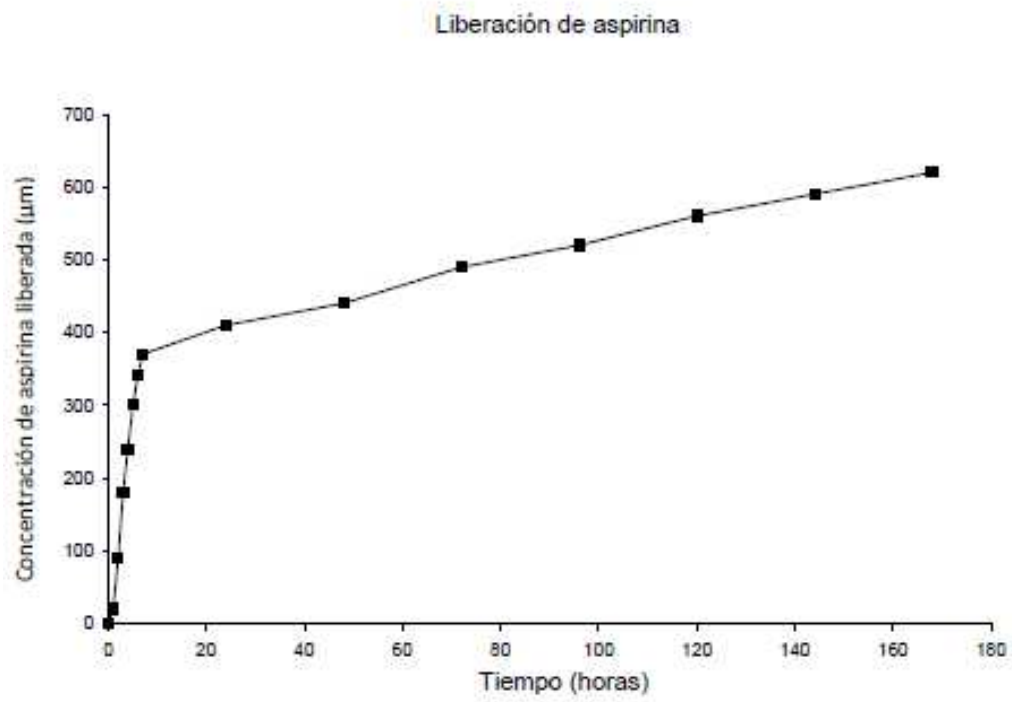


Figura 10