

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 145**

51 Int. Cl.:

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2008 PCT/EP2008/010978**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009 WO09083203**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2008 E 08866728 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2222327**

54 Título: **Aplicación tópica y formulación de eritropoyetina para cicatrizar heridas cutáneas**

30 Prioridad:

28.12.2007 EP 07025167

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

18.07.2017

73 Titular/es:

**BADER, AUGUSTINUS (100.0%)
Krankenhausstrasse 7
04668 Parthenstein / OT Klinga, DE**

72 Inventor/es:

BADER, AUGUSTINUS

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 625 145 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

Aplicación tópica y formulación de eritropoyetina para cicatrizar heridas cutáneas

5 Campo técnico de la invención

La invención se refiere al uso de eritropoyetina (EPO), en particular EPO en una preparación farmacéutica que estabiliza el compuesto activo, para el tratamiento tópico de piel traumatizada, en particular para cicatrizar heridas en el caso de lesiones mecánicas o patológicas o en el caso de quemaduras. En particular, la invención se refiere al uso de EPO en una forma estabilizada de acuerdo con la invención basada en polímeros hidrófilos para la estimulación o diferenciación y el crecimiento de ciertos tipos de células, por ejemplo, células precursoras específicas de tejido que no son células precursoras vasculares, o de células adultas específicas de tejido que no son células endoteliales, las cuales se encuentran en cada caso, en la región de la herida inmediata en el caso de lesiones cutáneas de este tipo.

En particular, la invención también se refiere a formulaciones viscosas o gelatinosas específicas basadas en polisacáridos, en particular derivados de celulosa, que comprenden EPO y que son capaces de estabilizar a la última y liberarla de manera lenta y uniforme a la herida.

20 Antecedentes técnicos de la invención

La eritropoyetina (EPO) es una hormona glicoproteica que controla la formación de eritrocitos a partir de células precursoras en la médula ósea (eritropoyesis). La EPO se une aquí a su receptor (EPO-R), que se expresa en todas las células hematopoyéticas.

En adultos, la eritropoyetina se forma principalmente en el riñón, de forma más precisa en las células endoteliales de los capilares peritubulares. También se sintetizan cantidades relativamente pequeñas en las células hepáticas (hepatocitos).

Por lo tanto, la acción principal de la EPO consiste en aumentar el número de glóbulos rojos en la sangre, lo que da como resultado un aumento de la absorción de oxígeno.

En los últimos años, diversos autores han informado que la EPO también ejerce una acción no hematopoyética y que la EPO-R se expresa de manera correspondiente por ciertas células no hematopoyéticas. Por lo tanto, se informa de la estimulación por EPO de células nerviosas, células neuronales del cerebro y células endoteliales, en algunos casos junto con la expresión directa del receptor de EPO hematopoyético. En otros casos, se pronostica la presencia de un receptor no hematopoyético adicional, pero esto aún no se ha demostrado.

En particular, se concede una importancia creciente a la acción no hematopoyética de la eritropoyetina (EPO), que no se ha conocido durante mucho tiempo, en relación, por ejemplo, con la formación y regeneración estimulada de células endoteliales y tisulares, tales como tejido conectivo, tejido muscular, tejido epitelial y tejido nervioso.

Por lo tanto, el documento WO 2004/001023 describe, entre otros, el uso de EPO y TPO para estimular la neovascularización y la regeneración de tejidos y para mejorar la cicatrización de heridas, por ejemplo, después de operaciones o lesiones.

El documento WO 2005/063965 enseña el uso de EPO para la regeneración dirigida, estructuralmente controlada, de tejido traumatizado, en la que no solo se estimula el crecimiento de células endoteliales, sino que también se estimula la regeneración parenquimatosa y la formación de estructuras de la pared, lo que significa que el crecimiento tridimensional coordinado se produce para la construcción de un tejido, órgano o partes del mismo en funcionamiento.

Haroon *et al.* (American J. Pathol. 2003, 163, 993) discuten el nuevo papel de la EPO en el contexto de los procesos de cicatrización de heridas inducidos por fibrina.

En un artículo de revisión, Brines y Cerami (Kidney International, 2006) discuten el papel de la EPO en la protección del tejido.

Por lo tanto, parece que la eritropoyetina, y los derivados de EPO, o también miméticos de EPO, son altamente adecuados para su uso sistémico para el inicio y el control de manera específica, de la neoformación y regeneración del tejido afectado en el caso de lesiones de la piel, la membrana mucosa, en el caso de piel abierta y heridas en la piel o también en el caso de irritación cutánea causada por quemaduras o escaldaduras, y por último es capaz de estimular y acelerar la cicatrización.

El documento WO 2005/070450 y documentos adicionales de los inventores en cuestión, describen el uso de EPO en la regeneración de vasos y tejido con una dosis semanal inferior a 90 IU/kg de peso corporal (= BW), incluyendo

el área del cuidado de la herida. Aunque en el presente documento se menciona de manera teórica la posible aplicación tópica, sin embargo, se ha encontrado que es preferente la aplicación sistémica.

5 Por lo tanto, se postula la administración de EPO en el caso de aplicación sistémica en una dosis semanal subpolitémica inferior a 90 IU (unidades internacionales) / kg de peso corporal (BW) en lugar de 150 - 300 IU / kg de BW, como era habitual hasta la fecha para las aplicaciones conocidas de EPO. Por lo tanto, el objeto es conseguir menos estimulación de la formación de sangre en la región de la médula ósea, pero, de acuerdo con las enseñanzas más recientes, como se resalta, que permita la activación de los precursores de células endoteliales en la región sanguínea. La activación de las células precursoras de células endoteliales en la sangre, y además en el
10 tejido, y el desarrollo de células endoteliales, las cuales forman la capa de células más interna de los vasos sanguíneos, se han relacionado con una mejora de la vascularización, y se supone que la regeneración de tejido también se facilita de la misma forma. Al mismo tiempo, esto se ha confirmado en ensayos clínicos en el caso de heridas por quemaduras.

15 Aunque algunos de dichos documentos mencionan la aplicación tópica de EPO para la regeneración de tejido, la aplicación sistémica del compuesto activo se coloca, sin embargo, claramente el primer lugar sobre la base de los resultados encontrados que el efecto de EPO no hematopoyética se puede atribuir principalmente, en la opinión de documentos más recientes, a estimulación recién descubierta de las correspondientes células precursoras endoteliales, vasculares o positivas para CD31, que circulan principalmente con el torrente sanguíneo, y solamente
20 de manera secundaria al crecimiento de estructuras de tejido parenquimatoso estimuladas de esta forma.

Sin embargo, el uso de EPO en una aplicación sistémica para protección de tejido o regeneración de tejido, se asocia con riesgos significativos debido al potencial de los efectos secundarios en relación con los efectos hematopoyéticos.

25 En la aplicación tópica de EPO, de acuerdo con la opinión de las enseñanzas hasta la fecha, simplemente la inadecuada distribución y accesibilidad de dichas células que ocurren de manera sistemática o las células precursoras mediante EPO significa que solo se podría observar un efecto insatisfactorio, o ninguno, en la regeneración tisular.

30 En el caso de la regeneración de tejidos después de, por ejemplo, traumatismo por quemaduras o escaldado o también en el caso de heridas isquémicas, es necesario conseguir un rápido cierre de los defectos. Esto solo se puede producir si también se estimula lo más rápidamente posible la formación de los componentes parenquimatosos de la piel. El estímulo desplazado en el tiempo de un componente (CD31) con el fin de facilitar a continuación la formación de otro componente (parénquima), corresponde a la enseñanza de los autores del documento WO 2005/070450 y publicaciones adicionales.

Aunque la formación de una red vascular puede tener una acción de soporte indirecta, no representa, como tal, un resultado final, ya que falta el parénquima y en ciertas circunstancias solo se puede formar de manera secundaria y
40 con ello con un retardo de tiempo.

Por lo tanto, la formación de células vasculares se debe coordinar de manera simultánea con la formación de tejido localizado. En este caso, de acuerdo con las enseñanzas convencionales, se produce un dilema, ya que las dosis administradas por vía subcutánea o por vía intravenosa son células progenitoras de células endoteliales diana
45 debido a un principio de distribución sistémica, y las dosis subpolitémicas se deben administrar adicionalmente para limitar los efectos secundarios. En este caso, la administración de EPO solo se puede combinar, por lo tanto, con dificultad con una farmacocinética localizada limitada de manera local a la región traumática de la piel.

De acuerdo con las enseñanzas convencionales, se deben seleccionar por lo tanto vías de estimulación conceptuales, en las que se deben administrar cualquiera de las dosis subpolitémicas o mediante inyecciones repetidas o también son necesarios cambios en el periodo del valor medio de la sustancia precursora.

En cada caso, sin embargo, la EPO llegará al sitio real de necesidad a través del torrente sanguíneo distribuida de manera sistémica en el cuerpo e incluso más diluida.

55 Además, en el caso de heridas se producen procesos que hacen más difícil la aplicación tópica de EPO: la cicatrización de heridas de, por ejemplo, piel o membrana mucosa dañadas normalmente se desarrolla en tres fases: la fase de inflamación, la fase de proliferación y la fase de restauración / remodelación. En el caso de una herida o lesión cutánea recién producida que se debe cuidar, se producen procesos inflamatorios dentro de las primeras 24
60 horas, que incluyen, en particular, la inmigración de diversos factores de inflamación (tales como, por ejemplo, fibronectina) y de células de diversos tipos, tales como, por ejemplo, monocitos, fagocitos, células polimórficas y macrófagos, y por último dan como resultado la formación de una matriz de fibrina y células endoteliales vasculares. La secreción de la herida formada en el proceso comprende, entre otros, una serie de enzimas proteolíticas, así como bacterias que han entrado en la herida y comprenden sustancias que actúan en este sentido.

65 Las enzimas proteolíticas, algunas de las cuales son altamente activas, son la razón por la que los medicamentos

que contienen proteínas o péptidos, tales como EPO, que se han aplicado a la herida y estimulan la cicatrización de heridas, son a menudo de poca o ninguna eficacia, ya que la proteína o polipéptido en cuestión, debido a su naturaleza química y biológica, se desactiva, escinde y degrada por dichas enzimas antes de que sea capaz de desarrollar una eficacia farmacológica adecuada. El problema se agrava adicionalmente por la infección de la herida con bacterias o con la entrada de desechos celulares.

No por ello menos importante, las proteínas farmacéuticas se aplican por lo general de manera sistémica, lo que permite ampliar de forma significativa su periodo de valor medio y también permite que se transporten más rápidamente a los sitios en el cuerpo en los que van a desarrollar su eficacia terapéutica. Sin embargo, en este método de aplicación, las dosis del compuesto activo que contiene la proteína deben ser suficientemente elevadas con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado, que a menudo produce inevitablemente reacciones secundarias no deseadas.

En el caso del tratamiento terapéutico de lesiones cutáneas, la aplicación sistémica de un compuesto activo, además, en principio, parece menos apropiada, ya que la acción de cicatrización del medicamento en realidad solo es necesaria localmente. Por lo tanto, existe un problema general si se van a emplear compuestos activos que contienen proteínas para el tratamiento de lesiones cutáneas y heridas abiertas de carne y piel.

El uso de proteínas o medicamentos en forma tópica, tal como, por ejemplo, EPO, que, incluso en plasma, tiene un periodo de valor medio solo de 48 horas, para el tratamiento de lesiones cutáneas de este tipo, como puede ocurrir en el caso de traumatismo mecánico violento e irritación, y en el caso de quemaduras y escaldaduras, sería, sin embargo, muy deseable a pesar de las dificultades conocidas.

Por lo tanto, el objeto es proporcionar EPO o sus derivados bioequivalentes, fragmentos, miméticos y similares, para la cicatrización de heridas cutáneas en forma de una aplicación tópica, sin, por una parte, como se acaba de describir, pérdidas de acción radicales que se producen debido a la proteólisis de EPO debido a procesos enzimáticos o de otro tipo en la herida, pero, por otra parte, como también se ha explicado del mismo modo con detalle anteriormente, posiblemente facilitando la estimulación de las células o de las células precursoras que son capaces de la cicatrización de heridas en la región de la herida inmediata y si fuera posible, también en las capas de tejido más profundas en las cercanías de la herida con EPO aplicada por vía tópica, que por último debería dar como resultado un cierre más rápido de la herida y hace que la aplicación tópica de EPO parezca sensata por primera vez y proporciona una ventaja significativa con respecto a la administración sistémica.

Un objetivo adicional de la invención es crear una forma de administración que no tenga que tener en cuenta los riesgos y las limitaciones de una dosificación sistémica, en particular subpolitémica, de EPO, y al mismo tiempo pueda actuar de manera específica sobre las células relevantes de tejido reales sin excluir al mismo tiempo las células endoteliales adultas localizadas.

Resumen de la invención

De manera sorprendente, en la actualidad se ha encontrado que en la aplicación tópica, preferentemente en una formulación adecuada que estabiliza el compuesto activo y lo libera de manera uniforme, la EPO es eficaz en el caso de heridas o de daño inducido de forma patológica a la piel. Esta eficacia, como también se muestra en particular, mediante estudios histológicos, no se puede atribuir a la activación pronosticada conocida de las células endoteliales y de otras células precursoras que circulan en la sangre y se puede transportar a la herida. Esto podría no ser suficiente para el efecto deseado, pero en su lugar aparentemente se basa en la estimulación de células inducidas por EPO que se han acumulado de forma local, es decir, en la región inmediata a la herida o en las proximidades extendidas de la herida, en las que, de manera sorprendente, las células en el tejido cutáneo que contribuyen de manera funcional a la cicatrización de heridas son predominantemente parenquimatosas, es decir, no son células vasculares ni células precursoras de las mismas y predominantemente tampoco son células endoteliales ni células precursoras de las mismas que se sitúan en el tejido de la herida.

En general, se ha encontrado que, en particular, las células en la región de la herida que no portan ni expresan el marcador de superficie celular endotelial CD31, o solamente lo hacen de hasta cierto punto, se estimulan para la diferenciación y el crecimiento directamente y de manera local mediante EPO aplicada por vía tópica.

Normalmente CD31 se encuentra en las células endoteliales o en las células vasculares, plaquetas, macrófagos, granulocitos, linfocitos T, linfocitos NK, linfocitos y fibroblastos. Las células que expresan CD31 se consideran como factores de neoangiogénesis. En tejidos, los vasos son estructuras que se desplazan a través del tejido como ríos, pero en modo alguno representan al propio tejido. Estas células vasculares y células precursoras de las mismas tienen marcadores de superficie, tales como CD31, que permiten que éstas se diferencien y se delimiten de manera precisa de otros tipos de células. Los componentes parenquimatosos de la piel son células de tipo CD31 negativas, tales como queratinocitos, células del folículo piloso y células dérmicas, tales como células de tejido conectivo. Las células CD31 negativas, en particular los queratinocitos, las células del folículo piloso y las células del tejido conectivo, o las células que solamente expresan CD31 hasta cierto punto, se estimulan por lo tanto preferentemente de manera directa y de manera local mediante EPO aplicada de manera local. Este efecto de acción adicional es

nuevo y se diferencia tanto del efecto conocido de la EPO hematopoyética, como también del mecanismo no hematopoyético, que recientemente se descubrió y se demostró de manera sistémica (véase anteriormente).

5 Se debería hacer énfasis en este sentido a que, en particular, la aplicación sistémica de eritropoyetina y derivados y análogos de la misma, en el caso de la administración subcutánea o intravenosa, solamente causa un efecto inadecuado o excesivamente corto en el sitio de la lesión de la piel, especialmente debido a que este concepto sistémico descuida la importancia de las células madre específicas de tejido, que son completamente independientes de las células vasculares.

10 De acuerdo con la invención, las células precursoras localizadas en los apéndices de la piel y en las criptas de las células madre de la piel se pueden estimular directamente, por lo tanto, mediante la administración tópica de EPO la primera vez. Además, se ha encontrado que las células positivas para CD90 y las células positivas para nestina en la región de la herida de la piel también se estimulan a través de la estimulación inducida por EPO de las células mencionadas sustancialmente CD31 negativas. CD90 es una proteína marcadora para células madre y células precursoras neuronales, mientras que la nestina es un marcador para las células nerviosas. Las células positivas para CD73 en la región de medida, también se coestimulan directamente con EPO. De este modo, la EPO aplicada por vía tópica es capaz de estimular prácticamente todas las células importantes en la región inmediata de la herida, que son esenciales para la cicatrización de heridas cutáneas hasta su crecimiento.

20 De acuerdo con la invención, de manera totalmente independiente de las especificaciones y restricciones de los requisitos de dosificación sub-policitémica de la técnica anterior, la estimulación directa de células esenciales y de las células precursoras, las cuales son específicas para la cicatrización de heridas en la piel, se realiza usando EPO aplicada por vía tópica, preferentemente en una formulación adecuada a la base de polímeros, en particular polímeros hidrófilos, y derivados y análogos de los mismos que tienen la misma acción o una acción similar. Esto se produce independientemente de una acción en los progenitores de las células endoteliales a través del organismo, que inevitablemente se produce en el caso de una forma de aplicación sistémica convencional. Una acción sistémica de este tipo, por lo general, no se desea debido a los efectos hematopoyéticos e que se producen (aumento del número de glóbulos rojos, aumento de la formación de sangre en la médula ósea, aumento del riesgo de trombosis, etc.).

30 La EPO aplicada por vía tópica o de manera local de acuerdo con la invención, además no causa o sustancialmente no causar estimulación de las células precursoras vasculares endoteliales que circulan de forma sistémica en el torrente sanguíneo. La estimulación directa de las células cerca de la herida presenta la ventaja de que la piel regional y el entorno de la herida, por un lado, limita la resorción sistémica, por ejemplo, mediante proteasas, lo que reduce la degradación de EPO antes de entrar en el área de circulación sistémica, y sin embargo facilita una concentración de compuesto activo localmente elevada. Las cantidades de EPO que podrían significar una concentración de 250 IU de EPO / BW o más en el caso de una forma de aplicación sistémica convencional, se pueden administrar fácilmente sin los correspondientes efectos no deseados de EPO, que se ha mencionado que se producen. Esto amplía de manera considerable la ventana terapéutica para el área de regeneración tisular. Además, los efectos coestimulatorios se pueden iniciar mediante las citoquinas traumáticas, que solamente están presentes de manera local en concentraciones elevadas, debido a la administración tópica de EPO.

Por lo tanto, la invención se refiere a:

- 45
- el uso de eritropoyetina o de uno de sus derivados o análogos que tienen la misma acción biológica (EPO), preferentemente en forma de una formulación farmacéutica que estabiliza el compuesto activo y lo libera de manera uniforme, y se basa preferentemente en polímeros que tienen propiedades hidrófilas, al menos parcialmente, para la preparación de un medicamento para su aplicación por vía tópica y de forma local para el cierre defectuoso y/o para reepitelialización de piel traumatizada, mediante la estimulación dirigida de las células precursoras específicas de tejido,

50

 - un uso correspondiente, en el que la EPO aplicada por vía tópica y de manera local no causa o sustancialmente no causa estimulación de las células precursoras vasculares o endoteliales que circulan de forma sistémica en el torrente sanguíneo,

55

 - un uso correspondiente, en el que las células mencionadas estimuladas mediante EPO aplicada por vía tópica no expresan o solamente expresan una cantidad muy pequeña del antígeno CD31,

60

 - un uso correspondiente, en el que la reepitelialización de la piel se produce de un 20 a un 70 %, preferentemente de un 20 a un 50 %, en particular un 30 - 40 %, más rápidamente que con EPO en una forma no estabilizada en condiciones de otro modo idénticas,

65

 - un uso correspondiente, en el que la reepitelialización de la piel se produce de un 20 a un 50 %, preferentemente

de un 30 a un 40 %, más rápidamente que con una formulación farmacéutica correspondiente sin EPO en condiciones de otro modo idénticas,

- 5 • un uso correspondiente, en el que la EPO aplicada por vía tópica y de manera local estimula la diferenciación y el crecimiento de queratinocitos y/o células del folículo piloso y/o células de tejido conectivo,
- 10 • un uso correspondiente, en el que la EPO aplicada por vía tópica y de manera local adicionalmente estimula la diferenciación y el crecimiento de las células positivas para CD90 y/o positivas para nestina en la región inmediata de la herida,
- 15 • un uso correspondiente, en el que la EPO aplicada por vía tópica y de manera local estimula la diferenciación y el crecimiento de las células nerviosas y/o de las células precursoras neuronales,
- un uso correspondiente, en el que las correspondientes células precursoras en capas de tejido más profundas en las proximidades locales de la herida se estimulan con la EPO aplicada por vía tópica y de manera local.

20 Uno de los problemas principales en la administración sistémica de EPO es conseguir una acción protectora del tejido suficientemente elevada en áreas regionales, a la vez que se tienen en cuenta por un lado, los efectos secundarios sistémicos y por otro lado, la necesidad de establecer una concentración de compuesto activo elevada.

Por lo tanto, el objeto de la invención también fue crear un método de aplicación y un material vehículo por medio del cual la EPO y análogos de la misma, se pueden aplicar por vía tópica de una manera particularmente eficaz.

25 De manera sorprendente, se ha encontrado que el efecto de acción descrito de la EPO, y derivados, y análogos de la misma aplicados por vía tópica que tienen la misma acción biológica, es particularmente pronunciado si el compuesto activo se ofrece para su aplicación tópica en una preparación o formulación farmacéutica que lo estabiliza, en el que la formulación o preparación debe tener la propiedad adicional de liberar el compuesto activo a la herida de una manera tan uniforme como fuera posible y de una manera relativamente lenta (liberación lenta).

30 De manera sorprendente, se ha encontrado que los polímeros de viscosidad relativamente elevada, hidrófilos, formadores de geles, tales como derivados de celulosa, carbómeros, alcoholes grasos o macrogoles (polietilenglicoles) o mezclas de los mismos, preferentemente polisacáridos formadores de gel, en particular del grupo de los éteres de celulosa y ésteres de celulosa, como sustancia vehículo o base de formulación, ejercen una acción estabilizante en la EPO y derivados de la misma en las correspondientes preparaciones que contienen EPO para su aplicación por vía tópica, tales como pomadas, cremas, pastas o geles. En el presente documento, el compuesto activo se distribuye de manera uniforme en una matriz polimerizada o gelatinosa, hinchada, viscosa, preferentemente matriz de polisacárido, que lo protege y a partir del que, además, se libera de manera uniforme y lentamente a la herida, en la que es capaz de desarrollar su acción directa e inmediatamente sin descomposición significativa con enzimas proteolíticas que se producen.

40 De manera interesante, los geles que contienen EPO, que tienen una viscosidad relativamente elevada superior a 20.000 mPa s, preferentemente superior a 30.000 mPa s, en particular entre 20.000 y 100.000 mPa s, preferentemente entre 40.000 y 60.000 mPa s, presentan resultados más ventajosos que los geles de viscosidad más baja que tienen valores de viscosidad inferiores a 20.000 mPa s, en particular inferiores a 10.000 mPa s. Los valores de viscosidad de este tipo se pueden conseguir en geles en los que el polímero formador del gel, preferentemente el polisacárido formador del gel, tiene una proporción de un 2 - 4 % en peso, preferentemente un 2 - 3 %, pero no significativamente inferior.

50 Se ha demostrado que las formulaciones de gel que comprenden, como formador de gel, al menos un polisacárido hinchable seleccionado entre el grupo que consiste en hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa y carboxietilcelulosa son particularmente ventajosas. Se da preferencia a las formulaciones que comprenden lo que consisten en carboximetilcelulosa y/o hidroxietilcelulosa.

55 Además de las composiciones gelatinosas a base de polisacáridos, tales como celulosas o también alginatos, otros polímeros hinchables que tienen acción hidrófila general y las propiedades de viscosidad requeridas, tal como se usan en muchas formulaciones disponibles en el mercado, por ejemplo, geles, pastas, pomadas, en principio también son adecuadas.

60 También es posible usar matrices hidrófobas, poliméricas, por lo general con una viscosidad elevada, por ejemplo, a base de poliacrilatos o poliuretanos en las que se embeben las partículas hidrocoloidales que comprenden polisacáridos, tales como carboximetil/etilcelulosas, gelatina o pectinas, que comprenden el compuesto activo.

65 La EPO es estable durante un largo periodo de tiempo de más de 30 días en la formulación de gel es ventajosa de acuerdo con la invención (Fig. 1), mientras que el contenido de EPO en una solución acuosa de EPO de una concentración comparable (en NaCl al 0,9 %) ya ha disminuido en un 80 % después de 20 días.

Por el contrario, una herida que se ha tratado con una formulación que contiene EPO de acuerdo con la invención, se cura aproximadamente un 10 - 50 %, preferentemente un 20 - 40 %, más rápidamente en comparación con una formulación de acuerdo con la invención sin EPO. Por lo tanto, por ejemplo, se puede conseguir una cicatrización de las heridas entre un 92 y un 99 % mediante reepitelialización después de 4 a 8 días con una formulación que

contiene EPO de acuerdo con la invención, mientras que la cicatrización de heridas con la formulación de acuerdo con la invención sin EPO es solamente de un máximo de hasta un 85 - 87 % en condiciones de otro modo idénticas.

- Por lo tanto, la invención se refiere a una formulación gelatinosa o viscosa para uso tópico en el tratamiento de heridas, quemaduras o escaldaduras de la piel o de enfermedades cutáneas acompañadas por heridas crónicas, que comprende eritropoyetina (EPO) y al menos un polisacárido hinchable formador de gel en una concentración de un 2 - 4 % en peso, seleccionado entre el grupo que consiste en

- hidroxietilcelulosa
- hidroximetilcelulosa
- carboxietilcelulosa
- carboximetilcelulosa, en el que la formulación gelatinosa o viscosa en el estado hinchado

- (i) tiene una viscosidad de 20.000 - 60.000 mPa x s,
- (ii) comprende EPO en una concentración de 100 - 500 IU / g,
- (iii) se aplica a la piel traumatizada en una cantidad que corresponde a 50 - 1.500 UI de EPO / cm² de área de la herida, y
- (iv) estabiliza la EPO en la formulación y la libera de manera uniforme y lenta.

Además, en el presente documento se describe:

- una formulación viscosa basada en al menos un polímero hidrófilo, formador de gel que tiene una viscosidad de al menos 20.000 mPa x s, que comprende eritropoyetina o uno de sus derivados o análogos que tienen la misma acción biológica (EPO), y es capaz de liberar la última de manera uniforme a un entorno hidrófilo,

- una formulación viscosa correspondiente que tiene una viscosidad de al menos 30.000 mPa x s, preferentemente de 40.000 a 60.000 mPa x s,

- una formulación viscosa correspondiente que comprende preferentemente, como polímero hidrófilo, un derivado de celulosa, en particular un polisacárido seleccionado entre el grupo de las hidroxialquilcelulosas y/o carboxialquilcelulosas, y una matriz de polímero hidrófobo a base de poliacrilato o poliuretano,

- una formulación gelatinosa o viscosa a base de al menos un polisacárido hinchable seleccionado entre el grupo de las hidroxialquilcelulosas y/o carboxialquilcelulosas, que comprende eritropoyetina o uno de sus derivados o análogos que tienen la misma acción biológica (EPO),

- una formulación correspondiente que se puede obtener mezclando EPO en forma liofilizada, disuelta o suspendida con el polisacárido hinchado previamente,

- una formulación correspondiente en la que el polisacárido totalmente hinchado tiene una viscosidad de 5000 - 100.000 mPa x s, en particular 20.000 - 50.000 mPa x s,

- una formulación correspondiente en el polisacárido(s) es (se) emplean en una concentración de un 0,4 a un 4 % en peso, en particular un 2 - 3 % en peso,

- una formulación correspondiente en la que el polisacárido es un éter de celulosa y/o un éster de celulosa y se selecciona entre uno o más miembros del grupo que consiste en:

- hidroxietilcelulosa
- hidroximetilcelulosa
- carboxietilcelulosa
- carboximetilcelulosa

- una formulación preferente que comprende, como formador de gel, hidroxietilcelulosa y/o carboximetilcelulosa polimerizable,

- una formulación correspondiente que comprende EPO en una concentración de 100 a 500 IU/g de formulación de gel, en particular de 150 a 300 IU/g de formulación de gel, preferentemente 150 IU/g de formulación de gel,

- una formulación correspondiente que comprende de 0,5 g a 5 g de formulación de gel / cm² de área de la herida, preferentemente de 1 g a 3 g de formulación de gel / cm² de área de la herida, en particular 1,0 g / cm² de área

de la herida,

- 5 • una formulación correspondiente que, dependiendo de la cantidad de gel usada, tiene una cantidad de EPO que podría corresponder, a un área de la herida de aproximadamente 100 cm², para una administración sistémica de aproximadamente 50 - 2200 IU / kg de peso corporal (BW, para un peso estándar de 70 kg), o aproximadamente 100 - 4500 IU / BW para un área de la herida de aproximadamente 200 cm², y aproximadamente 150 - 6000 IU / BW para un área de la herida de aproximadamente 300 cm²,
- 10 • una formulación correspondiente que comprende, dependiendo del tamaño de la herida o área de la herida (de 1 cm² a 300 cm²), una cantidad de EPO de aproximadamente 50 a aproximadamente 450.000 IU, como promedio de aproximadamente 500 a 300.000 IU, preferentemente de 1500 a 60.000 IU, en particular de 3000 a 10.000 IU,
- 15 • una formulación correspondiente que adicionalmente comprende al menos un compuesto activo adicional, que preferentemente tiene una acción antibacteriana, antiviral, fungicida o antiinflamatoria, actúa como inhibidor de proteinasa o de otro modo es necesario para la cicatrización de heridas,
- 20 • una formulación correspondiente que adicionalmente comprende al menos un copolímero sintético,
- una formulación correspondiente que adicionalmente comprende uno o más adyuvantes,
- una formulación correspondiente que se ha introducido en, o sobre, una matriz de vehículo sólida que modula la liberación del compuesto activo y en particular libera la EPO de manera uniforme en la región de la herida de la piel traumatizada,
- 25 • una formulación correspondiente en la que la matriz de vehículo sólida es un apósito, una lámina, una película, un vendaje, una tasa, pero en particular un apósito tridimensionalmente estructurado que es capaz de estabilizar y proteger a la propia formulación,
- 30 • un kit farmacéutico de partes, que comprende al menos dos unidades de envases separadas, en el que la primera unidad comprende al menos un polímero hinchable y la segunda unidad comprende EPO liofilizada o un derivado correspondiente de la misma.

35 Las formulaciones de acuerdo con la invención se pueden usar para el tratamiento tópico y local de piel lesionada y de enfermedades cutáneas de diversas causas en seres humanos y animales. Las formulaciones o de acuerdo con la invención también se pueden usar, en particular, en medicina dental y/o para mejorar la cicatrización de heridas en medicina general o medicina veterinaria. Las formulaciones de acuerdo con la invención también se pueden usar en tratamientos tópicos y locales de infecciones de heridas después de cirugía o postraumáticas y quemaduras, en sepsis postoperativa, en úlceras inflamadas y/o infectadas, en heridas isquémicas crónicas, en infecciones o dermatosis cutáneas agudas y crónicas, en acné, rosácea, psoriasis o en ulceraciones de la membrana mucosa, o lesiones en la membrana mucosa, tales como heridas óseas de membrana mucosa, en particular en la mandíbula o en el área dental.

45 Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de la formulación especificada anteriormente y que se especifican a continuación, para la preparación de un medicamento para el tratamiento y la cicatrización de heridas por vía tópica y local mediante la reepitelialización de la piel, en particular para el tratamiento y cicatrización de heridas por quemaduras o heridas en la piel, membrana mucosa y hueso y heridas en el área dental.

50 **Breve descripción de las figuras**

Fig. 1: *Estudio de estabilidad de preparaciones que contienen EPO*

55 Como se puede observar en la Fig. 1, el contenido de EPO varía en el intervalo de un 90 - 100 % del contenido nominal (150 U/ml) durante la investigación, lo que significa que se puede suponer que la preparación y también el correspondiente hidrogel son estables durante un periodo de 4 semanas después de su preparación.

60 Por el contrario, una degradación significativa de EPO era evidente en la solución que contenía cloruro sódico (0,9 % en peso de NaCl en agua que comprende 40 U/ml de EPO) durante el periodo del experimento, lo que significa que solamente se encontró entre un 20 y un 30 % del contenido nominal después de tres y cuatro semanas.

Fig. 2:

65 La figura muestra la reepitelialización de la piel, en %, de ratas traumatizadas que se habían tratado con una formulación de acuerdo con la invención (3 % de carboximetilcelulosa) sin EPO (control/placebo, gel F - barra de la parte izquierda) y con EPO (aproximadamente 0,3 g de gel: 150 IU / g de gel = aproximadamente 200 IU / BW, gel E

- barra de la parte derecha) durante 4 días.

Los resultados se muestran en forma de tabla (figura de la parte superior) y gráficamente (figura de la parte inferior).

5 **Fig. 3:**

La figura muestra la reepitelialización de la piel, en %, de ratas traumatizadas que se habían tratado con una formulación de acuerdo con la invención (3 % de carboximetilcelulosa) sin EPO (control/placebo, gel F - barra de la parte izquierda) y con EPO (aproximadamente 0,3 g de gel: 150 IU / g de gel = aproximadamente 200 IU / BW, gel E - barra de la parte derecha) durante 8 días. El vendaje / apósito se cambió después de cuatro días, y la herida se trató con gel recién preparado. Después del tratamiento con la formulación de acuerdo con la invención durante 8 días, la piel está prácticamente restablecida en un 100 %.

Los resultados se muestran en forma de tabla (figura de la parte superior) y gráficamente (figura de la parte inferior).

15 **Fig. 4:**

La Figura 4 representa la investigación histológica de la cicatrización de heridas después del tratamiento con un gel como se describe en el Ejemplo 8 durante 8 días. Las células que expresan proteína CD31 y nestina se han visualizado mediante tinción apropiada.

Los resultados muestran que el grosor de la capa del epitelio aumenta de manera significativa con el tratamiento con EPO en comparación con la formulación de control. Además, se puede observar que la neoformación del epitelio no se correlaciona esencialmente con un aumento de las células positivas para CD31 (teñidas), pero lo hace hasta cierto punto con células positivas para nestina.

25 **Fig. 5:**

La Figura 5 es la evidencia fotográfica de la cicatrización de una úlcera isquémica crónica de tercer grado del maléolo lateral en un paciente diabético después de tratamiento local tres veces con la formulación de acuerdo con la invención que comprende 3000 IU de EPO (en total 9000 IU). La fotografía de la parte inferior muestra el curso después de 15 días (Ejemplo 16).

35 **Fig. 6:**

La Figura 6 muestra una fotografía del proceso de cicatrización de una herida térmica después de retirada de un injerto de piel parcial en un paciente por tratamiento con una sola administración de 3000 IU de EPO en un hidrogel de acuerdo con la invención (Ejemplo 17).

40 **Detalles de la invención**

Se ha encontrado que en el caso de regeneración cutánea se puede conseguir un cierre rápido del defecto, por ejemplo, después de traumatismo por quemadura, escaldadura, o heridas inducidas por enfermedad mediante EPO aplicada por vía tópica, en particular en forma de una formulación gelatinosa que se ha descrito anteriormente y se describe a continuación con mayor detalle, en particular un hidrogel a base de celulosa. Además, la reepitelialización de la región de la herida se estimula crucialmente mediante la EPO administrada por vía tópica. Esto es evidente para un espesor mayor de la capa del epitelio (Fig. 4). Esto sólo puede producirse si la formación de los componentes parenquimatosos de la piel también se estimula tan rápidamente como sea posible.

Además, se puede observar que la formación de una red vascular también se inicia mediante la EPO aplicada por vía tópica, pero esto está asociado con la formación local del parénquima, a diferencia de las enseñanzas conocidas de que la cicatrización de heridas causada por EPO se establece en primer lugar en movimiento mediante la estimulación de células formadoras de vasos, es decir, la EPO simplemente causa una formación vascular y la formación del tejido parenquimatoso comienza indirectamente y en el mejor de los casos de una manera retardada en el tiempo, como una consecuencia de la estimulación de células endoteliales y células precursoras de las mismas con EPO.

Sin embargo, los resultados de la presente invención muestran claramente que la formación de células vasculares se coordina al menos al mismo tiempo con la formación de tejido localizado.

Además, de acuerdo con la invención se puede observar que la aplicación tópica de EPO hace que las células precursoras específicas de tejido que son positivas para nestina, se encuentren en mayor medida en la región limítrofe de la nueva epidermis. De este modo, las células madre neuronales se estimulan en esta región lo que explica el aumento de la sensibilidad de la piel durante la cicatrización de heridas.

Para las formulaciones de acuerdo con la invención, se hace un uso preferente de la eritropoyetina recombinante, ya que está disponible en el mercado. Sin embargo, también es posible usar, de acuerdo con la invención, derivados de EPO que se han desarrollado para prolongar el periodo del valor medio del compuesto activo en la sangre pone suero en comparación con la EPO nativa. Los derivados de EPO de este tipo también se pueden usar para aplicación tópica, aunque esto no es absolutamente necesario ya que las formulaciones gelatinosas de acuerdo con la invención desarrollan su propia acción protectora específica frente a la EPO normal. Estos incluyen, por ejemplo, EPO pegilada, EPO con un patrón de glicosilación modificado (por ejemplo, Aranesp®), EPO sililada, o EPO que se ha fusionado con otros polipéptidos o fragmentos de inmunoglobulinas (por ejemplo, a la parte de Fc de un anticuerpo) (conocido, por ejemplo, a partir del documento WO 02/49673 o el documento WO 01/02017). Además, también se pueden usar miméticos de péptido de EPO sintética biológicamente activa (como se conoce, por ejemplo, a partir de los documentos WO 96/40749, WO 96/40772, WO 01/38342, WO 01/091780, WO 2004/101611, WO 2004/100997, WO 2004/101600, WO 2004/101606 y WO 2006/050959). Dado que estos miméticos normalmente tienen cadenas de aminoácidos significativamente más cortas y de ese modo por lo general experimentan una degradación más rápida, éstos experimentan la estabilización necesaria y adecuada con las formulaciones de acuerdo con la invención.

En el caso del uso sistémico conocido de EPO, por lo general se aplican entre 150 y 300 IU / kg de peso corporal (BW) del compuesto activo por dosis. A dosis significativamente más elevadas, los efectos secundarios no deseados se hacen dominantes. En el caso de un ser humano adulto (70 kg), esto corresponde a entre 10.500 y 31.500 IU de EPO / dosis. Esto a su vez se corresponde de aproximadamente 80 a 250 µg de EPO / dosis (13.000 IU ~ 100 µg de EPO).

En el caso del uso tópico de acuerdo con la invención para lesiones en la piel, se pueden usar cantidades de EPO significativamente más elevadas por dosis por medio de las formulaciones o geles de acuerdo con la invención sin que se produzcan efectos secundarios significativos. Por lo tanto, para heridas de tamaño correspondiente (por ejemplo 300 cm²), se pueden usar cantidades de EPO que podrían corresponder a aproximadamente 6500 IU / kg de peso corporal (BW) en el caso de la administración sistémica. Una cantidad de EPO de este tipo aplicada de forma sistémica ya no podría ser tolerada más. Las cantidades totales necesarias de EPO varían considerablemente dependiendo del tamaño de la herida y de la cantidad de gel para un área de la herida y contenido de EPO / g de gel.

En general, de acuerdo con la invención, la dosis se puede contemplar como la cantidad de EPO que se necesita para el claramente individual de una herida (de diversos tamaños). Dado que una herida se define no solamente por su área, sino también, cuando sea apropiado, por su profundidad, la dosis de compuesto activo necesaria puede variar en gran medida, ya que la herida se rellena preferentemente con la formulación de acuerdo con la invención.

Si el peso corporal para un humano adulto se toma como 70 kg, surgen los siguientes valores, por ejemplo, para la cicatrización de heridas:

50 - 500 IU / BW → 3500 – 35.000 IU de EPO por dosis o herida y tamaño de la herida;
 50 - 150 IU / BW → 3500 – 10.500 IU de EPO por dosis o herida y tamaño de la herida;
 100 - 500 IU / BW → 7500 – 35.000 IU de EPO por dosis o herida y tamaño de la herida;
 150 - 300 IU / BW → 10.500 – 21.000 IU de EPO por dosis o herida y tamaño de la herida.

Los tamaños de la herida y las concentraciones de gel que corresponden a estos valores se muestran en la Tabla 1.

Las unidades de EPO bajas se usan preferentemente en heridas pequeñas que tienen un área de herida de aproximadamente 5 - 20 cm², mientras que los valores superiores se usan para heridas grandes que tienen un área de aproximadamente 100 cm² o superior. En el caso de heridas que tienen un área de, por ejemplo, 10 cm², se pueden usar cantidades de EPO entre aproximadamente 500 y 15.000 IU de acuerdo con la invención. En el caso de heridas que tienen un área de, por ejemplo, 100 cm², se requieren aproximadamente 5000 – 150.000 IU de EPO. Esto significa que como promedio se deberían aplicar aproximadamente 50 - 1500 IU de EPO / cm² de área de la herida, preferentemente 75 - 450 IU de EPO / cm², de acuerdo con la invención adherida para su reepitelización y cierre de defectos de la herida. Por supuesto, las cantidades aplicadas pueden ser significativamente superiores o inferiores a los valores mencionados en ciertas condiciones.

Los valores mencionados anteriormente se basan en un contenido de EPO de 100 - 500 IU / g de formulación de gel, en particular 100 - 300 IU / g de formulación de gel, preferentemente 150 - 200 IU / g de formulación de gel. En detalle, se usan los siguientes intervalos de cantidades de EPO de acuerdo con la invención por gramo de base de formulación:

100 IU / g de gel - 300 IU / g de gel, 100 IU / g de gel - 150 IU / g de gel,
 100 IU / g de gel - 200 IU / g de gel, 100 IU / g de gel - 250 IU / g de gel,
 150 IU / g de gel - 200 IU / g de gel, 150 IU / g de gel - 250 IU / g de gel,
 150 IU / g de gel - 300 IU / g de gel, 200 IU / g de gel - 250 IU / g de gel,
 250 IU / g de gel - 300 IU / g de gel.

ES 2 625 145 T3

En general, se usan de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 g, preferentemente 1 - 3 g, en particular 1 g, de gel de acuerdo con la invención por centímetro cuadrado (cm²) de área de la herida en un adulto, dependiendo de la lesión. Sin embargo, las cantidades usadas pueden ser superiores o inferiores a estas concentraciones. En particular, se usan los siguientes intervalos de concentración de gel: 0,5 g de gel / cm² - 2,0 g de gel / cm², 0,5 g de gel / cm² - 1,0 g de gel / cm², 1,0 g de gel / cm² - 2,0 g de gel / cm².

Por lo tanto, las formulaciones de acuerdo con la invención comprenden, por ejemplo, aproximadamente las siguientes cantidades de EPO (IU) o las cantidades de EPO indicadas en la Tabla 1 por dosis, correspondiente al tamaño de la herida y la cantidad de EPO por gramo de base de formulación: 2000 IU, 3000 IU, 4000 IU, 5000 IU, 6000 IU, 7000 IU, 8000 IU, 9000 IU, 10.000 IU, 12.000 IU, 15.000 IU, 20.000 IU, 25.000 IU, 30.000 IU, 35.000 IU, 40.000 IU, 45.000 IU, 55.000 IU, 60.000 IU, 70.000 IU, 80.000 IU, 90.000 IU, 100.000 IU, 120.000 IU, 135.000 IU, 150.000 IU y 180.000 IU.

Tabla 1:

(A) 0,5 g de gel / cm² de área de la herida

		IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO
cm² de área de la herida	Cantidad de gel (g)	(100 IU /g de gel)	(150 IU/g de gel)	(200 IU/g de gel)	(300 IU/g de gel)	(500 IU/g de gel)
1	0,5	50	75	100	150	250
10	5	500	750	1000	1500	2500
100	50	5000	7500	10.000	15.000	25.000
200	100	10.000	15.000	20.000	30.000	50.000
300	150	15.000	22.500	30.000	45.000	75.000

(B) 1 g de gel / cm² de área de la herida

		IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO
cm² de área de la herida	Cantidad de gel (g)	(100 IU /g de gel)	(150 IU/g de gel)	(200 IU/g de gel)	(300 IU/g de gel)	(500 IU/g de gel)
1	1	100	150	200	300	500
10	10	1000	1500	2000	3000	5000
100	100	10.000	15.000	20.000	30.000	50.000
200	200	20.000	30.000	40.000	60.000	100.000
300	300	30.000	45.000	60.000	90.000	150.000

(C) 2 g de gel / cm² de área de la herida

		IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO
cm² de área de la herida	Cantidad de gel (g)	(100 IU /g de gel)	(150 IU/g de gel)	(200 IU/g de gel)	(300 IU/g de gel)	(500 IU/g de gel)
1	2	200	300	400	600	1000
10	20	2000	3000	4000	6000	10.000
100	200	20.000	30.000	40.000	60.000	100.000
200	400	40.000	60.000	80.000	120.000	200.000
300	600	60.000	90.000	120.000	180.000	300.000

(D) 3 g de gel / cm ² de área de la herida						
		IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO	IU de EPO
cm ² de área de la herida	Cantidad de gel (g)	(100 IU /g de gel)	(150 IU/g de gel)	(200 IU/g de gel)	(300 IU/g de gel)	(500 IU/g de gel)
1	3	300	450	600	900	1500
10	30	3000	4500	6000	9000	15.000
100	300	30.000	45.000	60.000	90.000	150.000
200	600	60.000	90.000	120.000	180.000	300.000
300	900	90.000	135.000	180.000	270.000	450.000

De acuerdo con la invención, las nuevas formulaciones comprenden al menos un polímero hidrófilo, viscoso, formador de gel, preferentemente un derivado de celulosa, preferentemente un polisacárido, o alginatos o derivados de los mismos, quitina o derivados de la misma o sales de la misma, o almidón. El origen de los polisacáridos formadores de gel no es importante en el presente documento, es decir, estos polisacáridos formadores de gel pueden ser de origen vegetal o animal o se puede entregar por vía sintética. Tan es posible usar polisacáridos que sean de origen vegetal o animal y que además se hayan modificado mediante síntesis química.

Para los geles o formulaciones de acuerdo con la invención se usan preferentemente derivados de celulosa. El grupo de los derivados de celulosa en relación con la presente invención incluye, en particular, éteres de celulosa y ésteres de celulosa y sales de las mismas. Los éteres de celulosa usados en el presente documento son, en particular, hidroxialquilcelulosas, tales como, por ejemplo, hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxibutilcelulosa, pero en particular hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa. Los ésteres de celulosa usados en el presente documento son, en particular, carboxialquilcelulosa, en particular carboximetilcelulosa, carboxietilcelulosa, carboxipropilcelulosa orcarboxibutilcelulosa, pero preferentemente carboximetilcelulosa o carboxietilcelulosa, en los que la carboximetilcelulosa es la más preferente.

De acuerdo con una realización adicional, la formulación de acuerdo con la invención también debe comprender al menos dos polisacáridos formadores de gel diferentes a los mencionados anteriormente, en particular de los derivados de celulosa mencionados anteriormente. En el que se documento se ha demostrado que es particularmente ventajoso usar al menos un compuesto de la clase de los éteres de celulosa y al menos un compuesto de la clase de los ésteres de celulosa. En el presente documento se da preferencia en particular a una formulación / hidrogel que comprende, como polisacáridos formadores de gel, hidroxialquilcelulosa y carboxialquilcelulosa, en particular hidroxietilcelulosa y carboximetilcelulosa.

Además, un gel de acuerdo con la invención puede comprender, en particular, como polisacárido formador de gel, al menos un derivado de celulosa soluble en agua. Estos se distinguen por el hecho de que no forman partículas hinchadas dentro del gel, dando como resultado a su vez un hidrogel muy homogéneo. Además, un gel que contiene polisacárido soluble en agua presenta en particular buena capacidad de propagación al aplicarlo en una herida, además forma una superficie particularmente lisa y se puede modelar particularmente bien. Los derivados de celulosa solubles en agua que no están reticulados son particularmente adecuados en el presente documento.

Las formulaciones de acuerdo con la invención pueden comprender además un compuesto formador de estructura o un compuesto modulador de la viscosidad. Para este fin son particularmente adecuados el ácido poliacrílico y las sales del mismo y en particular poliacrilatos reticulados. Los ejemplos de acrilatos adecuados de este tipo son: (poli)metacrilato, metacrilato de (poli)metilo, poliacrilamida, metacrilato de (poli)etoxietilo. Estos derivados del ácido poliacrílico adicionalmente tienen la ventaja de que son capaces de representar una proporción considerable de su propio peso en agua. La combinación de estos derivados de ácido acrílico con al menos un polisacárido formador de gel permite de ese modo la preparación específica de un gel cuya capacidad de absorción de agua y de liberación de agua se puede controlar. La proporción entre el derivado de celulosa y los derivados de ácido acrílico en la formulación puede estar entre 20:1 y 1:1, pero preferentemente entre 10:1 y 2:1.

Además, la formulación de acuerdo con la invención se puede basar en un polímero viscoso que en general tiene una acción hidrófila y que tiene un vehículo o matriz de soporte hidrófobos, que comprende por ejemplo poliuretano o poliacrilato, en la que están embebidos dichos polisacáridos que comprenden el compuesto activo, tales como, por ejemplo, carboxialquilcelulosas. Los hidrogeles de este tipo son particularmente adecuados para la cicatrización de heridas ya que mantienen la herida húmeda, crean un entorno óptimo para el desbridamiento autolítico, y depositan secreciones de la herida en el vendaje secundario. Un ejemplo de los mismos es el hidrogel Varihesive®.

En general, también son posibles otras estructuras principales o estructuras de soporte de polímero hidrófobo en las que se embeben partículas hidrocoloidales de un polisacárido, como se ha indicado anteriormente.

En principio, todas las bases de gel y pomada a base de polímeros, en particular las desarrolladas sobre la base de polisacáridos, y las que se ha demostrado que son particularmente adecuadas para la cicatrización de heridas y están disponibles en el mercado, son adecuadas para la formulación de acuerdo con la invención, siempre y cuando se asegure una liberación lenta uniforme de EPO mediante el mantenimiento de los valores de viscosidad como se ha descrito anteriormente y como se describe a continuación.

Además, las formulaciones de acuerdo con la invención pueden comprender adicionalmente electrolitos. Los electrolitos adecuados en relación con la presente invención son compuestos que son capaces de disociación en iones, en particular en disolución en agua, y se desarrollan a partir de iones mono-, di- y/o trivalentes. Estos electrolitos pueden estar, por ejemplo, en forma de sales inorgánicas u orgánicas y se diferencian de cualquier polímero que tenga un carácter iónico que pueda estar presente en la formulación. En este sentido son particularmente adecuados los cloruros, yoduros, sulfatos, hidrogenosulfatos, carbonatos, hidrogenocarbonatos, fosfatos, dihidrogenofosfatos o hidrogenofosfatos de los metales alcalinos y alcalinotérreos, pero en particular cloruro sódico, cloruro potásico y cloruro cálcico. Estas mezclas de electrolitos simulan particularmente bien la mezcla de electrolitos en un suero de herida liberado por una herida. Estas formulaciones que contienen electrolitos de acuerdo con la invención proporcionan de ese modo a la herida una esfera que estimula la cicatrización de heridas con un alcance en particular.

En una realización alternativa adicional de la invención, la formulación de acuerdo con la invención comprende adicionalmente un poliol. Este poliol es altamente adecuado como dador de humedad y de este modo representa un componente de cuidado para la piel que rodea a la herida. Para este fin son particularmente adecuados los polioles que se pueden seleccionar, por ejemplo, entre el grupo que consiste en: glicerina (glicerol), glicol, propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, polietileno-propilenglicol o mezclas de los mismos. En particular, el poliol usado en el presente hidrogel puede ser glicerina o polietilenglicol y mezclas de los mismos en cantidades entre un 0,5 % y un 10 % (p/p), basándose en todo el gel.

Las formulaciones o geles, en particular hidrogeles, de acuerdo con la invención deben tener una viscosidad que sea adecuada para proteger la EPO de una manera óptima, pero al mismo tiempo asegurar que el compuesto activo se puede liberar a la herida en una cantidad suficiente y lo suficientemente rápido sin que se hayan protagonizado previamente.

De manera sorprendente, se ha encontrado que esto se asegura de una manera óptima solamente por medio de formulaciones que tengan una viscosidad relativamente elevada, lo que se consigue con una proporción en peso de polímero hinchable en el gel como un conjunto, preferentemente de derivados de celulosa, de al menos un 1,5 %, pero preferentemente 2 - 4 %, de manera muy particularmente preferente un 2,5 - 3,5 %, en particular un 3 % o aproximadamente un 3 %. Los geles que tienen una viscosidad de este tipo por lo general se usan en raras ocasiones con fines médicos, ya que normalmente no se puede en procesar, así como geles que tengan un contenido de formador de gel de un 1 - 2 %. Como se ha mencionado anteriormente, el uso de, por ejemplo, acrilatos permite la capacidad de procesamiento del gel a mejorar.

Los geles o formulaciones de acuerdo con la invención basados en polímeros hidrófilos, tales como, por ejemplo, éteres de celulosa y/o ésteres de celulosa, por ejemplo carboxialquilcelulosas, tienen por lo tanto una viscosidad dinámica de 5000 a 100.000 mPa s, preferentemente superior a 20.000 mPa s, en particular de 20.000 a 70.000 mPa s y muy particularmente de 40.000 a 60.000 mPa s (medido en el modelo de reómetro de Bohlin CSR - 10, 4 / huso cónico de 0,40 mm, medición oscilométrica, T = 22-25 °C). Un hidrogel de este tipo se puede distribuir lo suficientemente bien y uniformemente sobre y en una herida, tiene buena cohesión incluso en la absorción del exudado de la herida y no se desprende de la herida a tratar.

Se proporciona que las formulaciones o geles preferentes que contienen EPO de acuerdo con la invención tienen la siguiente composición: al menos un 70 % en peso de agua y un 1,5 - 6,0 % en peso de polisacárido formador de gel, preferentemente al menos un derivado de celulosa, en particular carboximetilcelulosa y/o hidroxietilcelulosa, y opcionalmente un 0,1 - 10 % en peso de derivado del ácido acrílico y/o un 1 - 20 % de poliol, preferentemente un 1 - 5 % en peso de glicerol, y/o un 0,1 - 5 % en peso de electrolito.

Las formulaciones de acuerdo con la invención pueden comprender opcionalmente adyuvantes conocidos *per se* para la preparación del gel, incluyendo conservantes adecuados.

Las formulaciones o geles de acuerdo con la invención también pueden comprender otros compuestos activos que son necesarios como tal para la cicatrización de heridas. Esto es particularmente apropiado si, por ejemplo, se han producido infecciones bacterianas, virales o fúngicas o si se pretende una profilaxis frente a las infecciones de este tipo. Los antibióticos, antimicóticos o también antiflogísticos correspondientes que son adecuados para este fin se describen en la técnica anterior. En particular, en el presente documento son adecuados los compuestos activos que se pueden usar por vía tópica. Los ejemplos de antibióticos que se pueden usar por vía tópica son tetraciclinas o penicilina son también eritromicina, bacitracina, tirotricina, colistina y polimixina B o aminoglicósidos, tales como neomicina, kanamicina y paromicina o mupirocina.

En una realización en particular, al menos un inhibidor de proteinasa, destinado a inhibir las proteinasas que se producen de manera masiva en la secreción de la herida, se añade a la formulación de acuerdo con la invención. Un inhibidor de proteinasa particularmente adecuado de acuerdo con la invención es la aprotinina, que es capaz de inhibir la secreción de citoquina proinflamatoria que se produce en una herida. De manera sorprendente, se ha encontrado que la EPO es particularmente eficaz para la cicatrización de heridas para la administración tópica en presencia de aprotinina.

Además, los geles o formulaciones de acuerdo con la invención también pueden comprender agentes desinfectantes, tales como, por ejemplo, povidona-yodo o similares.

Además de la formulación que contiene EPO de acuerdo con la invención como tal, la presente invención también se refiere a un apósito que comprende un material de vehículo médico y la formulación o gel del tipo descrito. Por ejemplo, el material de vehículo usado en el presente documento comprende tejidos textiles no preparados mediante tejido o de punto o preparados mediante tejido fabricados a partir de materiales de fibra natural o sintética, y además coberturas de película, por ejemplo, en forma de un apósito de pulverización. El material de vehículo médico en el presente documento está revestido o impregnado con el gel o hidrogel en uno o más lados.

Muy particularmente, un apósito adecuado se puede proporcionar en forma de un apósito especial que comprende el compuesto activo de EPO de una manera particularmente optimizada y se libera a la herida.

Un apósito de este tipo se describe con detalle en el documento EP 08 011 985.2 y comprende la matriz de vehículo que comprende el compuesto o compuestos activos, en el que la matriz de vehículo tiene la siguiente estructura:

(i) áreas o estructuras en forma de una o más cavidades que sirven como recipiente para el medicamento, y (ii) áreas o estructuras en forma de una o más cavidades que sirven como estructuras similares a canales, que sirven para la absorción y drenaje de secreciones y/o aireación y/o introducción tópica de heridas de compuestos activos adicionales y/o de células que estimulan la cicatrización de la piel, en el que (a) al menos un área de acuerdo con (i) es adyacente a al menos un área de acuerdo con (ii), (b) las áreas (i) y (ii) se sellan en el lado con caras enfrentadas alejadas de la herida, (c) las áreas (i) y (ii) son abiertas o al menos permeables a los compuestos activos, secreciones de herida, compuestos activos adicionales /dichas células en el lado que se enfrenta a la herida, (d) las áreas (i) y (ii) en forma de cavidades se colocan en el plano de la superficie del apósito, y (e) las cavidades en las áreas (ii) tienen al menos una apertura o conexión para una jeringa o dispositivo de succión / suministro que permite el drenaje de secreciones de heridas que se han acumulado en las cavidades, con generación de una presión reducida en el apósito, y/o opcionalmente la aplicación de dichos compuestos activos adicionales.

Un apósito que contiene EPO correspondiente se puede diseñar adicionalmente de un modo tal que, en el caso de piel o heridas que supuran o heridas o piel que producen secreciones en la herida, (f) las cavidades en las áreas (ii) adicionalmente tienen medios de drenaje que permiten que se drenen las secreciones en la herida que se han acumulado en las cavidades. En este caso, las cavidades en las áreas (ii) pueden tener canales que se conectan entre sí. Las cavidades en las áreas (i) pueden tener forma de depresión, en la que el lado abierto de las depresiones se orienta hacia la herida, y las depresiones tienen un área de base rectangular, cuadrada, hexagonal / en forma de panal o redonda. Las cavidades mencionadas en las áreas (i) se separan entre sí mediante puentes del material de la matriz de vehículo. Del mismo modo, los propios puentes pueden tener estructuras similares a canales, al menos algunas de las cuales se conectan entre sí y que sirven para el drenaje de secreciones y/o aireación y/o el suministro en la herida de compuestos activos adicionales / dichas células.

Además, las cavidades en las áreas (i) que sirven como depósito para el medicamento representan subestructuras colocadas en grupos, que se separan entre sí mediante puentes del material de la matriz de vehículo. Los dominios del grupo tienen cualquier forma deseada del área de la base, rectangular, cuadrada, hexagonal / en forma de panal o redonda, en particular una forma del área de la base cuadrada o rectangular, en la que la forma del área de la base del grupo puede ser, si se desea, idéntica o diferente a la forma del área de la base de las subestructuras de las áreas (i). En el presente documento se puede producir que un dominio de grupo de área (i) sea adyacente con al menos una cavidad de área (ii) y que, si se desea, dos dominios de grupo de áreas (i) se separen entre sí por una cavidad de área (ii).

Las formulaciones / geles de acuerdo con la invención, que opcionalmente se aplican a un apósito de en principio se conoce y que está disponible en el mercado, o, por ejemplo, al igual que el apósito que se ha descrito anteriormente, se puede cambiar cada 12, 24, 48 o 72 horas, preferentemente cada 48 horas, que principalmente puede ser necesario debido a otros factores y circunstancias, tales como, por ejemplo, la formación de secreciones, sangrado con infecciones que surgen en la herida, que se van a tratar. Simplemente por razones de estabilidad y actividad del compuesto activo de EPO dentro de la base de formulación de acuerdo con la invención, sin embargo, no es necesario cambiar el vendaje o apósito antes de completar la cicatrización de heridas.

Los geles de acuerdo con la invención se pueden preparar con métodos conocidos *per se*. Uno de estos métodos se describe con mayor detalle en los ejemplos.

Los geles que contienen EPO de acuerdo con la invención se pueden usar, como se ha indicado anteriormente, en particular, en el tratamiento de heridas, en particular en la piel, la membrana mucosa, en el área dental, en el caso de lesiones en la membrana mucosa / mandíbula en la cavidad oral, o en el caso de quemaduras o escaldaduras desde la piel o enfermedades de la piel acompañadas por heridas crónicas. Las heridas en la piel pueden estar

5 causadas, por ejemplo, por cortes, punciones, aplastamiento, mordeduras o disparos, o pueden surgir como una consecuencia inevitable de operaciones o extracciones dentales. Además, diversas enfermedades pueden causar heridas en la piel o la carne, o formar úlceras abiertas. También se producen heridas grandes en el caso de trasplantes de órganos o amputaciones y se les debe proporcionar los cuidados terapéuticos por vía tópica y por vía local.

10 En el área dental, también pueden aparecer heridas relativamente pequeñas en el caso de inflamaciones por caries y periodontitis, y se pueden tratar de forma satisfactoria con las formulaciones / geles de acuerdo con la invención. Si la superficie del esmalte del diente está dañada, las bacterias penetran adicionalmente en la dentina subyacente. Los procesos en la pulpa están presentes en los túbulos de dentina radial, lo que significa que a continuación se produce una infección parcial o total y por lo tanto inflamación de la pulpa. Si no se proporciona tratamiento, la consecuencia es la muerte del tejido de la pulpa (necrosis) y descomposición bacteriana (gangrena). Si las masas gangrenosas no se retiran, la consecuencia es la inflamación fuera de la punta de la raíz. Se pueden desarrollar granulomas, quistes, formación de fistulas o abscesos. En cada una de estas etapas se puede usar de manera satisfactoria la EPO o el gel que contiene EPO, de forma ventajosa después del correspondiente tratamiento antibacteriano.

20 Las formulaciones o geles que contienen EPO de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para el tratamiento de heridas comparativamente profundas, y se pueden usar extremadamente bien como rellenos de herida. Por lo tanto, por ejemplo, las úlceras dérmicas profundas, que con mucha frecuencia supuran en gran cantidad, se pueden tratar con los geles de acuerdo con la invención. La viscosidad relativamente elevada del gel evita que el líquido salga de la herida, o al menos esto se reduce. Además, sin embargo, las heridas secas, tales como, por ejemplo, úlcera crural seca, también se pueden tratar con el presente gel. En este caso, el presente gel muestra su capacidad para proporcionar líquido a la herida y asegurar la eliminación de sustancias, depósitos y necrosis no deseados mediante desbridamiento suave. Otros tipos de heridas para los que se puede usar la formulación de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, úlcera de decúbito en estadio I, II, III (úlceras de presión), úlcera crural (úlcera en la pierna, irritación en la pierna), síndrome del pie diabético, úlceras cutáneas, úlceras sangrantes, quemaduras de primer y segundo grado, rozaduras y heridas crónicas.

35 Además, en el presente documento se desvela un kit de componentes que comprende al menos dos envases separados, en el que el primer envase comprende los materiales del hidrogel o de los componentes del hidrogel, tales como la matriz de soporte de polisacárido y/o polimérica (hidrófoba), y el segundo envase comprende el compuesto activo de EPO como agente liofilizado estable. El kit de componentes también puede comprender los componentes de la base de formulación, si fuera apropiado, en diferentes envases. Un envase que contiene un componente acuoso emparejado con la cantidad, en el que los componentes sólidos se pueden disolver o suspender, del mismo modo puede ser un componente adicional del kit de partes, es decir, el kit farmacéutico puede incluir una unidad de envase adicional que comprende el disolvente necesario para el hinchado / polimerización (preferentemente agua o agentes que contienen agua). El kit puede comprender el polímero hinchable en forma de un polvo o en forma hinchada previamente, en el que, en el último caso, la viscosidad del polímero hinchado previamente se debería mantener lo suficientemente baja (preferentemente por debajo de 5000 mPa s) de modo que se asegura la mezcla uniforme con el compuesto activo de EPO de la segunda unidad de envase. Después de la adición de EPO, el vehículo polímero / gel finalmente se hincha en su totalidad con la viscosidad deseada.

50 Los envases separados individuales también se pueden relacionar físicamente entre sí de un modo tal que sus contenidos se puedan mezclar entre sí mediante mecanismos sencillos, tales como perforación, punción, forzado, desgarro o similares, por ejemplo, en forma de un sistema de cierre mixto. De este modo, es posible retrasar la adición, en particular, del compuesto activo de EPO, que tiene un período de almacenamiento muy largo en forma liofilizada con retención de su actividad, con respecto al gel o base de formulación que todavía no se ha polimerizado totalmente hasta la preparación de un gel recién preparado en el estado pre-hinchado de baja viscosidad inmediatamente antes de su aplicación adherida, lo que significa que no se pueden producir pérdidas de actividad, tal como puede ser el caso en determinadas circunstancias en formulaciones que contienen compuesto activo que están completamente acabadas desde el principio.

60 Los siguientes ejemplos pretenden describir la invención en mayor detalle, pero sin limitarse a los mismos en modo alguno. En particular, la persona experta en la materia será capaz, si lo desea, de generalizar el conocimiento de estos ejemplos con la ayuda de su conocimiento general. Además, las sustancias indicadas en los ejemplos, incluyendo sus parámetros, propiedades, cantidades físicas, datos y los métodos específicos descritos, que la persona experta en la materia, a menos que se indique de otro modo o se evite por razones sensatas o técnicas / científicas, también serán capaces de generalizarse y llevarse a otras relaciones de las indicadas en los ejemplos, simplemente se deberían contemplar como ilustrativas.

65

Ejemplos**Ejemplo 1:**

5 La eritropoyetina (EPO) se usa en forma del medicamento acabado (10.000 IU de NeoRecormon, polvo y disolvente para la preparación de una solución para inyección en cartuchos, lote MH68260 08, PZN 742 914 3, Roche Reg. Ltd., Welwyn Garden City, UK).
El compuesto activo se convierte en una preparación pre-esterilizable en condiciones asépticas usando los siguientes formadores de gel:

- 10
- Hidroxietilcelulosa Ph. Eur. 5.1 (nombre comercial: Hidroxietilcelulosa 250 HX Pharm, lote 06E29-N01, Fagron, D-Barsbüttel)
 - Carmelosa-sodio / carboximetilcelulosa Ph. Eur. 5.0 (nombre comercial Tylopur C600, lote 516 762 65, Caelo, D-Hilden)
 - 15 ○ Metilcelulosa / hidroxipropilmetilcelulosa USP (nombre comercial Metolose 90 SH-100, lote 206314, Shin-Etsu, D-Mülheim)
 - Povidona Ph. Eur. 5.0 (nombre comercial Kollidön 25, lote 74-0915, BASF, D-Ludwigshafen)
 - Varihesive®, Convatec, Varihesive E® es un vendaje hidrocoloide. Consiste internamente (depositado sobre la herida) en una capa de hidrocoloide a base de un polisacárido hinchable que se embebe en una matriz de polímero adhesivo, y externamente consta de una espuma de poliuretano revestido con película.
- 20

Además de agua para fines de inyección a granel (Ph. Eur. 5.0), como adyuvante se usa glicerol (85 % o anhidro, lote 058 006 2, Fisher Scientific, Loughborough, UK). Los envases principales usados para la colocación de las formulaciones son viales de inyección Fiolax, vidrio de tipo I (Münnerstädter Glaswarenfabrik GmbH, D-Münnerstadt). Estos se cubren con discos de sellado Pharma-Fix de 20 mm y se sellan con un cierre alabeado con cierres alabeados de metal de 21 mm (ambos de VWR, D-Hannover). Los estudios de liberación se realizan usando modelos de piel organotípicos, cuya producción, cultivo y uso se realizaron de acuerdo con la siguiente referencia: C. Hoffmann, C. C. Müller-Goymann, "Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate", Pharmazie 60 (2005) 350-353.

30

Ejemplo 2: *Formulación de hidrogeles que no contienen compuesto activo*

El formador de gel a estudiar se pesa en un mortero tarado en condiciones bajas en gérmenes y se muele con la cantidad prevista de glicerol. Después de la adición de agua para fines de inyección a granel en porciones, se permite que la preparación se hinche durante al menos 2 horas, antes de que el agua evaporada sea reemplazada y el hidrogel sea homogeneizado en el mortero. El hidrogel se transfiere en un vial de inyección que se ha esterilizado con aire caliente en porciones de 3,3 g, que se puede realizar, dependiendo de la consistencia de la preparación, mediante absorción por medio de una jeringa o mediante transferencia en un frasco Unguator y dispensándolo posteriormente con la ayuda de un aplicador Unguator unido al mismo (ambos de Gako Konietzko GmbH, D-Bamberg). El vial de inyección sellado se esteriliza a continuación por medio de transmisión en vivo, saturada en condiciones convencionales de Ph. Eur.

40

Ejemplo 3: *Evaluación de las propiedades reológicas de los hidrogeles que no contienen compuesto activo*

45 Para poder calcular la degradación térmica de los formadores de gel durante el tratamiento en autoclave, los hidrogeles esterilizados se evalúan visualmente con muestras sin esterilizar y se miden en un viscosímetro de placa y cono (reómetro GVO, Bohlin Instruments, Cirencester, GB) a una temperatura de 20,0 °C y con un ángulo del vértice del cono de 1°. El contenido final de formador de gel se define de acuerdo con las demandas terapéuticas hechas de la formulación.

50

Ejemplo 4: *Preparación de una formulación gelatinosa que contiene EPO*

En cada caso, se inyectan 500 IU de EPO en el hidrogel enfriado y previamente esterilizado a partir de la solución de 10.000 IU de EPO reconstituida en un ambiente de trabajo limpio; en este punto, se hace uso de un Reco-Pen (Roche Diagnostics GmbH, D-Mannheim), que libera la solución de medicamento necesaria a través de una aguja universal Clickfine de 12 mm (Ypsomed, D-Sulzbach). Teniendo en cuenta el volumen de EPO de 50 µl transferido para 500 IU de EPO, se obtiene un contenido de compuesto activo de 150 IU / g en la preparación. Para poder asegurar una distribución homogénea con exclusión del riesgo de desnaturalización de la proteína, se permitió que la solución de EPO se difundiera en el hidrogel durante 24 horas. Para mejorar la mezcla, el vial de inyección se volteó dos veces 180° en este periodo de tiempo. Las preparaciones se almacenaron de +2 a +8 °C con protección frente a la luz. En detalle, el siguiente procedimiento de preparación se usa a modo de ejemplo para un hidrogel que tiene un contenido de eritropoyetina de 150 IU / g de gel:

60

- Preparación del gel que no contiene compuesto activo en condiciones bajas en gérmenes
- 65 • Moler la carboximetilcelulosa 250 HX con glicerol (2,4 %) en un mortero
- Incorporar agua en porciones

- Permitir que se hinche durante al menos 2 horas
 - Reemplazar el agua evaporada, homogeneizar. Como alternativa, también se puede usar un sistema de agitación electrónico (por ejemplo, Cito-Unguator 2000) para la preparación del gel que no contienen compuesto activo
- 5
- Transferir geles en porciones de 3,3 g cada una en un vial de inyección de vidrio de tipo 1 que previamente se ha limpiado y esterilizado con aire caliente, y sellar con un cierre alabeado, por ejemplo, una jeringa o aplicador Unguator®
- Tratar en autoclave el gel con cierre alabeado en condiciones convencionales
 - Poner los viales de inyección en una temperatura de +2 a +8 °C antes de su procesamiento adicional
- 10
- Transferir 500 IU de EPO en cada vial de inyección en una mesa de trabajo limpia, por ejemplo, de cartuchos de dos cámaras de 10.000 E de NeoRecormon usando el Reco-Pen con liberación de dos unidades de pluma 2 a través de una aguja universal Clickfine
 - Permitir que la EPO se difunda durante al menos 24 h, voltear el gel dos veces 180° en el vial de inyección durante este periodo de tiempo para una mezcla mejor.

15 Los geles se preparan de forma análoga usando hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa, carboxipropilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (contenido de celulosa entre un 1,5 % y un 3,5 % (p/p)).

Ejemplo 5: Ensayo de estabilidad de formulaciones que contienen de EPO

20 Para analizar la estabilidad de la eritropoyetina en las preparaciones, se toman muestras en el momento 0, 1, 2, 3 y 4 semanas después de la preparación de las respectivas preparaciones, y se envían para el análisis de eritropoyetina. Durante todo el periodo del experimento, se mantienen las condiciones de almacenamiento mencionadas anteriormente. Además, en el estudio también se incluye una preparación que tiene un contenido de eritropoyetina de 40 IU / ml en una solución de cloruro sódico acuoso al 0,9 %. Los resultados se muestran de manera gráfica en la Fig. 1.

Ejemplo 6: Experimentos de liberación de compuesto activo a través de construcciones de piel

30 Los experimentos de liberación se realizan usando seis celdas Franz (volumen: 5,68 - 8,88 cm³, área de permeación: 0,14-0,34 cm²) que contienen una solución isotónica de glicerol mantenida a 37 °C en el compartimento aceptor. La construcción de piel organotípica, que se estabiliza de forma mecánica frente a la solución aceptora en una dirección hacia abajo mediante un filtro de policarbonato y está en contacto con la preparación que será analizada en dirección hacia arriba, es introducida entre los compartimentos donante y aceptor. Las muestras se toman después de 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6 y 24 horas con la sustitución del volumen aceptor de 1,0 ml retirado, y se envían para el análisis de eritropoyetina. Un tiempo de contacto de aproximadamente 5 minutos, que se usa para el ensamblaje de la celda, introducción del aceptor y pesada, se debería ajustar para el periodo entre el primer contacto de la construcción de piel con la preparación a someter a ensayo y la primera toma de muestras (0 h). Cuatro de las celdas de liberación mencionadas anteriormente se usan para someter a ensayo la formulación que, sobre la base de estudios de formulación y estabilidad, se puede contemplar como la formulación más prometedora. Para obtener información sobre si se debe temer la degradación del medicamento durante el ensayo de liberación debido a una temperatura elevada superior a la de las condiciones de almacenamiento, dos celdas adicionales se cargan con una solución viscosa (contenido de eritropoyetina: 150 IU / g de hidrogel) para poder determinar el contenido de estas soluciones después de la finalización de los experimentos de liberación.

Ejemplo 7: Análisis de EPO

50 Dado que en todos los casos las cantidades del medicamento a determinar son demasiado pequeñas para realizar la cuantificación del contenido de eritropoyetina no desnaturalizada y no degradada por medio de difracción circular óptica, la eritropoyetina se determina por medio de un ELISA de sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante (EPO-ELISA, OSTEOmedical GmbH, D-Bünde). La medición del ensayo de ELISA desarrollado se realiza usando un lector de múltiples placas KC4 (Bio-Tek, D-Bad Friedrichshall) con la versión 3.4 Rev 21 del software. Dado que los contenidos de las formas de administración preparadas están por encima del rango de cuantificación del ensayo, las respectivas muestras se diluyen antes de la medición para obtener un contenido nominal en la región de 400 mIU / ml. Las muestras de las investigaciones de liberación se pueden medir sin una etapa de dilución provisional.

Ejemplo 8: Regeneración de piel en ratas traumatizadas usando un gel de carboximetilcelulosa

60 Se realiza un traumatismo por escisión tangencial en cuatro ratas hembra que tienen un peso corporal de 200 – 250 g. Los animales se tratan con un gel preparado de acuerdo con los detalles mencionados anteriormente, que comprende, como formador de gel, carboximetilcelulosa (3 % (p/p), 42.000 mPa s) (además un 2,4 % de glicerol) y 150 IU de EPO / BW. Los controles (placebo) no comprenden compuesto activo. Después de la aplicación del gel, los animales se proporcionan con un vendaje o apósito. El vendaje / apósito se cambia cada 48 h. Se toman muestras de tejido de la región de la herida después de 4 y 8 días y se analizan histológicamente. Aquí, los ensayos

se realizan para células CD31 y células positivas o negativas para nestina por medio de técnicas de tinción conocidas en la técnica anterior. Los resultados se muestran en las Figs. 2, 3 y 4. Se puede observar que la reepitelialización se completa significativamente más rápido en los geles que contienen EPO ("gel E", Figs. 2 y 3) (como promedio un 10 - 50 %) que en las formulaciones que no contienen compuesto activo ("gel F", Figs. 2 y 3), dependiendo de la duración del tratamiento. Además, se puede observar que, a través de tinción específica de células, la neoformación del epitelio no genera esencialmente células positivas para CD31 (Fig. 4).

La regeneración cutánea se analiza de forma análoga en un *gel* de *carboximetilcelulosa* al 1 %. Los resultados son aproximadamente un 5 - 10 % peores en el caso de la formulación de gel que contiene EPO que en el caso de un gel al 3 % comparable, mientras que en los controles no se observan diferencias significativas.

La regeneración cutánea se investiga de forma análoga en un gel al 1 % y un gel al 3 % basado en hidroxietilcelulosa con las mismas concentraciones de EPO. En comparación con el gel de carboximetilcelulosa se obtienen resultados comparables o solo ligeramente peores.

Ejemplo 9:

La siguiente formulación de gel para tratamiento de una herida por quemadura (aproximadamente 120 cm²) en un paciente adulto se preparó con el proceso mencionado anteriormente:

Componente	% en peso
Hidroxietilcelulosa 250 HX Pharm	3
Glicerol (anhidro)	2,4
Agua (para fines de inyección)	94,6

Se aplicaron 100 g de un gel de este tipo y comprendía 12.000 IU de EPO y presentaba una viscosidad de aproximadamente 40.000 mPa x s.

Ejemplo 10:

La siguiente formulación de gel para tratamiento de una herida por corte (2 cm²) en un paciente adulto se preparó con el proceso mencionado anteriormente:

Componente	% en peso
Hidroxietilcelulosa 250 HX Pharm	4
Glicerol (anhidro)	2,5
Poliacrilato	1,5
Agua (para fines de inyección)	92,0

Se aplicaron 2 g de un gel de este tipo y comprendía 1000 IU de EPO. Viscosidad: aproximadamente 68.000 mPa x s.

Ejemplo 11:

La siguiente formulación de gel para tratamiento de una herida por quemadura (aproximadamente 300 cm²) en un paciente adulto se preparó con el proceso mencionado anteriormente:

Componente	% en peso
Hidroxietilcelulosa 250 HX Pharm	2,5
Glicerol (anhidro)	2,5
Poliacrilato	2,0
Agua (para fines de inyección)	93,0

450 g de un gel de y comprendían 50.500 IU de EPO y se distribuyeron en la herida por quemadura para su tratamiento. Viscosidad: aproximadamente 35.000 mPa x s.

Ejemplo 12:

La siguiente formulación de gel para tratamiento de una herida por quemadura (80 cm²) en un paciente adulto se preparó con el proceso mencionado anteriormente:

5

Componente	% en peso
Carboximetilcelulosa 250 HX Pharm	3,5
Glicerol (anhidro)	3,5
Agua (para fines de inyección)	92,0

Se aplicaron 50 g de de un gel de este tipo y comprendía 35.000 IU de EPO. Viscosidad: aproximadamente 55.000 mPa x s.

10 **Ejemplo 13:**

La siguiente formulación de gel para tratamiento de una úlcera abierta en la pierna (150 cm²) en un paciente adulto se preparó con el proceso mencionado anteriormente:

Componente	% en peso
Carboximetilcelulosa 250 HX Pharm	3,0
Glicerol (anhidro)	2,5
Polimetacrilato	1,0
Agua (para fines de inyección)	93,0

15 Se aplicaron 150 g de de un gel de este tipo y comprendía 20.100 IU de EPO. Viscosidad: aproximadamente 49.000 mPa x s.

Ejemplo 14:

20 La siguiente formulación de gel para tratamiento de una herida relativamente grande en la membrana mucosa / mandíbula (1 cm²) como consecuencia de una extracción dental en un paciente adulto se preparó con el proceso mencionado anteriormente:

Componente	% en peso
Carboximetilcelulosa A380 Aquasorb	3,0
Glicerol (anhidro)	2,5
Agua (para fines de inyección)	94,5

Se aplicó 1 g de un gel de este tipo y comprendía 1500 IU de EPO.

25

Ejemplo 15:

30 La siguiente formulación de gel para tratamiento de una herida relativamente grande en la membrana mucosa / mandíbula (aproximadamente 10 cm²) como consecuencia de una extracción dental en un paciente adulto se preparó con el proceso mencionado anteriormente:

Componente	% en peso
Carboximetilcelulosa A380 Aquasorb	2,0
Hidroxietilcelulosa 250 HX Pharm	1,0
Glicerol (anhidro)	2,0
Agua (para fines de inyección)	95,0

Se aplicaron 30 g de de un gel de este tipo y comprendía 20.500 IU de EPO. Viscosidad: aproximadamente 23.000 mPa x s.

35

Ejemplo 16:

Heridas isquémicas crónicas

- 5 Solamente en Alemania las heridas isquémicas crónicas se encuentran entre las figuras clínicas quirúrgicas más habituales y requieren tratamiento interdisciplinario intensivo. En Alemania, más de 3 millones de personas padecen heridas crónicas, que por lo general se pueden dividir en tres tipos de herida: úlcera crural, pie diabético y úlcera de decúbito. Los costes para el tratamiento de heridas crónicas en este país en la actualidad se encuentran en aproximadamente 5000 millones de euros al año. La combinación de una úlcera arterial (enfermedad conclusiva
- 10 arterial periférica) y una úlcera diabética se contempla como particularmente difícil para tratar en clínica y desafortunadamente no es algo poco habitual.

Un paciente diabético de 69 años de edad con pAVK de grado IV ha estado padeciendo una úlcera isquémica crónica del grado III del maléolo lateral durante más de 12 meses (Fig. 5, foto superior). Después de tres

15 tratamientos locales con EPO recombinante (en cada caso 3000 IU) en hidrogel Varihesive E® que tiene una viscosidad correspondientemente elevada, se produce la formación evidente de tejido de granulación (foto parte media). La cicatrización de la herida completa se puede observar después de 15 días después de un injerto de piel parcial posterior (foto inferior).

20 **Ejemplo 17:**

Heridas dérmicas

- 25 Cualquiera sufrirá un cierto número de lesiones dérmicas mecánicas o térmicas que requieren cicatrización en el transcurso de su vida. El mercado de agentes terapéuticos para heridas locales en forma de líquidos, pomadas o materiales de vendaje es correspondientemente grande.

En el análisis de pacientes afectados basado en evidencias, el hecho de que cada herida tenga una configuración diferente es problemático. Sin embargo, en cirugía existe una herida en la piel altamente estandarizada que se produce por la necesidad de retirar una parte de la piel de espesor definido (normalmente de 0,2 a 0,3 mm) usando un instrumento especial (dermatomo) para a continuación injertarlo en otro sitio del cuerpo. Los sitios de retirada de piel parcial de este tipo (0,3 mm) normalmente cicatrizan sin consecuencias en 10 - 14 días.

30

Un paciente de 25 años de edad presentaba una lesión térmica cuyo tratamiento hizo necesaria una retirada de piel parcial (Fig. 6, foto de la izquierda). Los sitios de retirada se trataron con 1 x 3000 IU de EPO en hidrogel de acuerdo con una de las composiciones indicadas anteriormente (3 % de carboximetilcelulosa). La cicatrización completa se observó después de 7 días solamente (Fig. 6, foto de la derecha). Con cuatro pacientes adicionales que habían sufrido quemaduras se consiguieron resultados similares.

35

El ensayo de terapia de sitios de retirada de injerto de piel parcial con eritropoyetina aplicada de forma local se realizó como sigue a continuación en los cinco pacientes mencionados: cada uno de los injertos de piel parcial se tomaron del muslo con un espesor de 0,3 mm. La eritropoyetina se mezcló de manera intraoperatoria con hidrogel Varihesive®, que funcionaba como sustancia vehículo, y se aplicó directamente a la herida. El área de la herida se cubrió posteriormente con una película de poliuretano perforada y un segundo vendaje. El segundo vendaje se retiraba solamente en el caso de aplicaciones adicionales de eritropoyetina local. Las últimas se realizaron de una forma estéril, en una serie de puntos, a través de la película de poliuretano. La película de poliuretano se retiraba, de forma atraumática, siete días después solamente de la operación para evaluar la reepitelialización.

40

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Formulaci3n gelatinosa o viscosa para uso t3pico en el tratamiento de heridas, de quemaduras o de escaldaduras de la piel o de enfermedades cut3neas acompa1adas por heridas cr3nicas, que comprende eritropoyetina (EPO) y al menos un polisac3rido hinchable formador de gel en una concentraci3n de un 2 - 4 % en peso, seleccionado entre el grupo que consiste en
- 10 -- hidroxietilcelulosa
 - hidroximetilcelulosa
 - carboxietilcelulosa
 - carboximetilcelulosa,
- en el que la formulaci3n gelatinosa o viscosa en el estado hinchado
- 15 (i) tiene una viscosidad de 20.000 - 60.000 mPa x s,
(ii) comprende EPO en una concentraci3n de 100 - 500 IU / g,
(iii) se aplica a la piel traumatizada en una cantidad que corresponde a 50 - 1.500 UI de EPO / cm² de 3rea de la herida, y
20 (iv) estabiliza la EPO en la formulaci3n y la libera de manera uniforme y lenta.
2. Formulaci3n para uso de acuerdo con la reivindicaci3n 1, en la que el polisac3rido hinchable formador de gel est3 presente en una concentraci3n de un 2 - 3 % en peso.
- 25 3. Formulaci3n para uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en la que el agente formador de gel es carboximetilcelulosa y est3n presentes 150 UI de EPO / g de formulaci3n gelatinosa para el uso de 1 g de gel / cm² de 3rea de la herida.
- 30 4. Formulaci3n para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 3, en la que 3sta se ha introducido en o sobre una matriz de soporte s3lida.
5. Formulaci3n para uso de acuerdo con la reivindicaci3n 4, en la que la matriz de soporte s3lida es un ap3sito estructurado tridimensionalmente.
- 35 6. Formulaci3n para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 5, en el caso de heridas por quemadura, escaldaduras, heridas isqu3micas cr3nicas y en el 3rea dental.
- 40 7. Formulaci3n para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 6, en la que la formulaci3n se puede obtener mediante la mezcla de EPO en forma liofilizada, disuelta o suspendida con el polisac3rido hinchado previamente que tiene una viscosidad inferior a 5.000 mPa x s.
8. Formulaci3n para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 7, en la que la formulaci3n influye entre un 92 % y un 99 % en la cicatrizaci3n de la herida despu3s de 4 a 8 d3as mediante reepitelizaci3n, en comparaci3n con entre un 85 % y un 87 % en el caso de la misma formulaci3n sin EPO en las mismas condiciones.
- 45 9. Formulaci3n para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 - 8, en la que la formulaci3n comprende un inhibidor de proteinasa o un desinfectante.

Fig. 1

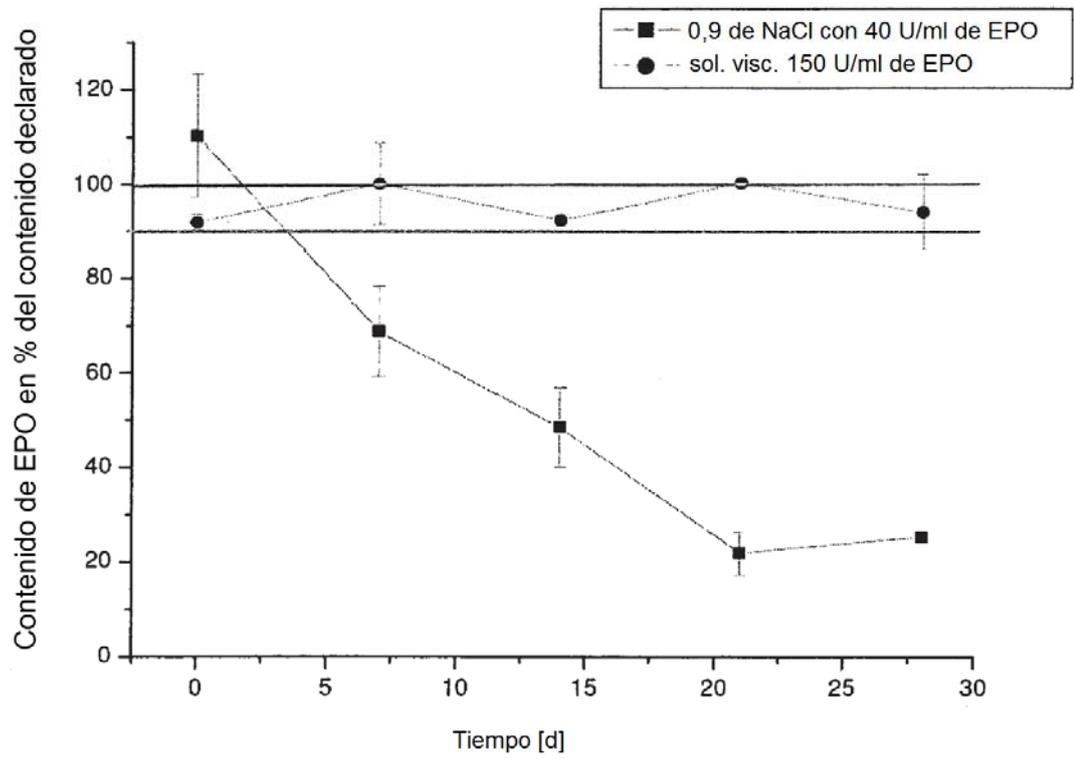


Fig. 2

Reepitelización tras 4 días Hidrogel EF

	Epitelio % F	Epitelio % E
	70,79	71,83
	79,08	81,6
	87,11	100
	94,83	100
		88,86
	100	100
	78,53	95,31
Promedio	85,0586667	91,0857143
Desv. Estándar	10,9990284	10,9692994
	<u>Valor P</u>	0,34499355

Reepitelización tras 4 días Hidrogel EF

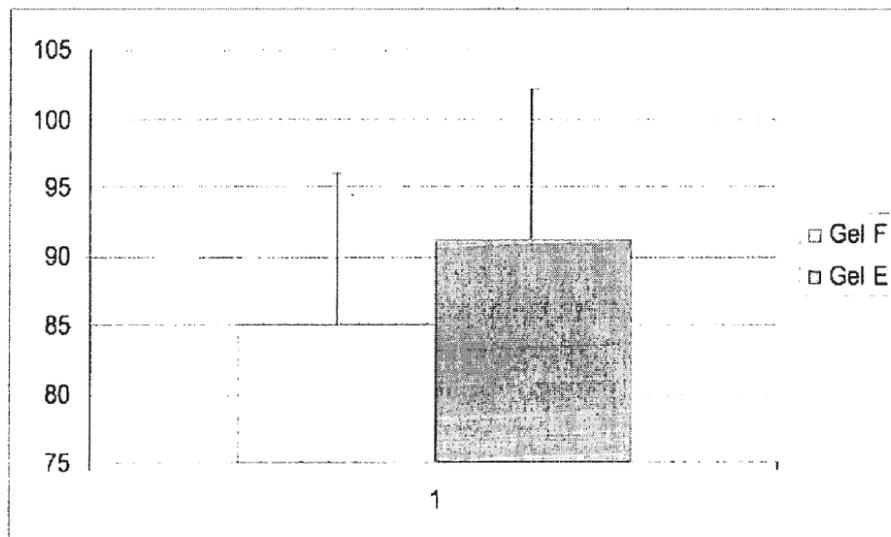


Fig. 3

Reepitelización tras 8 días Gel E/F

	Epitelio % F	Epitelio % E
	83,56	100
	86,92	100
	100	99,13
	100	91,76
	71,27	100
	100	100
		100
	74,28	100
Promedio	88,0042857	98,86125
Desv. Estándar	12,3895868	2,88544345

Valor P 0,03108079

Reepitelización tras 8 días Hidrogel EF

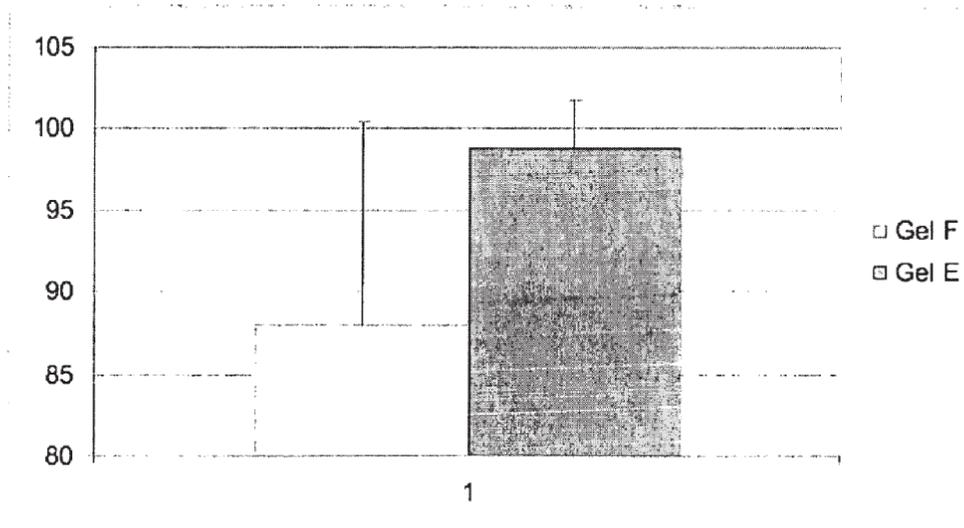


Fig. 4

Aplicación de gel tópica en rata con EPO (izquierda +) sin EPO (derecha -)

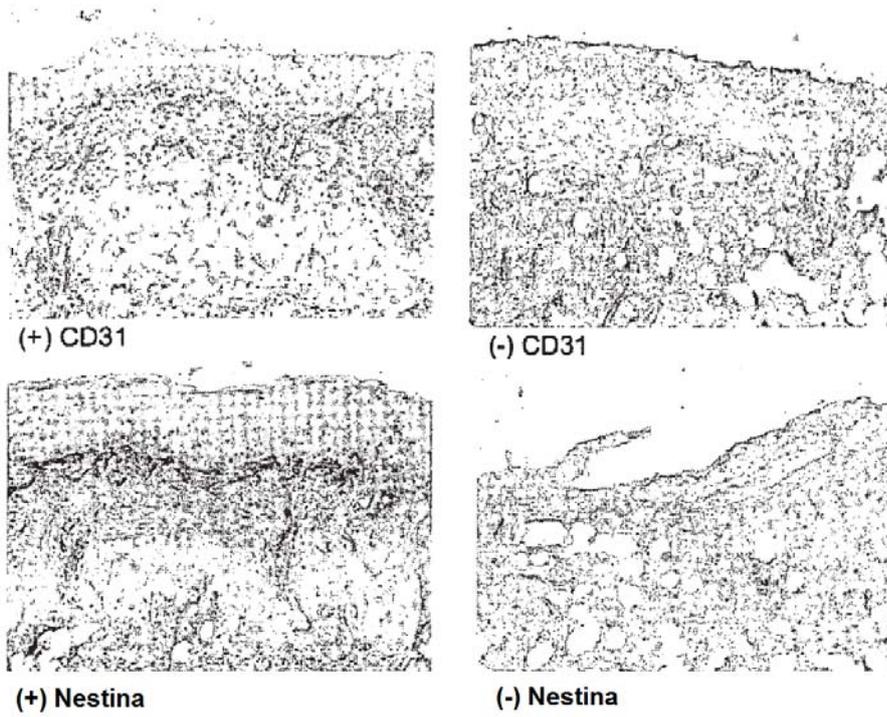
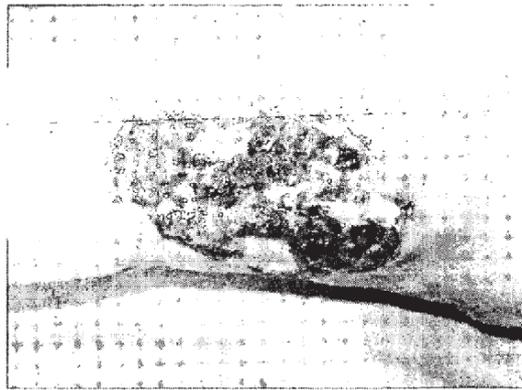


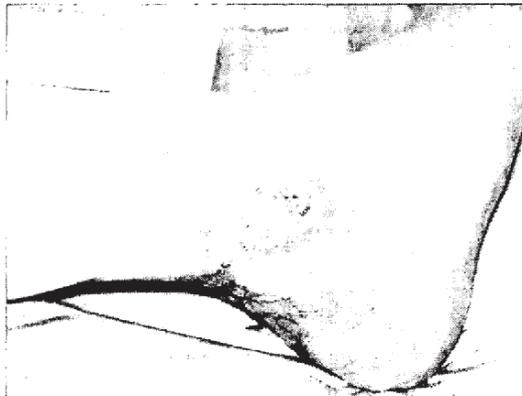
Fig. 5



(a)

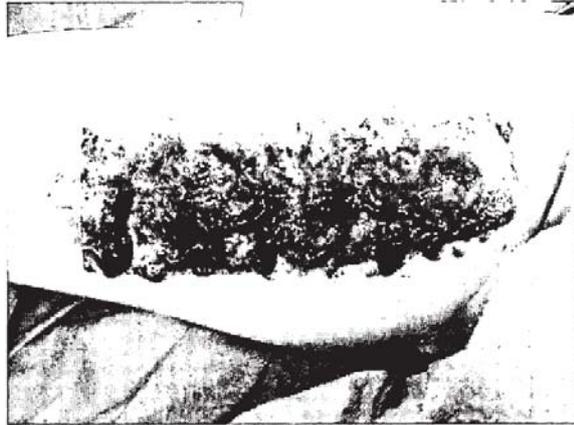


(b)

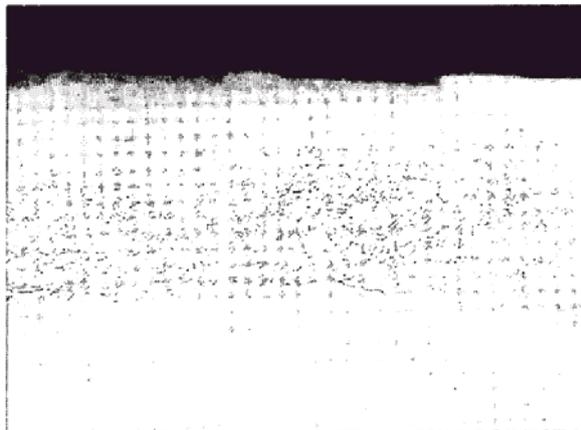


(c)

Fig. 6



(a)



(b)

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2004001023 A [0008]
- WO 2005063965 A [0009]
- WO 2005070450 A [0013] [0018]
- WO 0249673 A [0065]
- WO 0102017 A [0065]
- WO 9640749 A [0065]
- WO 9640772 A [0065]
- WO 0138342 A [0065]
- WO 01091780 A [0065]
- WO 2004101611 A [0065]
- WO 2004100997 A [0065]
- WO 2004101600 A [0065]
- WO 2004101606 A [0065]
- WO 2006050959 A [0065]
- EP 08011985 A [0094]

10

Literatura no patente citada en la descripción

- HAROON. *American J. Pathol.*, 2003, vol. 163, 993 [0010]
- C. HOFFMANN ; C. C. MÜLLER-GOYMANN. Use of artificial skin constructs in permeation studies of clindamycin phosphate. *Pharmazie*, 2005, vol. 60, 350-353 [0106]