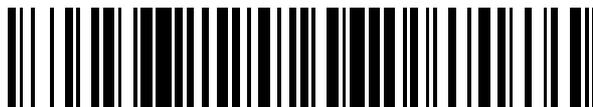


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 726 499**

21 Número de solicitud: 201830343

51 Int. Cl.:

A61F 2/10 (2006.01)

B01D 69/02 (2006.01)

B01D 69/06 (2006.01)

B01D 71/50 (2006.01)

B01D 71/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.04.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.10.2019

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

C/ Serrano, nº 117

28006 Madrid ES

72 Inventor/es:

ALONSO MERINO, Cristina;

CARRER VIVES, Victor;

MARTI GELABERT, Meritxell y

CODERCH NEGRA, M^a Luisa

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **MODELOS DE PIEL BASADOS EN MEMBRANAS ARTIFICIALES CON LANOLINA**

57 Resumen:

Modelos de piel basados en membranas artificiales con lanolina.

La presente invención se refiere a un modelo artificial de piel capaz de simular el comportamiento de la piel natural a nivel de permeación y penetración de compuestos. Este modelo está formado por una membrana polimérica de distinta naturaleza sobre la que se deposita una capa de lanolina. Este modelo artificial de piel es útil para ensayos de permeación y absorción de principios activos farmacológicos o cosméticos.

ES 2 726 499 A1

DESCRIPCIÓN

Modelos de piel basados en membranas artificiales con lanolina

5 La presente invención se refiere a un modelo sintético de piel basado en una membrana artificial de distinta naturaleza sobre la que se ha aplicado una capa de lanolina. Este modelo es útil en ensayos de permeación y absorción de principios activos farmacológicos o cosméticos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La penetración de un principio activo involucra varios procesos: disolución y liberación de la formulación, partición dentro del estrato córneo, difusión a través de él, partición desde el estrato córneo hacia la fase acuosa de la epidermis, difusión a través de la dermis y acceso a la circulación sistémica. En el proceso de absorción percutánea es importante considerar los procesos de penetración, permeación y resorción. Los factores implicados en los procesos de absorción percutánea son de dos tipos: biológicos y fisicoquímicos.

20 Existen diferentes modelos para el estudio de la absorción percutánea: los modelos *in silico*, *in vitro* y los modelos *in vivo*. En los modelos *in silico* se realiza una simulación artificial mediante ecuaciones matemáticas, en los *in vitro* se realiza el ensayo en un medio controlado, fuera del organismo vivo y en los modelos *in vivo* se realiza sobre la piel de rata, cerdo o humana. Aunque el modelo ideal es el de piel natural, ésta presenta dificultades a la hora de conseguirla y es más complicado mantener su integridad durante los procesos de testado de compuestos activos, por lo que es necesario desarrollar modelos que simulen de la mejor manera posible el comportamiento de la piel natural y que faciliten que los resultados sean extrapolables.

30 En el trabajo de Eccleston, G. et al. (*Pharmaceutics* 2010, 2, 209–223), se realizó un estudio comparativo de la difusión y permeación de ibuprofeno a través de diversos tipos de membranas sintéticas, en el que se demostró la gran variabilidad de flujo en función de la membrana escogida para el ensayo.

35 El uso de lípidos de distinta naturaleza para emular los lípidos intracelulares del estrato

córneo es una técnica habitual para crear modelos sintéticos de piel. En el documento US2013/0000394, se presenta un modelo de estrato córneo basado en una mezcla de lípidos (ceramidas, ácido palmítico y colesterol) para evaluar la aspereza cutánea que pueden provocar ciertos compuestos.

5

Otro compuesto de naturaleza lipídica es la lanolina. Se utiliza para favorecer la penetración de principios activos en formulaciones farmacéuticas como describen por ejemplo en el documento US5,492,698. La lanolina forma una capa oclusiva que fuerza al activo a penetrar.

10

Por tanto, existe la necesidad de disponer de modelos artificiales de piel que reproduzcan de la manera más similar posible los mecanismos de absorción y permeación en la piel.

15 **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un modelo artificial de piel que comprende una membrana de naturaleza polimérica y una capa de lanolina depositada sobre la superficie de la membrana.

20

En una realización preferida, la membrana tiene un grosor de entre 1 y 1000 μm .

En una realización preferida, la membrana se selecciona de entre celulosa y derivados, poliamida, poliacronitrilo, polietersulfona, polisulfona, policarbonato, polipropileno o PDMS.

25

En una realización más preferida, la membrana es de policarbonato, como por ejemplo las membranas Nuclepore™. En este caso, el grosor preferible de la membrana es de entre 1 a 500 μm .

30

En otra realización preferida, la membrana es de polietersulfona, como por ejemplo las membranas StraM®. En este caso, el grosor preferible de la membrana es de entre 300 a 1000 μm .

35

En otra realización preferida, la relación en peso lanolina/membrana está entre 10 a

200 mg lanolina/membrana.

En otra realización preferida, la lanolina se ha extraído con fase acuosa.

5 En otra realización preferida, la lanolina se ha extraído con fase orgánica.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención del modelo artificial de piel según descrito anteriormente que comprende las siguientes etapas:

- a) depositar la solución de lanolina sobre la membrana polimérica,
- 10 b) calentar la membrana con lanolina obtenida en (a) a una temperatura de entre 80 y 90°C, en un tiempo de 5 a 15 minutos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o
15 pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Porcentaje de permeación de cafeína a través de la piel y de las membranas de Nuclepore™ sin y con lanolinas al 5%.

25 **FIG. 2.** Porcentaje de permeación de cafeína a través de la piel y de las membranas de Nuclepore™ sin y con lanolinas al 80%.

FIG. 3. Valores promedios de TEWL y desviación estándar para las distintas membranas utilizadas.

30

FIG. 4. Porcentaje de recuperación relativo de lidocaína en membranas Strat-M® y Nuclepore™ con y sin superficie de lanolinas y en piel.

FIG. 5. Porcentaje de recuperación relativo de diclofenaco de sodio en membranas
35 Strat-M® y Nuclepore™ con y sin superficie de lanolinas y en piel.

FIG. 6. Porcentaje de recuperación relativo de betametasona-17,21-dipropionato en membranas Strat-M® y Nuclepore™ con y sin superficie de lanolinas y en piel.

5 **FIG. 7.** Porcentaje de recuperación relativo de los compuestos lidocaína, diclofenaco y betametasona-17,21-dipropionato en piel.

EJEMPLOS

10 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

1. Optimización membranas, mediante TEWL y Cinética de permeación “in vitro”

15 Se prepararon membranas mediante la aplicación de diferentes tipos de extractos de lana sobre la membrana artificial Nuclepore™. Se evaluó la cantidad de lípido depositado y la permeabilidad del agua a través de las membranas como la pérdida transepidérmica de agua (TEWL). La cinética de permeación de un principio activo, en este caso cafeína, se realizó en una membrana de piel o sintética colocada sobre una
20 celda de difusión vertical tipo Hanson (1.77 cm² de área) y un sistema de difusión con el fin de determinar la cantidad del compuesto detectada en el fluido receptor después de una exposición de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 13, 16 y 20 horas. En estos estudios se sigue procedimientos de la FDA-SUPAC SS.

25 1.1 Formación de las membranas / modelos de piel de la invención

Se utilizó como referencia piel porcina dermatomizada con aproximadamente 500 µm de espesor preparándose discos de piel de 2,5 cm de diámetro, envasados al vacío y congelados hasta su utilización.

30

La membrana utilizada fue Nuclepore™, con un diámetro de 25 mm (superficie 5cm²) un tamaño de poro de 0,05 µm y un espesor de 25 µm. A esta membrana artificial se le depositaron tres tipos de mezclas lipídicas provenientes de la lana. Por un lado se depositaron Internal Wool Lipids (IWL) que se extraen de la lana limpia con
35 cloroformo/metanol. También se depositaron dos fracciones de lanolina, una

correspondiente a la lanolina extraída con baños acuosos y tensioactivo (LanA) y otra correspondiente a la extraída con disolvente hexano (LanD) procedente del proyecto LIFE Eco-eficiente Dry Wool Scouring (WDS).

5 Para la preparación de la membrana Nuclepore™ se adaptó la metodología descrita por Pullmannová et al. (*Biophys Chem.* 2017; 224:20-31). Se hidrataron las membranas con hexano/etanol 96% (2:1) y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre una superficie de acero. Se aplicó la solución de lanolinas al 5% y al 80% con lípidos provenientes de la lana en hexano/etanol 96% (2:1) (3x 100 µL) bajo una atmósfera de N₂. Estas membranas se introdujeron en un desecador a vacío y se mantuvieron entre 2 y 6°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo, se colocaron las membranas en una estufa a 85°C en el caso de las lanolinas y 100°C en el caso de los lípidos internos de la lana (temperaturas de transición de los lípidos) durante 10 minutos. Seguidamente se dejaron a temperatura ambiente durante 3 horas y finalmente se mantuvieron en incubación a 32°C durante 24 horas.

Así, para cada tipo de lípido ensayado IWL, LanA y LanD se formaron por triplicado las membranas depositando 300 µL de soluciones de estos lípidos bien al 5% bien al 80% en hexano/etanol 96% (2:1) como se acaba de detallar. Finalizado el proceso de aplicación y fijación de las muestras se procede al pesado de las mismas para determinar la cantidad de lípido superficial adherido a la membrana. (Tabla 1)

1.2 Preparación de las celdas de difusión tipo Franz y Evaluación del TEWL

25 La celda consiste en dos partes: el compartimento superior (dador) donde se aplica la formulación y uno inferior (receptor) donde se recoge el compuesto permeado, separados por la membrana. La parte receptora (7 mL) se llena de agua MilliQ que se mantiene en movimiento mediante la agitación constante de un imán. La celda tiene una camisa por donde circula agua gracias a un baño externo y mantiene una temperatura adecuada para que en la superficie de la membrana sea de 32°C. En el caso de la piel, previamente se descongelaron los discos de piel porcina. Antes de proceder al montaje de la celda de difusión de Franz, se midió el espesor de la piel con un micrómetro digital. El grosor debe ser de 500±50 µm.

35 Se prepararon las celdas con piel porcina o con membranas sintéticas en el baño

termostatzado para que las membranas (piel/artificial) alcanzasen una temperatura de $32\pm 1^{\circ}\text{C}$. Tras el acondicionamiento de las celdas, 1 hora, se midió con una sonda la temperatura y el valor de TEWL de la piel y las membranas. La temperatura de la piel/membranas debe ser de $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ y el valor de TEWL de la piel menor de 15 g/h.m^2 ya que a valores superiores la integridad de la barrera cutánea puede estar comprometida. Los valores de TEWL se mostrarán a continuación.

Membrana	Peso lípido/membrana (mg)	TEWL (g/h.m ²)
Piel	—	8,7
Nuclepore™	—	98,0
Nuclepore™+IWL 5%	14,1	62,2
Nuclepore™+IWL 80%	149,2	56,7
Nuclepore™+LanA 5%	12,7	41,3
Nuclepore™+LanA 80%	128,7	8,0
Nuclepore™+LanD 5%	13,4	15,2
Nuclepore™+LanD 80%	131,8	11,1

Tabla 1. Peso de lípido sobre membrana y pérdida transepidérmica de agua, en la piel, en la membrana Nuclepore™ y membranas con diferentes lanolinas a dos concentraciones.

Cabe destacar la baja permeación de la piel frente a la alta permeación de la membrana Nuclepore™. La adición de IWL disminuye el TEWL hasta 56 g/h.m^2 para la concentración del 80%. Las lanolinas tienen un mayor efecto en la impermeabilidad de la membrana llegando a valores $\leq 15\text{ g/h.m}^2$ para las dos lanolinas a 80% y para LanD para 5%.

1.3 Cinética de permeación "in vitro"

Para estudiar las propiedades de permeación de las diferentes membranas se evaluó el comportamiento de la cafeína, comúnmente empleado en dermatología.

Se preparó una solución de 10 mg/mL de cafeína en $\text{H}_2\text{O/MeOH}$ (1:1) y se depositó 1 mL en la piel o membranas montadas en las células de Franz. Se cogieron alícuotas

de 700µL de fluido receptor a intervalos de 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 13, 16 y 20 horas tras reemplazarse por la misma cantidad de solución receptora a la misma temperatura.

Las muestras extraídas y las formulaciones se analizaron mediante cromatografía
 5 líquida de alta resolución con detector de diodos (HPLC-DAD). En la tabla 2 se
 muestran las condiciones del análisis. El método analítico utilizado para la evaluación
 de los distintos compuestos fue validado en términos de la curva de calibración, límite
 de detección y límite de cuantificación siguiendo directrices de International Council for
 Harmonisation (ICH) 2005. La curva de calibrado se realizó a partir de las disoluciones
 10 estándar de la cafeína a distintas concentraciones, obtenidas a partir de una solución
 inicial de 100 µg/mL. El valor del límite de detección (LDD) es la concentración más
 baja que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar. Se obtuvo mediante
 el cociente de la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de
 calibrado a bajas concentraciones de cafeína multiplicado por 3. El límite de
 15 cuantificación (LDQ) se obtuvo mediante el cociente de la desviación estándar de la
 respuesta y la pendiente de la recta de calibrado a bajas concentraciones de cafeína
 multiplicado por 10.

Compuesto	Cafeína
Columna	LiChrocart ® 125-4 LiChrosphere® 100 RP-18 5µm
Longitud de onda	271 nm
Volumen inyectado	20 µL
Fase móvil	75% H ₂ O MilliQ 25% MeOH
Solvente preparación	MeOH:H ₂ O (1:1)
Tiempo de retención	8 min
Recta de calibrado	Y= 15876·[Cafeína]+2136.9
LDQ / LDD (µg/mL)	2.20 / 0.66

20 Tabla 2. Condiciones cromatográficas en la cuantificación de la cafeína, recta de

calibrado y límite de cuantificación.

Tras el análisis de las alícuotas con el método especificado, se evalúa la cantidad permeada para obtener la gráfica de permeación. Así se obtiene para cada experimento la Kp (el coeficiente de permeabilidad de la membrana, que determina la velocidad a la cual la sustancia atraviesa la membrana), AUC (el área bajo la curva, que define la cantidad total de sustancia permeada) y Cmax (la concentración máxima de permeación de la sustancia) y el flujo (cantidad de compuesto que atraviesa la superficie de piel o membrana por unidad de tiempo). Las medias de tres experimentos para cada tipo de membrana se detallan en la tabla 3. Las curvas de permeación de la cafeína se pueden visualizar en la Figura 1, para piel y membranas Nuclepore™ sin y con lanolinas al 5%, y en la Figura 2, para piel y membranas Nuclepore™ sin y con lanolinas al 80%..

Membrana	Kp (cm/h)	AUC	Cmax (µg/mL)	Flujo (µg/cm²)
Piel	0,001	22,7	8,2	10,5
Nuclepore™	0,131	18.134,2	1085,5	1.887,3
Nuclepore™+IWL 5%	0,099	9.157,2	588,7	1.218,5
Nuclepore™+IWL 80%	0,110	8.501,7	499,3	1.396,9
Nuclepore™+LanA 5%	0,041	13.954,14	781,1	539,76
Nuclepore™+LanA 80%	0,005	1.826,0	113,8	182,5
Nuclepore™+LanD 5%	0,001	174,8	18,4	20,3
Nuclepore™+LanD 80%	0,006	679,4	42,1	61,1

Tabla 3. Parámetros de permeación de la cafeína a través de la piel, membranas sin lanolina y membranas con diferentes lanolinas a dos concentraciones.

En las cinéticas de permeación se evalúan los parámetros de permeación ya mencionados de la cafeína en piel, Nuclepore™ y Nuclepore™ con IWL (lípidos internos de la lana) y lanolina de dos tipos, LanA que es la acuosa comercial normal y la LanD que es la extraída con disolvente orgánico. La piel tiene unos valores de permeación muy bajos, sobre todo si se compara con la membrana Nuclepore™ sola, por lo que, cuanto menores sean los parámetros de permeación, más se parecerán a los resultados de la piel. Se observa que la permeación disminuye en algo cuando se

aplican IWL, pero sobre todo disminuye al aplicar las dos lanolinas, haciendo estas últimas muy parecidas a la piel. Al preparar las membranas se han depositado dos concentraciones diferentes de solución de lanolina, 5% y 80%. Mientras que la LanA necesita el 80% para obtener una impermeabilidad similar a la piel (Figura 2), se puede observar que la LanD al 5% presenta unos valores muy bajos de permeabilidad, muy parecidos a los de la piel (Figura 1).

Como conclusión de la optimización del tipo de lípido y su cantidad depositada sobre la membrana, cabe destacar la importante disminución de la permeabilidad del agua en el caso de las dos lanolinas a 80% y de LanD al 5%. Así mismo, la cinética de permeación de la cafeína indica una impermeabilidad mayor de la LanD, sobre todo a la concentración menor testada. Por ello, LanD al 5% fue la formulación escogida para ser depositada sobre Nuclepore™ y otro tipo de membrana (Strat-M®) y evaluar la penetración de activos con diferentes propiedades físico-químicas en comparación con la piel porcina.

2. Optimización membranas, mediante TEWL y Absorción percutánea “in vitro”

Se prepararon membranas mediante la aplicación del extracto LanD a la concentración de 5% sobre dos tipos de membrana, Nuclepore™ y Strat-M®. Se evaluó la cantidad de lípido depositado y la permeabilidad del agua a través de las membranas, como la pérdida transepidérmica de agua (TEWL). Se determinó la absorción percutánea de diferentes activos, como lidocaína, diclofenaco de sodio y betametasona-17,21-dipropionato con diferentes propiedades de permeabilidad, en una membrana de piel o sintética con o sin lanolinas, colocada sobre celdas de difusión vertical tipo Franz (3 mL, 1,86 cm² de área). Con estas celdas de difusión es posible determinar la cantidad de compuesto que ha difundido a través de la piel. En estos estudios se siguen procedimientos de la OCDE.

2.1. Formación de las membranas / modelos de piel de la invención

Se utilizó como referencia piel porcina dermatomizada con aproximadamente 500 µm de espesor preparándose discos de piel de 2,5 cm de diámetro, envasados al vacío y se congelaron hasta su utilización.

35

En este caso se han utilizado dos tipos de membranas artificiales: Strat-M® (Merck, Millipore) y Whatman®Nuclepore™ (Merck, Millipore). La lanolina utilizada LanD procede del proyecto LIFE Eco-eficiente Dry Wool Scouring (WDS). La lanolina LanD se extrajo con hexano en una planta piloto. En el laboratorio se evaporó el disolvente hasta sequedad en un rotavapor a 35°C y se eliminó la humedad de la lanolina en un desecador con pentóxido de fósforo hasta obtener un peso constante. Esta lanolina demostró tener un contenido lipídico más polar que la lanolina obtenida en medio acuoso y ser más efectiva en aplicaciones tópicas por ser más parecida a los lípidos presentes en el estrato córneo de la piel humana.

La lanolina que se aplicó sobre las membranas fue una disolución de LanD al 5% en hexano/etanol 96% (2:1). Se realizó la valoración del pH de la lanolina sobre una superficie plana de plástico en la cual se aplicó una fina capa de lanolina WDS y se midió el valor del pH con un pH metro. El valor de pH de la lanolina WDS fue de 6,1.

Para la preparación de la membrana Strat-M® en primer lugar se preparó la solución de lanolina al 5% en hexano/etanol 96% (2:1). Se depositaron 3 veces 100 µL de dicha solución sobre la superficie de la membrana bajo un flujo de N₂. Seguidamente se llevaron las membranas a una temperatura de 85°C durante 10 minutos para una óptima fijación de los lípidos a la membrana. Para la preparación de la membrana Nuclepore™ se llevó a cabo la metodología descrita en 1.1.

Así, para cada tipo de membrana Nuclepore™ y Strat-M® se formaron por triplicado las membranas depositando 300 µL de soluciones de LanD al 5% en hexano/etanol 96% (2:1) como se acaba de detallar. Finalizado el proceso de aplicación y fijación de las muestras se procede al pesado de las mismas para determinar la cantidad de lípido superficial adherido a la membrana. (Tabla 4)

2.2 Preparación de las celdas de difusión tipo Franz y Evaluación del TEWL

El estudio *in vitro* se realizó con membranas de piel porcina y membranas artificiales, colocadas en celdas de difusión vertical de tipo Franz (3 mL, 1,86 cm² de área). Con estas celdas de difusión es posible determinar la cantidad de compuesto que ha difundido a través de la piel. La celda de Franz está formada por dos partes, la cámara superior (dadora) y la cámara inferior (receptora). Entre ellas se coloca la membrana

(piel/artificial) y las dos cámaras se mantienen unidas mediante una pinza. Sobre la parte dadora se aplica la muestra objeto de estudio y en la parte receptora se encuentra el líquido, en este caso fluido receptor. La cámara inferior posee un brazo de muestreo lateral por donde se recoge el fluido receptor que posteriormente se analizará. La celda se encuentra sumergida en un baño termostatzado para mantener la temperatura constante durante todo el experimento. Tras finalizar el tiempo de exposición, la membrana (piel/artificial) se procesa para determinar la cantidad de compuesto que ha penetrado en cada una de ellas.

En el caso de la piel, previamente se descongelaron los discos de piel porcina. Antes de proceder al montaje de la celda de difusión de Franz, se midió el espesor de la piel con un micrómetro digital. El grosor deber ser de $500 \pm 50 \mu\text{m}$.

Se prepararon las celdas con piel porcina o con membranas sintéticas en el baño termostatzado para que las membranas (piel/artificial) alcanzasen una temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$. Tras el acondicionamiento de las celdas, 1 hora, se midió con una sonda la temperatura y el valor de TEWL de la piel y las membranas. La temperatura de la piel/membranas debe ser de $32 \pm 1^\circ\text{C}$ y el valor de TEWL de la piel menor de 15 g/hm^2 ya que a valores superiores la integridad de la barrera cutánea puede estar comprometida. Los valores de TEWL se muestran a continuación en la tabla 4 y en la Figura 3.

Membrana	Peso lanolina/membrana (mg)	TEWL (g/h.m2)
Piel	—	$8,9 \pm 3,7$
Strat-M®	—	$31,7 \pm 6,9$
Strat-M®+LanD	$17,5 \pm 2,6$	$15,3 \pm 4,3$
Nuclepore™	—	$96,7 \pm 6,0$
Nuclepore™+LanD	$14,2 \pm 2,9$	$14,7 \pm 3,6$

Tabla 4. Peso de lanolina sobre membrana y pérdida transepidérmica de agua, en la piel, en la membrana Nuclepore™ y membranas con diferentes lanolinas a dos concentraciones.

Se observa la baja permeabilidad del agua de la piel en contraste con la gran

permeabilidad de las membranas, sobre todo Nuclepore™. La adición de LanD que equivale a unos 17 mg/membrana para StratM y 14 mg/membrana para Nuclepore™ provoca una disminución de la permeabilidad hasta valores del 15 g/h.m².

5 2.3 Absorción percutánea “in vitro”

Para estudiar las semejanzas y diferencias de las distintas membranas se estudió la permeabilidad de tres compuestos comúnmente empleados en dermatología: lidocaína, diclofenaco de sodio y betametasona-17,21-dipropionato.

10

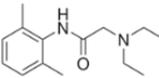
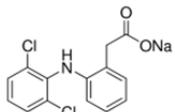
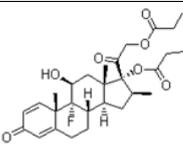
Compuesto	Log D a pH 5,5	Log D a pH 7,4	Peso molecular (g/mol)
 Lidocaína	0,61	2,33	234,34
 Diclofenaco sódico	2,75	1,1	318,14
 Betametasona 17,21-dipropionato	3,96	3,96	504,59

Tabla 5: Compuestos estudiados en la absorción percutánea

En la Tabla 5 se detallan dos propiedades físico-químicas de gran influencia en la difusión a través de membranas: el coeficiente de distribución octanol/agua (Log D) y el peso molecular. El Log D ofrece información sobre la lipofilicidad de una molécula a cierto pH. Se consideraron de especial interés los Log D a pH 5,5 (pH de la piel) y a pH 7,4 (pH fisiológico). En este caso particular, los activos para ser absorbidos en la piel deben difundir por la matriz lipídica presente en el estrato córneo. Por otro lado, el peso molecular también influye en la absorción de moléculas en la piel, dificultándola en aquellas de más peso molecular.

15

20

Las muestras extraídas y las formulaciones se analizaron mediante HPLC-DAD. En la tabla 6 se muestran las condiciones del análisis. El método analítico utilizado para la

5 evaluación de los distintos compuestos fue validado en términos de la curva de calibración, límite de detección y límite de cuantificación. Las curvas de calibrado se realizaron a partir de las disoluciones estándar de los activos a distintas concentraciones, obtenidas a partir de una solución inicial de 100 µg/mL. El valor del límite de detección (LDD) es la concentración más baja que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar. Se obtuvo visualmente a partir de los cromatogramas. El límite de cuantificación (LDQ) se obtuvo a partir de la representación del porcentaje de Desviación Estándar Relativa (% DSR) de las áreas de las concentraciones más bajas de estándar, inyectadas tres veces. Se ha aceptado un valor de DSR menor al 5%.

10

Compuesto	Lidocaína	Diclofenaco de sodio	Betametasona-17,21-dipropionato
Columna	LiChrocart® 125-4 LiChrosphere® 100 RP-18 5µm	LiChrocart® 250-4 LiChrosphere® 100 RP-18 5µm	LiChrocart® 250-4 LiChrosphere® 100 RP-18 5µm
Longitud de onda	205 nm	254 nm	239 nm
Volumen inyectado	20 µL	20 µL	20 µL
Fase móvil	70% Tampón fosfato pH=7 30% ACN	66% MeOH 34% H ₃ PO ₄ 0,7%	73% MeOH 27% H ₂ O
Solvente preparación/extracción	MeOH	ACN-TFA 0,5 %	MeOH
Tiempo de retención	18 min	16 min	11 min
Recta de calibrado	Área=414046[con]-68532	Área=80050[con]-24848	Área=181141[con]+47781
R²	0.9999	0.9997	0.9999

LDQ / LDD ($\mu\text{g/mL}$)	0,384 / 0,080	0,784 / 0,080	0,380 / 0,080
--	---------------	---------------	---------------

Tabla 6. Condiciones cromatográficas en la cuantificación de los compuestos, recta de calibrado y límite de cuantificación.

5 Una vez que la piel y las membranas se encontraban en las condiciones necesarias ($32\pm 1^\circ\text{C}$ y $\text{TEWL} < 15 \text{ g/hm}^2$ y $32\pm 1^\circ\text{C}$ respectivamente), se aplicaron 20 μL de la solución del compuesto a estudiar sobre la superficie de la membrana (piel/artificial) con una micropipeta. Esta solución se dejó durante 24 horas en contacto con la piel y las membranas. Transcurrido el tiempo, se realizó el desmontaje de las celdas. Se
10 recolectó el fluido receptor con una pipeta Pasteur a través del brazo de la cámara receptora de la celda y se introdujo en un matraz de 5 mL.

En el caso de la piel, se realizó por triplicado el lavado de la superficie de la piel con una solución acuosa de texapón 0,2% (500 μL), añadiendo la solución y recogiendo la
15 tres veces sin cambiar de punta de la pipeta y secando posteriormente la piel con bastoncillo de algodón. Todas las puntas de pipeta, alícuotas de lavado, bastoncillos de algodón y la parte superior de la celda de Franz se recogieron en un bote para la posterior extracción y análisis del compuesto. Para la separación del estrato córneo, se realizaron 8 “strippings” de la superficie de la piel con discos adhesivos “strips”. El
20 primer disco se añadió al bote donde se encontraban las fracciones de lavado. Los 7 “strips” restantes se dividieron en grupos del 2-4 y del 5-8 y se introdujeron en dos viales para la posterior extracción del compuesto. Para la obtención de dermis y epidermis, se colocó la biopsia de piel tras realizar el “stripping” sobre una placa calefactora a 80°C durante diez segundos. Tras esto, con unas pinzas, se separó la
25 epidermis de la dermis. La epidermis y la dermis se guardaron en sendos viales para la extracción del compuesto y su análisis.

La extracción de los principios activos de las membranas y de los distintos estratos de la piel, se realizó con metanol en el caso de lidocaína y betametasona y con ACN-TFA
30 0,5% en el caso del diclofenaco (Tabla 6). La cantidad de disolvente extractor utilizado para el lavado de la superficie de la piel o membrana fueron 10 mL, para el estrato córneo 2 mL, para la epidermis 1 mL y finalmente para la dermis 1 mL. Tras permanecer una noche en contacto con el disolvente extractor, las muestras se

agitaron en vaivén durante 30 minutos y se sonicaron las muestras de los compartimentos de piel durante 15 minutos. Los extractos se filtraron con filtros de Nylon con un tamaño de poro 0,45 µm en viales y se analizaron mediante HPLC-DAD. Las condiciones utilizadas se encuentran indicadas en la tabla 6.

5

Los resultados que a continuación se presentan se basan en la evaluación de la pérdida transdérmica de agua de la piel y las membranas y la evaluación de la absorción percutánea mediante la metodología “in vitro” con celdas de Franz así mismo, a través de la piel o las membranas, de los tres compuestos lidocaína, diclofenaco de sodio y betametasona -17,21- dipropionato. La siguiente tabla muestra las concentraciones teóricas y reales obtenidas para la preparación de las formulaciones en propilenglicol.

10

Compuesto	Lidocaína	Diclofenaco de sodio	Betametasona-17,21-dipropionato
Concentración teórica	2,00 %	0,50 %	1,00 %
Concentración real	1,84 %	0,49 %	0,79 %

15

Tabla 7. Resultados de las extracciones de los tres compuestos.

Se utilizaron estas concentraciones reales para evaluar la permeación de los compuestos tanto en membrana artificial como en piel.

2.3.1 Resultados de permeación de lidocaína 2%

20

Lidocaína 2%/Piel		
Piel	% recuperación	µg recuperados
	MEDIA	MEDIA
Lavado (W)	28,62	105,33
Estrato Córneo (SC)	4,01	14,77
Epidermis (E)	3,67	13,50
Dermis (D)	2,20	8,09

Fluido Receptor (FR)	37,64	138,52
TOTAL	76,14	280,21
Absorción percutánea (E+D+FR)	43,51	160,11

Tabla 8. Porcentaje de recuperación absoluto y µg recuperados de lidocaína en piel.

Lidocaína/ Strat-M®	Lidocaína 2%/Strat-M®		Lidocaína 2% Strat-M® con lanolina	
	% recuperación	µg recuperados	% recuperación	µg recuperados
	MEDIA	MEDIA	MEDIA	MEDIA
Membrana (M)	59,84	217,30	33,11	101,33
Fluido Receptor (FR)	20,15	74,15	72,34	221,39
TOTAL	79,99	291,45	105,45	322,73
Absorción Percutánea (FR)	20,15	74,15	72,34	221,39

5

Tabla 9. Porcentaje de recuperación absoluto y µg recuperados de lidocaína en membrana Strat-M® sola o con lanolina

Lidocaína/ Nuclepore™	Lidocaína 2%/Nuclepore™		Lidocaína 2% Nuclepore™ con lanolina	
	% recuperación	µg recuperados	% recuperación	µg recuperados
	MEDIA	MEDIA	MEDIA	MEDIA
Membrana (M)	1,82	5,57	10,23	31,31
Fluido Receptor (FR)	114,48	350,36	102,42	313,45
TOTAL	116,30	355,93	112,65	344,76
Absorción Percutánea (FR)	114,48	350,36	102,42	313,45

10

Tabla 10. Porcentaje de recuperación absoluto y µg recuperados de lidocaína en membrana Strat-M® sola o con lanolina

Comparando la piel y las membranas artificiales, se puede observar que se obtienen

valores muy distintos (Figura 4). En el caso de la piel, la lidocaína penetra mucho obteniéndose un elevado porcentaje en el fluido receptor. En el caso de las membranas, los resultados son muy diferentes. En la membrana Strat-M® observamos una permeación que aumenta al añadir lanolina en su superficie. En cambio, la membrana Nuclepore™ permite una permeación casi total de la lidocaína que disminuye ligeramente con la presencia de lanolina.

2.3.2. Resultados de permeación de diclofenaco de sodio 0,5 %

10

Diclofenaco Sódico 0,5%/Piel		
Piel	% recuperación	µg recuperados
	MEDIA	MEDIA
Lavado (W)	79,33	77,89
Estrato Córneo (SC)	11,30	11,09
Epidermis (E)	8,25	8,10
Dermis (D)	2,00	1,96
Fluido Receptor (FR)	12,92	12,68
TOTAL	113,80	111,72
Absorción percutánea (E+D+FR)	23,17	22,75

Tabla 11. Porcentaje de recuperación absoluto y µg recuperados de diclofenaco de sodio en piel.

15

Diclofenaco/ Strat-M®	Diclofenaco Sódico 0,5%/Strat-M®		Diclofenaco Sódico 0,5%/Strat-M® con lanolina	
	% recuperación	µg recuperados	% recuperación	µg recuperados
	MEDIA	MEDIA	MEDIA	MEDIA
Membrana (M)	46,48	45,63	49,83	40,42
Fluido Receptor (FR)	44,26	43,45	41,45	33,62
TOTAL	90,74	89,09	91,28	74,03
Absorción Percutánea (FR)	44,26	43,45	41,45	33,62

Tabla 12. Porcentaje de recuperación absoluto y μg recuperados de diclofenaco de sodio en membrana Strat-M® sola o con lanolina

Diclofenaco/ Nuclepore™	Diclofenaco Sódico 0,5%/Nuclepore™		Diclofenaco Sódico 0,5%/Nuclepore™ con lanolina	
	% recuperación	μg recuperados	% recuperación	μg recuperados
	MEDIA	MEDIA	MEDIA	MEDIA
Membrana (M)	5,44	4,4	58,03	47,06
Fluido Receptor (FR)	94,56	76,85	24,14	19,58
TOTAL	100	81,25	82,17	66,64
Absorción Percutánea (FR)	94,56	76,85	24,14	19,58

5

Tabla 13. Porcentaje de recuperación absoluto y μg recuperados de diclofenaco de sodio en membrana Nuclepore™ sola o con lanolina

Los resultados muestran que la permeación del diclofenaco en piel es parecida en Strat-M®, Strat-M®+lanolina y Nuclepore™+lanolina, mientras que Nuclepore™ es altamente permeable (Figura 5). La incorporación de lanolinas a Strat-M® y Nuclepore™ ha modificado los valores de absorción especialmente en este último. Al añadir las lanolinas, la permeabilidad del diclofenaco se ve reducida equiparándola a los valores obtenidos en piel. Hay dos posibles motivos que pueden favorecer la alta permeabilidad del diclofenaco sódico. Por un lado su elevada hidrosolubilidad y por otro su bajo peso molecular, propiedades que mejoran su afinidad hacia el fluido receptor.

15

20

2.3.3. Resultados de permeación de betametasona-17,21-dipropionato al 1%

Betametasona 1%/Piel		
Piel	% recuperación	μg recuperados
	MEDIA	MEDIA
Lavado (W)	73,04	115,24
Estrato Córneo (SC)	11,85	18,69
Epidermis (E)	4,46	5,67
Dermis (D)	0,01	0,01

Fluido Receptor (FR)	0,00	0,00
TOTAL	89,35	139,61
Absorción percutánea (E+D+FR)	4,47	1,89

Tabla 14. Porcentaje de recuperación y µg recuperados de betametasona 17,21-dipropionato en piel.

5

Betametasona/ Strat-M®	Betametasona 1%/Strat-M®		Betametasona 1%/Strat-M® con lanolina	
	% recuperación	µg recuperados	% recuperación	µg recuperados
	MEDIA	MEDIA	MEDIA	MEDIA
Membrana (M)	80,48	66,63	90,66	95,48
Fluido Receptor (FR)	0,67	0,57	3,81	4,04
TOTAL	81,15	67,20	94,47	99,52
Absorción Percutánea (FR)	0,67	0,57	3,81	4,04

Tabla 15. Porcentaje de recuperación absoluto y µg recuperados de betametasona 17,21-dipropionato en membrana Strat-M® sola o con lanolina

Betametasona/ Nuclepore™	Betametasona 1%/Nuclepore™		Betametasona 1%/Nuclepore™ con lanolina	
	% recuperación	µg recuperados	% recuperación	µg recuperados
	MEDIA	MEDIA	MEDIA	MEDIA
Membrana (M)	83,09	91,85	77,04	85,17
Fluido Receptor (FR)	8,1	8,96	9,09	10,05
TOTAL	91,19	100,81	86,13	95,22
Absorción Percutánea (FR)	8,1	8,96	9,09	10,05

10

Tabla 16. Porcentaje de recuperación absoluto y µg recuperados de betametasona 17,21-dipropionato en membrana Nuclepore™ sólo o con lanolina

15 En este caso es importante resaltar la baja permeación de la betametasona en todas las membranas utilizadas (Figura 6). La betametasona es la sustancia más hidrófoba y

de mayor peso molecular de las tres seleccionadas. Ambas propiedades hacen que esta sustancia tenga una baja afinidad para el fluido receptor, hecho que puede dificultar su difusión a través de las membranas. Al añadir la lanolina a las membranas Nuclepore™ y Strat-M® se aumenta levemente la absorción respecto a las membranas sin lanolina. Este fenómeno puede deberse al contenidos de lípidos polares que pueden actuar como cosolvente de la betametasona, ayudando a su solubilización y mayor afinidad en el fluido receptor.

2.4. Discusión de los resultados de la optimización membranas, mediante TEWL y absorción percutánea “in vitro”

La pérdida de agua a través de la piel es un valor indicativo de la integridad de la membrana y de su permeabilidad. En este ejemplo (2.1), los valores de TEWL se han determinado para todas las membranas utilizadas como la media de los valores de todas ella (Figura 3). En la tabla 4 puede observarse que se obtuvo una baja desviación estándar para todos los tipos de membranas estudiadas. Este hecho es importante, ya que indica tanto una homogeneidad respecto a la integridad de las biopsias de piel empleadas, como una homogeneidad y estabilidad de las membranas comerciales (Nuclepore™ y Strat-M®) y las propuestas en éste trabajo (Nuclepore™+lanolina y Strat-M®+lanolina).

Los valores de TEWL obtenidos en las membranas de piel demuestran la integridad de la barrera cutánea de acuerdo a las especificaciones de la OCDE y su aptitud para el ensayo en celdas de Franz. Respecto las dos membranas artificiales, se puede constatar que poseen una menor función barrera, sobre todo para la membrana Nuclepore™.

El objetivo de añadir lanolina WDS 5% sobre la superficie de las membranas comerciales es aumentar su función barrera. Incorporando la lanolina, se emula la matriz lipídica presente en el estrato córneo. El resultado ha sido una importante reducción de los valores de TEWL, hecho que indica un aumento de la función barrera. Así se consigue para las dos membranas con lanolina, un valor medio de $\approx 15 \text{ g/h.m}^2$ que es aceptable para la utilización como modelo de membrana en la absorción percutánea.

Al comparar los tres principios activos aplicados en piel, se puede observar una alta

permeabilidad para la lidocaína, una permeabilidad intermedia para el diclofenaco
sódico, seguida de una baja permeabilidad para la betametasona. Considerando las
propiedades fisicoquímicas y que el pH de la piel es de 5.5, podemos ver cómo los
compuestos penetran más conforme a una disminución de su peso molecular y de su
5 valor de Log D a dicho pH (Figura 7).

La molécula de lidocaína, a pH 5.5 presenta una mayor afinidad hacia el fluido
receptor debido a su hidrofiliidad. A este pH el diclofenaco sódico es el siguiente en
permeabilidad, es más hidrófobo que la lidocaína, encontrándose hasta un 10 % en
10 epidermis y dermis. La betametasona es el compuesto más hidrófobo de los tres y su
mayor tamaño molecular hace que se encuentre este compuesto sólo en el estrato
córneo y en la epidermis.

Comparando la piel con los dos tipos de membranas sin lanolinas cabe constatar que
15 la membrana Strat-M® es más parecida a la piel (Figuras 4,5,6) ya que en la
membrana Nuclepore™ se obtienen permeabilidades mucho más altas para
diclofenaco de sodio y lidocaína (Figuras 4,5). Sin embargo, las dos membranas
discriminan bien el compuesto betametasona obteniéndose una permeabilidad inferior
a los otros dos principios activos.

20 Tal y como hemos visto es de especial importancia la hidrofiliidad de las sustancias y
su afinidad al fluido receptor. Cuando se emplean las membranas Nuclepore™ y Strat-
M® sin lanolinas, los compuestos se aplicaron en un medio de pH 7.4 ya que dichas
membranas se hidrataron con el fluido receptor a este pH. Por lo tanto, se debe
25 considerar el valor de log D a pH 7.4 de los compuestos, siendo a este pH el
compuesto más hidrofílico el diclofenaco y el más lipófilo la betametasona. De este
modo podemos ver que la sustancia más hidrófila es la más absorbida y la más lipófila
es la menos absorbida, igual que los resultados observados en piel. En el caso de
Nuclepore™ estas diferencias entre las lipoficiidades de lidocaína y diclofenaco son
30 difícilmente apreciables pues los valores de permeabilidad son más elevados.

En el caso de las membranas con lanolina, la sustancia más permeada en ambos
modelos (Strat-M®+ lanolina y Nuclepore™+lanolina) es la lidocaína, seguida por el
diclofenaco de sodio y finalmente la betametasona. Este cambio respecto a Strat-M® y
35 Nuclepore™ sin lanolinas puede ser debido al cambio de pH causado por la

incorporación de lanolinas. Las lanolinas son sustancias que contienen ácidos grasos que acidifican levemente el medio en el que se encuentran los principios activos. Este cambio de pH conlleva cambios importantes en la lipofilicidad de los compuestos no neutros: lidocaína y diclofenaco. A pH ácido el log D de la lidocaína (log D=0,61) es menor que el del diclofenaco de sodio (log D=2,75) y la betametasona (log D=3,96). Como hemos visto hasta ahora las sustancias con mayor penetración son las más hidrofílicas (log D menor), dicho comportamiento se mantiene también ahora pues la sustancias más absorbida en la membrana Nuclepore™+lanolina y Strat-M®+lano es la lidocaína seguida por el diclofenaco y la betametasona. De este modo al añadir la lanolina obtenemos unos rangos de permeabilidad para los tres principios activos mucho más parecidos a los obtenidos en piel.

Así pues, la inclusión de lanolina en las membranas modula la permeación para los principios activos. En la membrana Strat-M® se incrementa la permeabilidad de la lidocaína y de la betametasona sin modificar la del diclofenaco de sodio. Para la membrana Nuclepore™, aumenta ligeramente la permeabilidad del compuesto más hidrófobo y de mayor peso molecular, betametasona, y disminuye la permeación para el resto de activos. La permeabilidad de la membrana Strat-M® que ya está pensada como modelo de la piel se ve favorecida por la adición de la lanolina incrementando la permeabilidad de la lidocaína y betametasona sin modificar la del diclofenaco.

REIVINDICACIONES

1. Modelo artificial de piel que comprende una membrana de naturaleza polimérica y una capa de lanolina depositada sobre la superficie de la membrana.
5
2. Modelo según la reivindicación 1 donde la membrana tiene un grosor de entre 1 y 1000 μm .
3. Modelo según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la membrana se selecciona de entre celulosa y derivados, poliamida, poliacronitrilo, polietersulfona, polisulfona, policarbonato, polipropileno o PDMS.
10
4. Modelo según la reivindicación 3, donde la membrana es de policarbonato.
5. Modelo según la reivindicación 4, donde la membrana de policarbonato tiene un grosor de entre 1 a 500 μm .
15
6. Modelo según la reivindicación 3, donde la membrana es de polietersulfona.
7. Modelo según la reivindicación 6, donde la membrana de polietersulfona tiene un grosor de entre 300 a 1000 μm .
20
8. Modelo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la relación en peso lanolina/membrana está entre 10 a 200 mg lanolina/membrana.
9. Modelo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la lanolina se ha extraído con fase acuosa.
25
10. Modelo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la lanolina se ha extraído con fase orgánica.
30
11. Procedimiento de obtención del modelo artificial de piel según la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas:
35
 - a) depositar la solución de lanolina sobre la membrana polimérica,
 - b) calentar la membrana con lanolina obtenida en (a) a una temperatura de entre 80 y 90°C, en un tiempo de 5 a 15 minutos.

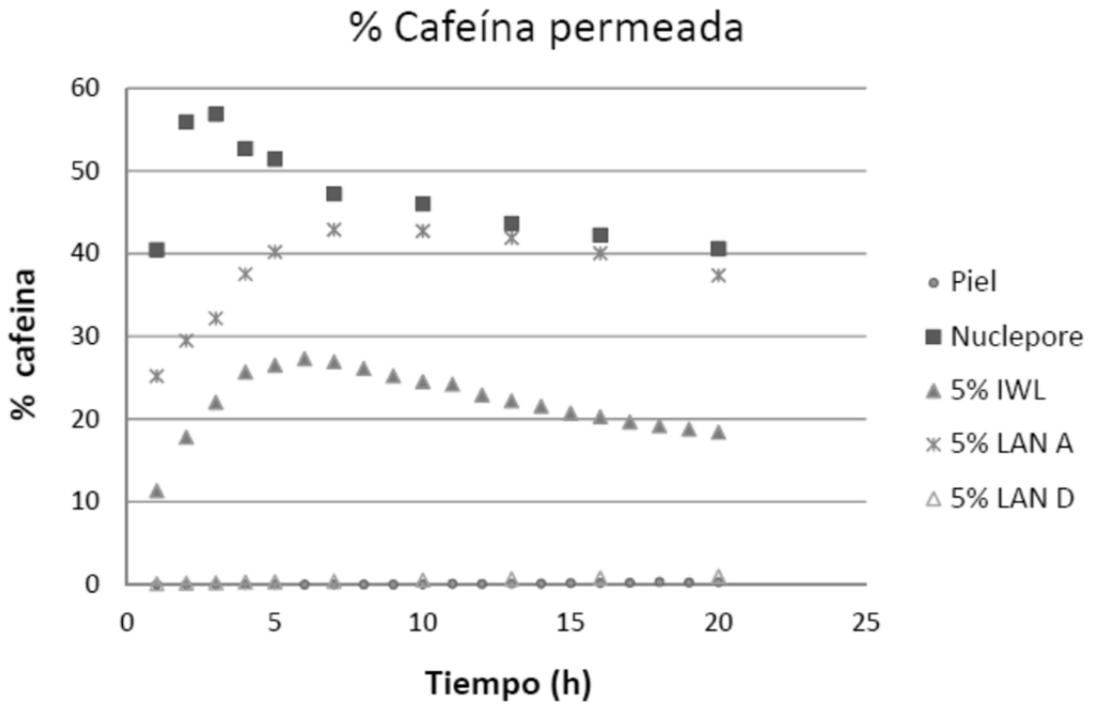


FIG. 1

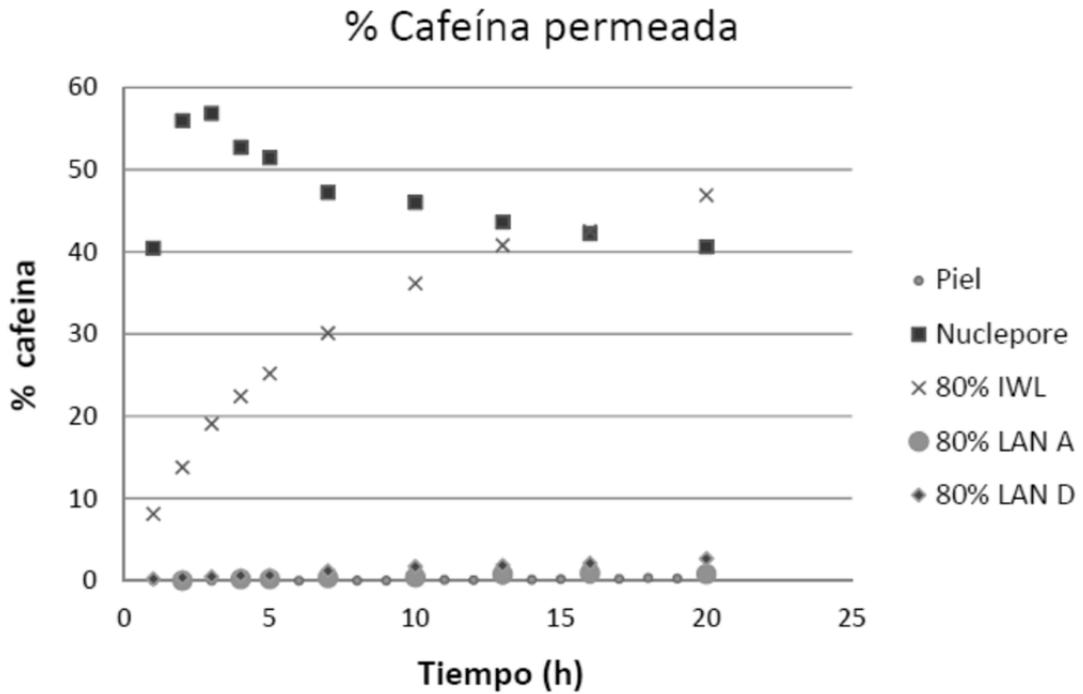


FIG. 2

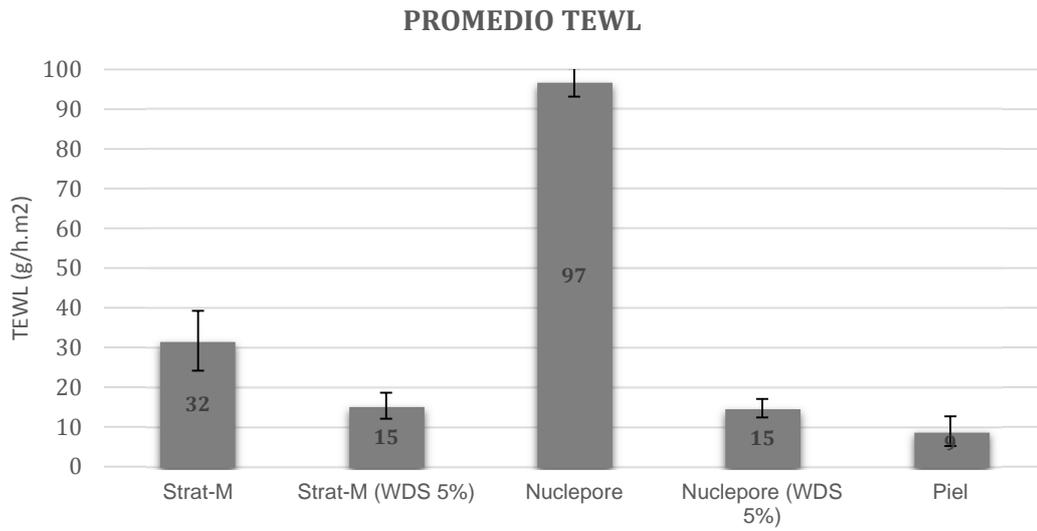


FIG. 3

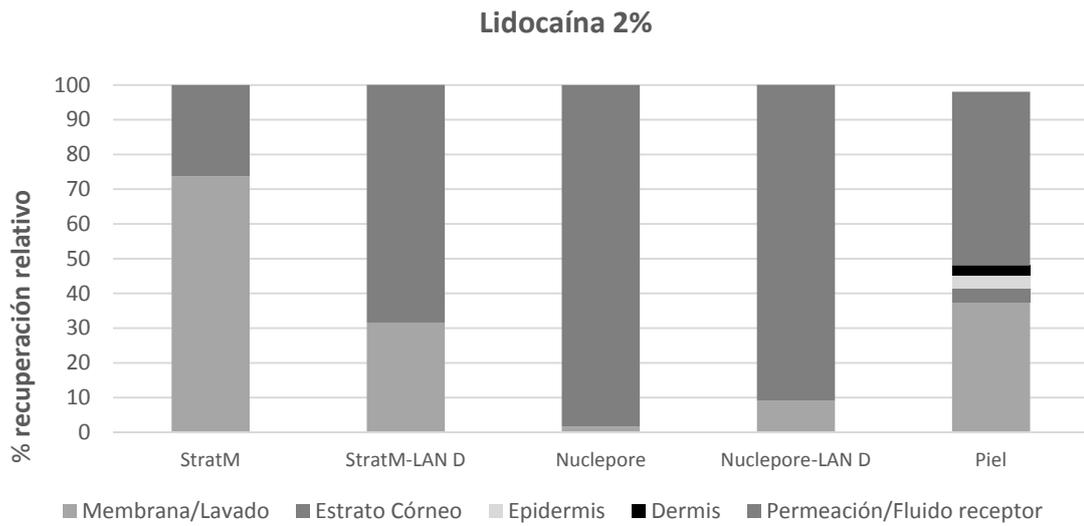


FIG. 4

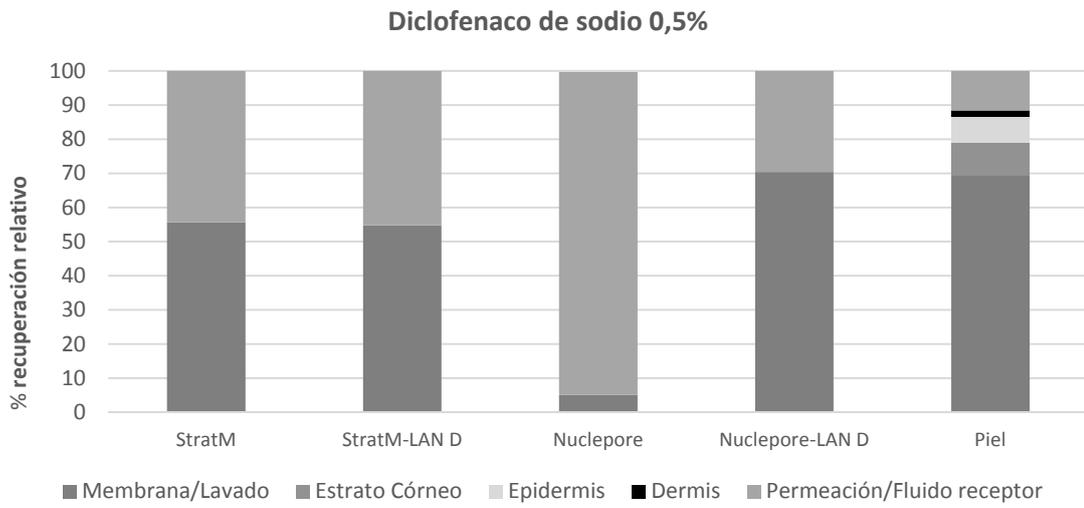


FIG. 5

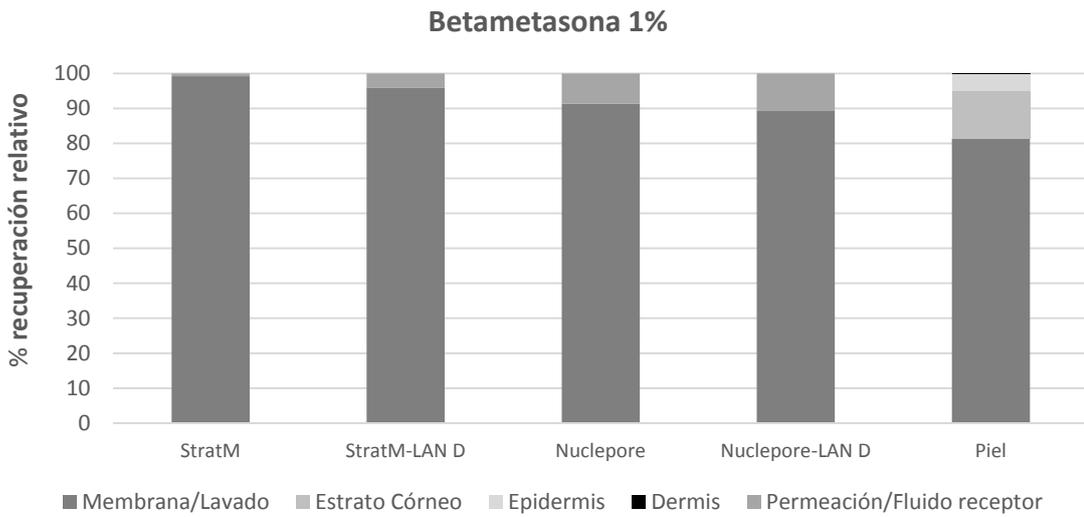


FIG. 6

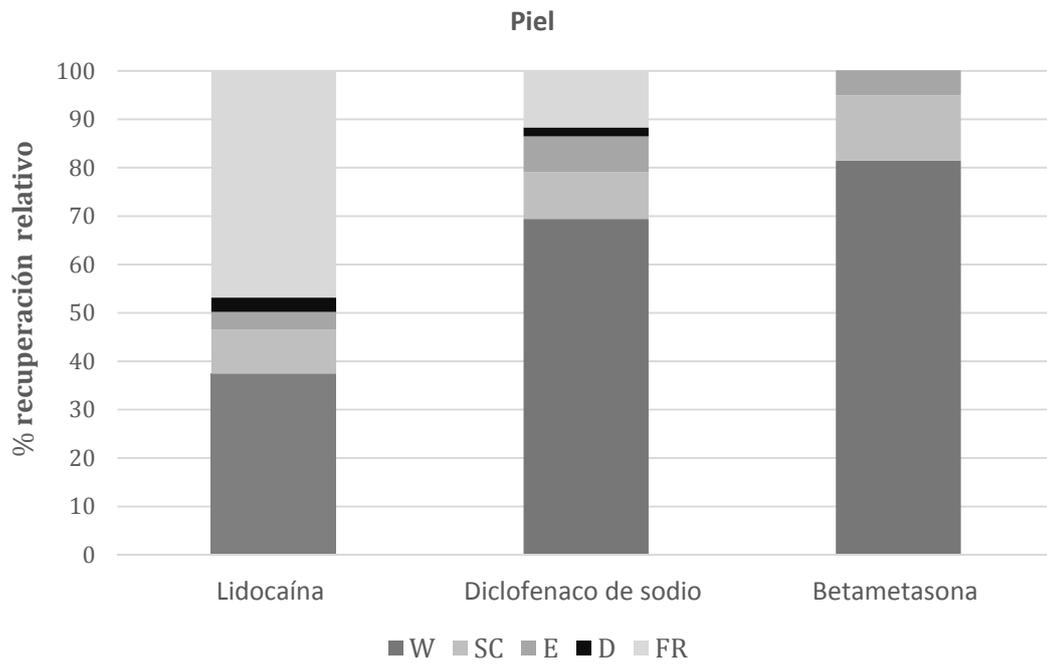


FIG. 7



- ②① N.º solicitud: 201830343
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.04.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 5196190 A (NANGIA AVINASH <i>et al.</i>) 23/03/1993, Columna 3, líneas 40-44; columna 5, líneas 1-8.	1-11
A	FLYNN T C <i>et al.</i> Dry skin and moisturizers. Clinics in dermatology United States. , 30/06/2001, Vol. 19, Páginas 387 - 392, ISSN 0738-081X (Print), <DOI: pubmed: 11535378>. Página 388, columna izquierda, tercer párrafo.	1-11
A	EMAN ABD <i>et al.</i> Skin models for the testing of transdermal drugs. Clinical Pharmacology: Advances and Applications, 2016, Vol. 8, Páginas 163 - 176, <DOI: doi:10.2147/CPAA.S64788>. Página 169, columna izquierda, segundo párrafo; página 169, columna derecha, primer párrafo.	1-11
A	HAQ ANIKA <i>et al.</i> Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes. International Journal of Pharmaceutics (Kidlington) MAR 25 2018. , 25/03/2018, Vol. 539, Páginas 58-64, ISSN 0378-5173(print) ISSN 1873-3476(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ijpharm.2018.01.029>. Página 58; página 59, columna izquierda, segundo párrafo; página 60, columna derecha, primer párrafo.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.12.2018

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61F2/10 (2006.01)

B01D69/02 (2006.01)

B01D69/06 (2006.01)

B01D71/50 (2006.01)

B01D71/68 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61F, B01D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE EMBASE, INTERNET