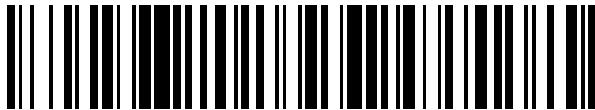


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 540 453**

(21) Número de solicitud: 201590050

(51) Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 9/52 (2006.01)

C07K 14/485 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:

02.12.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

09.07.2015

(88) Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

23.02.2016

Fecha de la concesión:

31.08.2016

(45) Fecha de publicación de la concesión:

07.09.2016

(73) Titular/es:

PRAXIS PHARMACEUTICAL, S.A. (100.0%)
C/ Hermanos Lumiere, 5 Parque Tecnológico de
Alava
01510 MIÑANO (Araba/Álava) ES

(72) Inventor/es:

GAINZA LAFUENTE, Eusebio;
GAINZA LUCEA, Garazi;
IBARROLA MORENO, Oihane;
VILLULLAS RINCON, Silvia;
ANGEL, Del Pozo Perez;
PEDRAZ MUÑOZ, Jose Luis;
HERNANDEZ MARTIN, Rosa Maria;
IGARTUA OLAECHEA, Manuela y
GOMEZ MENGOD, Alfredo

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

(54) Título: **Micropartículas con EGF, procedimiento de preparación y uso**

(57) Resumen:

Micropartículas con EGF, procedimiento de preparación y uso.

La presente invención se refiere a micropartículas que comprenden polímeros biocompatibles y el factor de crecimiento epidérmico. Asimismo, se refiere al método de preparación de dichas micropartículas y a su uso para promover la cicatrización de heridas.

DESCRIPCION

Micropartículas con EGF, procedimiento de preparación y uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la microencapsulación. En concreto, se refiere a micropartículas que comprenden polímeros biocompatibles y el factor de crecimiento epidérmico. Asimismo, se refiere al procedimiento de preparación de dichas 10 micropartículas y a su uso para promover la cicatrización de heridas.

Antecedentes de la invención

El envejecimiento de la población se asocia a un aumento progresivo de las 15 enfermedades crónicas y sus complicaciones. Como consecuencia de una combinación de factores asociados a la edad, tales como insuficiencia venosa, enfermedad arterial oclusiva, obesidad, inmovilidad, deficiencia de factores de crecimiento, diabetes mellitus, defectos neurológicos y carencias nutricionales, entre otros, se presentan heridas que deterioran notablemente la calidad de vida de los pacientes, limitando su autonomía, en 20 especial cuando afectan a las extremidades inferiores. Los cambios morfológicos de la piel en las personas mayores debidos al paso del tiempo, pueden favorecer una mayor predisposición a que fuerzas mecánicas, por presión, roce o cizalla de escasa envergadura o presentes un breve periodo de tiempo puedan generar lesiones que, junto con los problemas de cicatrización asociados a las enfermedades crónicas, hacen 25 que estas lesiones no curen, provocando heridas crónicas de difícil curación. Las heridas crónicas representan un importante problema sanitario desde el punto de vista epidemiológico, económico y social, asociado a una alta morbilidad en ancianos. Las heridas crónicas son un grupo complejo y heterogéneo, si bien, aproximadamente el 70% de las mismas pueden clasificarse como úlceras de presión, diabéticas o 30 vasculares; siendo menos frecuentes las de causa inflamatoria, tumoral o por agentes físicos (por quemaduras o radiación).

El cuidado convencional de heridas crónicas incluye terapias como el oxígeno hiperbárico, presión negativa, debridamiento quirúrgico o apósticos. Estas terapias son 35 paliativas e incapaces de garantizar una adecuada regeneración tisular y cierre de la herida. También se ha empleado la aplicación tópica de factores de crecimiento para

mejorar la cicatrización, aunque con poco éxito (Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present and future. *Adv Skin Wound Care* 2004; 17:24-35).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *Epidermic Growth Factor*) aumenta

5 la proliferación de células epidérmicas y por ello, es importante para el proceso de cicatrización que depende de la mitosis y la migración de los queratinocitos y fibroblastos dermales. Sin embargo, las heridas agudas pueden segregar enzimas proteolíticas que reducen considerablemente la biodisponibilidad local del EGF y por tanto, su tiempo de interacción con el receptor. Por ello, para que el EGF ejerza su
10 efecto mitogénico para lograr una efectiva cicatrización, se requiere una continua exposición del EGF con las células de por lo menos 6-12 h. En este sentido, en India se ha autorizado un gel tópico basado en el factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (rhEGF, del inglés *recombinant human Epidermic Growth Factor*), REGEN-D 150™, para el tratamiento de úlceras de pie diabético grado I y II, que se ha de aplicar
15 dos veces al día hasta la completa curación de la úlcera y que reduce la duración de la cicatrización. Del mismo modo, en Países como Argentina, Bolivia, Colombia, Cuba, México y Venezuela se comercializa una formulación basada en rhEGF, Heberprot-P, que aumenta la granulación de úlceras de pie diabético de alto grado tras su administración intralesional tres veces por semana.

20

El documento WO 2007/087759 describe un proceso de formulación de EGF en microesferas para prevenir la amputación del pie diabético, donde el EGF es encapsulado con una eficacia de encapsulación del 40-60% y la tasa de liberación del EGF es de 5 y 10 µg al día, durante 14 días. Chu *et al.* (*Nanotechnology promotes the full-thickness diabetic wound healing effect of recombinant human epidermal growth factor in diabetic rats*, *Wound Repair Regen* 2010; 15:499-505) describen

25 nanopartículas con una eficacia de encapsulación de EGF de un 85,6%, con un contenido de EGF del 2%, que muestran una liberación rápida (*burst* inicial) durante la primera hora y sostenida durante 24h. Sin embargo, aunque las formulaciones descritas en Chu *et al.* promueven, en comparación con grupos control, la proliferación de
30 fibroblastos y el proceso de cicatrización en modelo de rata diabetizada con inducción de heridas profundas, para conseguir estos resultados, requieren de una administración diaria del factor de crecimiento debido a que las formulación empleada ejerce una liberación sostenida de un máximo de 24 horas. La administración repetida supone un inconveniente muy importante para el paciente, ya que, aumentar el número de dosis
35 conlleva un aumento de padecer efectos adversos al tratamiento, una mayor

probabilidad del incumplimiento del mismo y en los casos que se administre mediante inyecciones en la herida, un rechazo por parte del paciente debido a la sensación dolorosa de las mismas.

- 5 Sorprendentemente, con las micropartículas de la presente invención, micropartículas que comprenden EGF y polímeros de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y alginato, se consiguen altas eficacias de encapsulación del EGF (de hasta el 88%) y una liberación sostenida del EGF durante al menos 30 días lo que permite obtener excelentes resultados de cicatrización, incluso con una única administración. Además, la tasa de
10 liberación sostenida de EGF es del orden de nanogramos, lo que también supone una ventaja ya que exposiciones prolongadas a concentraciones más altas de EGF pueden favorecer la proliferación celular, lo que puede resultar agresivo para el organismo.

Objeto de la invención

- 15 La presente invención se refiere a una micropartícula (micropartícula de la invención) que comprende un polímero de PLGA, un polímero de alginato, y factor de crecimiento epidérmico.
- 20 En otro aspecto se refiere a una composición farmacéutica (composición farmacéutica de la invención) que comprende la micropartícula de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Asimismo, se refiere a la micropartícula de la invención para su uso como medicamento
25 y a la micropartícula de la invención para su uso para promover la cicatrización de heridas en un individuo. También se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento y a la composición farmacéutica de la invención para su uso para promover la cicatrización de heridas en un individuo.
- 30 En otro aspecto se refiere a un kit que comprende la micropartícula de la invención o la composición farmacéutica de la invención para promover la cicatrización de heridas.

Por último, en otro aspecto se refiere a un procedimiento para preparar la micropartícula de la invención que comprende las siguientes etapas:

- 35 a. Adición de una solución de PLGA en un disolvente orgánico (solución orgánica de PLGA) sobre una solución que comprende alginato y factor de

crecimiento epidérmico (solución de EGF y alginato), y mezcla de la solución orgánica de PLGA y la solución de EGF y alginato,

- 5 b. Adición de la emulsión obtenida en la etapa a) sobre una solución acuosa que comprende tensoactivo y cloruro de sodio (solución acuosa), y mezcla de la emulsión obtenida en la etapa a) y la solución acuosa,
- c. Adición de la emulsión obtenida en b) sobre una solución que comprende cloruro de sodio y cloruro de calcio (solución de cloruros), y mezcla de la emulsión obtenida en la etapa b) y la solución de cloruros,
- d. Extracción del solvente, y
- 10 e. Aislamiento de la micropartícula.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las

15 micropartículas (A) MP4 (x2500), (B) MP5 (x1000), y (C) MP5-γ (x1000).

Figura 2. Representación gráfica del porcentaje de liberación sostenida de EGF en función del tiempo en horas (A) y en días (B).

20 **Figura 3.** Micrografías de cultivos de fibroblastos tratados con (A) Medio libre de suero, (B) 15 ng/mL micropartículas de EGF (C) 15 ng/ml EGF libre.

Figura 4. Fotografías de heridas de ratas tratadas con (A) Control sin tratar, (B) Control vehículo, (C) Control micropartícula vacía, (D) EGF libre y (E) Micropartículas con EGF.

25 **Figura 5.** Micrografías de muestras de heridas para la evaluación del grado de re-epitelialización a los 7, 11 y 17 días, de ratones tratados con (A) Control sin tratar, (B) Control vehículo, (C) Control micropartícula vacía, (D) EGF libre y (E) Micropartículas con EGF.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere en un primer aspecto a una micropartícula (referida de aquí en adelante como micropartícula de la invención) que comprende un polímero de

35 PLGA, un polímero de alginato, y factor de crecimiento epidérmico.

En el contexto de la presente invención, el término micropartícula se refiere a partícula micrométrica de flujo libre donde se recubren materiales sólidos, líquidos o gaseosos con una película de material polimérico o graso, que tiene un tamaño comprendido entre 1 µm y 1000 µm. En una realización particular, la micropartícula de la invención tiene un diámetro en el rango de 1 µm a 500 µm. De manera más particular, tiene un diámetro en el rango de 1 µm a 100 µm, de manera preferente la micropartícula de la invención tiene un diámetro en el rango de 1 µm a 40 µm (Tabla 1).

El PLGA es un polímero sintético formado por la asociación del homopolímero de ácido láctico (PLA) y por el de ácido glicólico (PGA), es altamente biocompatible y toxicológicamente seguro. En el contexto de la presente invención se entiende por polímero de PLGA todo polímero sintético formado por la asociación del polímero ácido láctico y ácido glicólico sea cual sea la proporción en la que toman parte cada uno de ellos en el conjunto. Los alginatos son copolímeros naturales de polisacáridos constituidos por los ácidos manurónico y glucurónico. Aunque los polímeros sintéticos superan a los naturales en pureza y reproducibilidad, la ultrapurificación de los alginatos les confiere una baja toxicidad, siendo considerados biocompatibles.

En una realización particular, el factor de crecimiento epidérmico de la micropartícula de la invención es el factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (rhEGF). Dicho rhEGF puede ser obtenido comercialmente (Peprotech, Promega, Pharmchem, etc.) o producido mediante la tecnología del ADN recombinante, como por ejemplo se describe en Marioka-Fujimoto *et al.* (*Modified enterotoxin signal sequences increase secretion level of the recombinant human epidermal growth factor in Escherichia coli*. J Biol Chem. 1991 Jan 25; 266(3):1728-32) o en la solicitud de patente WO 91/18999 A1.

En una realización particular, la micropartícula de la invención comprende entre 82,7% y 99,897% (p/p) de PLGA respecto al peso total de la micropartícula, entre 0,003% y 1,5 % (p/p) de EGF respecto al peso total de la micropartícula y entre 0,1% y 5% (p/p) de alginato respecto al peso total de la micropartícula. En otra realización particular, la micropartícula de la invención comprende entre 0,05% y 1% (p/p) de EGF respecto al peso total de la micropartícula y de manera más particular comprende un 1% (p/p) de EGF respecto al peso total de la micropartícula. En otra realización particular, la micropartícula de la invención comprende del 1% al 3% (p/p) de alginato respecto al peso total de la micropartícula, y aún más particularmente, comprende un 2 % (p/p) de alginato respecto al peso total de la micropartícula.

En otra realización particular, la micropartícula de la invención comprende opcionalmente albúmina sérica humana (HSA) y polietilenglicol (PEG). En una realización particular, la micropartícula de la invención comprende además 0,1-10% (p/p) de HSA respecto al peso total de la micropartícula y 0,1-0,8% (v/p) de PEG,
5 preferentemente PEG400, respecto al peso total de la micropartícula. Y de manera aún más particular, 5% (p/p) HSA y 0,5% (v/p) PEG, preferentemente PEG400, respecto al peso total de la micropartícula.

En otra realización particular, la micropartícula de la invención está liofilizada.

10

En otra realización particular, la micropartícula de la invención descrita en los párrafos anteriores está embebida en una matriz en forma de gel de fibrina (matriz de fibrina). El gel de fibrina se basa en la polimerización de fibrinógeno y trombina con calcio para formar una red de fibrina. Las micropartículas de la invención embebidas en una matriz
15 de fibrina presentan la importante ventaja de poder administrarse por vía tópica, por ejemplo, aplicándolas como apósitos en el contorno de la herida o en la misma herida.

Como se ha indicado anteriormente, el EGF aumenta la proliferación y migración de células epidérmicas y dérmicas y por ello, es importante para el proceso de cicatrización. Sin embargo, debido a su corta vida media en las heridas, para lograr una efectiva cicatrización se requiere una continua exposición del EGF con las células. Para solventar este problema no se podría incrementar excesivamente la dosis administrada, ya que este factor, al favorecer la proliferación celular, puede resultar agresivo para el organismo, sobre todo si se administra por vía sistémica.
20

25

Sorprendentemente, la micropartícula de la invención es un sistema de liberación sostenida de EGF que libera EGF durante al menos 60 días (Fig. 2). Una liberación de al menos 60 días supone una liberación sostenida durante un tiempo más de cuatro veces superior al de las micropartículas de EGF descritas en el estado de la técnica. Además,
30 un miligramo de micropartículas de la invención proporciona 0,2-2,5 µg de EGF/día en la fase de liberación rápida (30 primeros minutos, *burst* inicial en el que se libera el EGF adherido a la superficie de la micropartícula) lo que permite activar el proceso cicatrización, y niveles sostenidos de 0,5-150 ng de EGF/día en la fase de liberación sostenida (fase de liberación lenta en la que se libera el EGF principalmente por difusión
35 y erosión de la micropartícula). El proceso de liberación sostenida permite reducir la dosis evitando así efectos adversos tanto asociados a la dosis de administración del

EGF como a los relacionados con la inyección de la formulación en la zona lesionada. Ejemplos de ello son, inflamación, infección, efectos sistémicos asociados a la administración de EGF (alteraciones gástricas etc).

- 5 Así, en una realización particular, la micropartícula de la invención definida según una cualquiera de las realizaciones particulares anteriormente descritas está caracterizada porque el EGF se libera durante al menos 30 días. En otra realización particular, la micropartícula de la invención está caracterizada porque el EGF se libera de 30 a 120 días.

10

En una realización particular, la micropartícula de la invención definida según una cualquiera de las realizaciones particulares anteriormente descritas está caracterizada porque el EGF se libera durante al menos 60 días. En otra realización particular, la micropartícula de la invención está caracterizada porque el EGF se libera de 60 a 120

15 días.

20

En una realización particular, la micropartícula de la invención definida según una cualquiera de las realizaciones particulares anteriormente descritas está caracterizada porque la tasa de liberación del EGF es de entre 0,5 a 150 ng de EGF/mg de micropartículas/día en la fase de liberación sostenida. En otra realización particular, la tasa de liberación del EGF es de entre 0,9 a 100 ng de EGF/mg de micropartículas/día en la fase de liberación sostenida. En otra realización particular, la tasa de liberación del EGF es de entre 0,9 a 50 ng de EGF/mg de micropartículas/día en la fase de liberación sostenida, en otra realización particular es de entre 5 a 80 ng de EGF/mg de micropartículas/día en la fase de liberación sostenida, y en otra realización particular es de entre 5 a 50 ng de EGF/mg de micropartículas/día en la fase de liberación sostenida.

25

Otras importantes ventajas son que la micropartícula de la invención tiene una eficacia de encapsulación del 60-88% (Tabla 1) y que la actividad biológica del EGF *in vitro* no se ve afectada ni por el proceso de microencapsulación (proceso de formación de la micropartícula), ni por el de esterilización mediante radiaciones gamma (Tabla 2). Así, la micropartícula de la invención puede ser esterilizada por radiación gamma sin que su actividad biológica y sus propiedades fisicoquímicas se vean sustancialmente afectadas. La esterilización por radiación gamma ofrece como ventaja principal, sobre otros métodos de esterilización, la baja reactividad que induce sobre el material a esterilizar y la facilidad con la que se controla el proceso.

El EGF liberado de las micropartículas de la invención es biológicamente activo *in vitro* y es capaz de reducir el área de una herida más rápido que los grupos control en ensayos de cicatrización *in vitro* (Fig. 3). Más ventajosamente aún, el EGF liberado de las micropartículas de la invención mantiene su actividad biológica *in vivo* y es capaz de promover la cicatrización de heridas *in vivo* tanto mediante aplicaciones intralesionales (Fig. 4, Tabla 3) como tópicas en preparados con fibrina (Tabla 4). Además, con las micropartículas de la invención, se consigue una re-epitelización completa y de espesor normal (Fig. 5), siendo la cicatrización similar a la fisiológica. Por último, otra importante ventaja de las micropartículas de la invención es que la dosis de administración de EGF microencapsulado es menor que la dosis requerida cuando se utiliza EGF libre y la administración es única (una única dosis), lo que conlleva menos efectos secundarios, tanto asociados a la administración del EGF como a los relacionados con la inyección de la formulación en la zona lesionada (Ejemplo 6).

Todas estas características hacen que la micropartícula de la invención libere de manera sostenida EGF bioactivo en cantidades óptimas para activar la proliferación de las células epiteliales sin que el EGF pase a otros órganos y tejidos del individuo a tratar, lo que permite obtener excelentes resultados de cicatrización con administraciones únicas, tanto en aplicaciones intralesionales como tópicas.

Por ello, un segundo aspecto de la presente invención se refiere al uso de la micropartícula de la invención en la elaboración de un medicamento. En una realización particular, se refiere al uso de la micropartícula de la invención en la elaboración de un medicamento para promover la cicatrización de heridas en un individuo. En una realización particular, el medicamento se aplica mediante inyección por vía parenteral y en otra realización particular, el medicamento se aplica mediante administración tópica. En una realización particular, las heridas son úlceras de pie diabético, úlceras por presión y/o úlceras vasculares.

La presente invención se refiere también a la micropartícula de la invención para su uso como medicamento. Asimismo, se refiere a la micropartícula de la invención para su uso para promover la cicatrización de heridas en un individuo. En una realización particular se refiere a la micropartícula para su uso parenteral para promover la cicatrización de heridas en un individuo. Y en otra realización particular se refiere a la micropartícula para su uso tópico para promover la cicatrización de heridas en un individuo. En una realización particular, las heridas son úlceras de pie diabético, úlceras por presión y/o

úlceras vasculares.

En el contexto de la presente invención el término promover la cicatrización de una herida se refiere a acelerar, aumentar, activar y/o iniciar la cicatrización de una herida, 5 dando lugar a que la herida cicatrice de una manera similar a la fisiológica siendo el tejido cicatricial maduro y fisiológicamente bien organizado. Y el término herida se refiere al daño producido en cualquier parte del cuerpo de un individuo incluyendo, pero no limitado a, quemaduras, cortes, traumatismos, etc., así como condiciones crónicas tales como úlceras por presión, diabéticas o vasculares y heridas crónicas asociadas a 10 la edad. Las úlceras por presión se refieren a una lesión localizada en la piel y/o en el tejido subyacente, por lo general sobre una prominencia ósea, como resultado de una presión o presión en combinación con cizalla. La úlcera diabética o úlcera de pie diabético se refiere a una alteración clínica de base etiopatogénica neuropática e inducida por la hiperglucemia mantenida, en la que con o sin coexistencia de isquemia, y 15 previo desencadenante traumático, produce lesión y/o ulceración del pie, que pueden llegar a acabar en amputación. En las úlceras vasculares se incluyen todas las úlceras causadas por un trastorno de los sistemas arterial o venoso de las extremidades inferiores. Son úlceras crónicas localizadas habitualmente en las piernas y constituyen un grupo de lesiones de especial relevancia, tanto desde el punto de vista clínico como 20 epidemiológico.

La presente invención, se refiere en un tercer aspecto a una composición farmacéutica (composición farmacéutica de la invención) que comprende la micropartícula de la invención descrita en los párrafos anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son ampliamente conocidos por el experto en la materia. En una realización particular de la invención, el vehículo 25 comprende una solución acuosa de NaCl al 0,9% p/v, en otra realización particular, el vehículo comprende además 0,1-1% carboximetilcelulosa p/v, preferiblemente 0,3% carboximetilcelulosa p/v, y en otra realización particular, el vehículo comprende además 30 0,1% Tween 20 v/v.

En una realización particular la composición farmacéutica de la invención comprende además uno o varios agentes farmacológicos seleccionados del grupo formado por antisépticos, antibióticos, astringentes, antifúngicos, antivirales, antihistamínicos, 35 antiinflamatorios, colágeno, vitaminas, minerales y mezclas de los mismos.

- En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención en la elaboración de un medicamento. En una realización particular, se refiere al uso de la composición farmacéutica de la invención en la elaboración de un medicamento para promover la cicatrización de heridas en un individuo. En una realización particular, el medicamento se aplica mediante inyección por vía parenteral y en otra realización particular, el medicamento se aplica mediante administración tópica. En una realización particular, las heridas son úlceras de pie diabético, úlceras por presión y/o úlceras vasculares.
- 10 La presente invención se refiere también a la composición farmacéutica de la invención para su uso como medicamento. Asimismo, se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso para promover la cicatrización de heridas en un individuo. En una realización particular se refiere a la composición farmacéutica para su uso parenteral para promover la cicatrización de heridas en un individuo. Y en otra 15 realización particular se refiere a la composición farmacéutica para su uso tópico para promover la cicatrización de heridas en un individuo. En una realización particular, las heridas son úlceras de pie diabético, úlceras por presión y/o úlceras vasculares.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende la 20 micropartícula de la invención y/o la composición farmacéutica de la invención para promover la cicatrización de heridas. En una realización particular el kit comprende micropartículas o una composición farmacéutica que las comprende y además un dispositivo, preferiblemente una jeringuilla, para la administración parenteral de la micropartícula de la invención. La administración parenteral se lleva a cabo a lo largo del 25 perímetro de la herida.

En otra realización particular, el kit comprende micropartículas embebidas en una matriz de fibrina para su administración tópica en el contorno de la herida o en la misma herida. La dosificación en apósitos para la administración tópica se puede llevar a cabo de 30 varias maneras conocidas por el experto. Así, en una realización particular del kit de la invención, el kit comprende tres soluciones, una solución de fibrinógeno, una solución con las micropartículas de la invención y otra solución de trombina. Asimismo, el kit comprende un molde estéril para preparar el apósito. Cuando se necesite el apósito se mezclan la solución de fibrinógeno y de micropartículas, se añaden al molde y sobre 35 estas soluciones se añade la solución de trombina. Esta mezcla se incubará a 37°C hasta que coagule. En otra realización particular, el kit comprende el gel de fibrina que

comprende las micropartículas ya preparado, el cual entonces debe ser conservado a 4°C y debe usarse en menos de 7-10 días.

La presente invención se refiere en un sexto aspecto a un procedimiento (referido de 5 aquí en adelante como procedimiento de la invención) para preparar la micropartícula de la invención descrita en los párrafos anteriores que comprende las siguientes etapas:

- a. Adición de una solución de PLGA en un disolvente orgánico (solución orgánica de PLGA) sobre una solución que comprende alginato y factor de crecimiento epidérmico (solución de EGF y alginato), y mezcla de la solución orgánica de PLGA y la solución de EGF y alginato,
- b. Adición de la emulsión obtenida en la etapa a) sobre una solución acuosa que comprende tensoactivo y cloruro de sodio (solución acuosa), y mezcla de la emulsión obtenida en la etapa a) y la solución acuosa,
- c. Adición de la emulsión obtenida en b) sobre una solución que comprende cloruro de sodio y cloruro de calcio (solución de cloruros), y mezcla de la emulsión obtenida en la etapa b) y la solución de cloruros,
- d. Extracción del solvente, y
- e. Aislamiento de la micropartícula.

20 La mezcla de las etapas a) y b) se lleva a cabo por medios conocidos por el experto en la materia, entre otros, sonicación, agitación mecánica, etc. En una realización particular, la mezcla de la etapa a) se lleva a cabo mediante aplicación de ultrasonidos y la mezcla de la etapa b) se lleva a cabo en un agitador de paletas.

25 El disolvente orgánico de la solución orgánica de PLGA es cualquier disolvente orgánico que disuelva el PLGA y sea inmiscible con el agua, seleccionándose en una realización particular, del grupo formado por diclorometano, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona, cloroformo y mezclas de los mismos. En otra realización particular dicho disolvente es diclorometano y en otra realización particular es una mezcla de diclorometano y acetona 30 (3:1).

El tensoactivo utilizable es conocido por el experto en la materia. En una realización particular, el tensoactivo se selecciona del grupo formado por, entre otros, el laurato de potasio, estearato de trietanolamina, laurilsulfato de sodio, sulfatos de 35 alquilpolioxietlenos, dioetilsulfosuccinato de sodio, compuestos de amonio cuaternario, por ejemplo bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de laurildimetilbencilmamonio, éteres

alcohólicos grasos de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno-sorbitán y alcohol polivinílico (PVA) y mezclas de los mismos. En una realización particular, el tensoactivo utilizado es PVA.

- 5 En una realización particular del procedimiento de la invención, la solución orgánica de PLGA comprende del 2-10% (p/v) de PLGA respecto al volumen total de la solución orgánica de PLGA. En otra realización particular, la solución de PLGA comprende del 3-5% (p/v) de PLGA respecto al volumen total de la solución orgánica de PLGA. En otra realización particular, la solución de PLGA comprende un 5% (p/v) de PLGA respecto al
10 volumen total de la solución orgánica de PLGA. En otra realización particular, la solución de PLGA comprende un 3% (p/v) de PLGA respecto al volumen total de la solución orgánica de PLGA.

En otra realización particular, la solución de EGF y alginato comprende entre 0,0015 % a
15 0,75 % (p/v) de EGF respecto al volumen total de la solución de EGF y alginato y del 0,05% a 2,5 % (p/v) de alginato respecto al volumen total de la solución de EGF y alginato. De manera más particular, la solución de EGF y alginato comprende entre 0,025 % a 0,5% (p/v) de EGF respecto al volumen total de la solución de EGF y alginato y del 0,5-1,5% (p/v) de alginato respecto al volumen total de la solución de EGF y
20 alginato. Y de manera aún más particular, la solución de EGF y alginato comprende un 0,5% (p/v) de EGF respecto al volumen total de la solución de EGF y alginato y un 1% (p/v) de alginato respecto al volumen total de la solución de EGF y alginato.

En otra realización particular, la solución de EGF y alginato comprende además 0,05-5%
25 (p/v) de HSA respecto al volumen total de la solución de EGF y alginato, de manera más particular un 2,5% (p/v) de HSA, y 0,15-1,16% (v/v) de polietilenglicol (PEG) respecto al volumen total de la solución de EGF y alginato, de manera más particular un 0,73% (v/v) de PEG400.

30 En otra realización particular, la solución acuosa de la etapa b) es una solución de NaCl al 5-10% (p/v) respecto al volumen total de la solución acuosa, y la solución de cloruros de la etapa c) comprenden entre un 5 y 10% (p/v) de cloruro de sodio respecto al volumen total de la solución de cloruros y entre 0,6 y 1,2 mM de cloruro de calcio. En otra realización particular, la solución acuosa de la etapa b) es una solución de NaCl al
35 5% (p/v) respecto al volumen total de la solución acuosa, y la solución de cloruros de la etapa c) comprenden un 5% en peso de cloruro de sodio respecto al volumen total de la

solución de cloruros y 0,6 mM de cloruro de calcio. En otra realización particular, la solución acuosa de la etapa b) es una solución de NaCl al 5% (p/v) en una solución acuosa de PVA al 5% (p/v).

- 5 La extracción del solvente (etapa d) se lleva a cabo por métodos conocidos por el experto en la materia, como por ejemplo mediante extracción a vacío, evaporación o extrusión. En una realización particular del método de la invención, la extracción del solvente se lleva a cabo mediante evaporación. Finalmente, la etapa e) de aislamiento de la micropartícula se lleva a cabo mediante métodos conocidos por el experto en la
10 materia, tales como centrifugación, ultracentrifugación, filtración tangencial, filtración a vacío o evaporación a vacío.

En una realización particular, las micropartículas aisladas en la etapa e) opcionalmente se someten a un proceso de liofilización. Opcionalmente, dichas micropartículas
15 liofilizadas se embeben en una matriz en forma de gel de fibrina (matriz de fibrina). El gel de fibrina se basa en la polimerización de fibrinógeno y trombina con calcio para formar una red de fibrina, así en una realización particular, las micropartículas aisladas en la etapa e) se adicionan a una solución de fibrinógeno a la que posteriormente se añade una solución de trombina e inmediatamente se deja gelificar. La matriz en forma
20 de gel de fibrina se prepara por medios conocidos por el experto en la materia, los cuales brevemente se basan en la mezcla de dos soluciones separadas, una que comprende fibrinógeno y otra que comprende trombina. Las soluciones de fibrinógeno y de trombina se pueden adquirir comercialmente por separado (por ejemplo, de Sigma-Aldrich) o dentro de un kit comercial para producir geles de fibrina, como por ejemplo, el
25 kit de Tissucol ® Duo 5 mL (Baxter, SL, Valencia, España).

En un último aspecto, la presente invención se refiere a la micropartícula obtenida por el procedimiento de la invención anteriormente descrito. Se refiere también a una composición que comprende dicha micropartícula y un vehículo farmacéuticamente
30 aceptable. Así como al uso de dicha micropartícula o dicha composición farmacéutica para la preparación de un medicamento para promover la cicatrización de heridas en un individuo. También se refiere a la micropartícula obtenida por el procedimiento de la invención anteriormente descrito y a la composición farmacéutica que la comprende junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso para promover la
35 cicatrización de heridas en un individuo. Por último también se refiere al kit que comprende dicha micropartícula o dicha composición farmacéutica para promover la

cicatrización de heridas.

Ejemplos

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que

5 sirven para ilustrar la invención.

EJEMPLO 1. Preparación de micropartículas (MP)

Micropartícula MP4

Se prepararon las micropartículas MP4 tal y como se detalla a continuación. Para la

10 primera emulsión w₁/o (etapa a) del método de la invención) se pesaron 75 mg de PLGA y se preparó, una solución orgánica de PLGA al 5% (p/v) en diclorometano y acetona (3:1). Por otro lado, se preparó una solución de origen acuoso con rhEGF comercial al

0,1% (p/p), HSA al 5% (p/p), PEG400 al 0,5% (v/p) y alginato al 2% (p/p), respecto a la cantidad de PLGA. La emulsión se forma cuando se vierte la solución orgánica sobre la

15 acuosa y se aplican ultrasonidos durante 15 segundos a una intensidad de 50W (Sonicador Branson® 250). A continuación, esta primera emulsión se adicionó sobre 15 mL de una solución de NaCl al 5% (p/v) en una disolución acuosa de PVA al 5% (p/v).

Este sistema se homogenizó en un agitador de paletas a 500 rpm (Biocote® Stirrer SS20) durante 60 segundos, dando lugar la segunda emulsión w₁/o/w₂ (emulsión

20 resultante de la etapa b)). Esta mezcla se incorporó sobre 400 mL de una solución de NaCl al 5% (p/v) y 0,6 mM de CaCl₂ en agua MiliQ y se mantuvo agitando durante 30 minutos para facilitar la evaporación del diclorometano. Finalmente, para realizar el

25 aislamiento de las micropartículas, se filtró la mezcla en una bomba de vacío utilizando un filtro de nylon de 0,45 µm. Después, se limpió el filtro con agua MiliQ y se extrajeron las micropartículas que quedaron adheridas al mismo. Finalmente, se liofilizaron las

30 micropartículas obtenidas utilizando un Liofilizador Telstar® (LyoBeta) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Micropartícula MP5

Se siguió el protocolo descrito para las micropartículas MP4 pero se incrementó la carga de rhEGF del 0,1% al 1%, para poder dosificar correctamente *in vivo*.

Micropartícula MP5-γ (MP5 esterilizada con radiación gamma)

Las micropartículas con rhEGF cargadas al 1% (MP5) fueron esterilizadas con radiación 35 gamma usando como fuente de radiación ⁶⁰Co. Se siguió el proceso descrito en Igartua et al. (γ -Irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded

with SPf66 synthetic vaccine. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008; 69(2):519-526).

EJEMPLO 2. Caracterización de las micropartículas

5 Determinación del tamaño y de la morfología de la micropartícula

La determinación del tamaño y de la morfología de la micropartícula se realizó siguiendo el protocolo descrito en Puras *et al.* (*Encapsulation of A β 1–15 in PLGA microparticles enhances serum antibody response in mice immunized by subcutaneous and intranasal routes*, European Journal of Pharmaceutical Sciences 2011; 44(3): 200–206).

10 Brevemente, el tamaño de la micropartícula se determinó mediante difracción de rayos láser, utilizando el analizador de partículas Coulter® Counter LS 130 (Particle Size Analyzer, Amherst), según Washington C. (*Particle size analysis in pharmaceutics and other industried: theory and practice*. Taylor & Fancis 1992) y la morfología se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (Fig. 1 y Tabla 1).

15

Determinación de la carga superficial

La determinación de la carga superficial se realiza mediante la medición del potencial zeta utilizando el equipo Zetasizer Nano series® (*Malvern Instruments user manual*, 2009), tal y como se describe en Salvador *et al.* (*Combination of immune stimulating adjuvants with poly(lactide-co-glycolide) microspheres enhances the immune response of vaccines*, Vaccine, 2012, 30(3):589–596) (Tabla 1).

Determinación de la eficacia de encapsulación (EE%)

Para determinar la eficacia que ha tenido el proceso de microencapsulación, en primer lugar, se debe extraer el EGF de las micropartículas y tenerlo en solución. Para ello se pesó 1 mg de micropartículas en un Eppendorf® y se le añadieron 400 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO). Con la ayuda de un vortex se agitó la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente, así, el DMSO digiere el polímero y posibilita la liberación del EGF. A continuación, se le añadieron 600 μ L de diluyente de ELISA (composición: Tween 20 al 0,05% y BSA al 0,1% en DPBS). Una vez extraído el EGF de las micropartículas se procedió a su cuantificación mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). Para ello se utilizó el kit comercial “*human EGF ELISA development kit*, Peprotech” (*Human EGF Elisadevelopment kit protocol*, Peprotech, 2011) según las instrucciones del fabricante.

35

La eficiencia de encapsulación se determinó mediante la siguiente fórmula matemática:

$$\text{EE} (\%) = (\text{Cantidad de EGF en la micropartícula} / \text{Cantidad de EGF inicial}) \times 100$$

Tabla 1: Resultados de la caracterización fisicoquímica de las micropartículas de la invención. Se muestra la media \pm desviación estándar.

5

Micropartícula	Tamaño medio (μm)	Potential Z (mV)	Eficiencia de encapsulación EE (%)
MP4	$15,47 \pm 8,71$	$-23,60 \pm 4,6$	$88,11 \pm 1,51$
MP5	$12,18 \pm 5,53$	$-25,50 \pm 9,41$	$68,82 \pm 1,50$
MP5- γ	$14,95 \pm 6,00$	$-28,50 \pm 7,67$	$60,01 \pm 1,10$

Como se puede observar, el tamaño medio obtenido oscila entre 10 y 17 μm . No se consideran significativas las variaciones obtenidas en el tamaño de partícula de las

10 distintas micropartículas. Las micropartículas MP4, MP5 y MP5- γ , tienen una superficie lisa y uniforme, sin poros ni irregularidades. En cuanto a la carga superficial, todas las formulaciones tienen potenciales negativos muy similares, de modo que no cabe esperar que se deriven diferencias relevantes en el comportamiento biofarmaceútico de las partículas. El potencial zeta obtenido es muy negativo, por lo que las partículas tendrán 15 tendencia a repelerse, evitando su agregación. Los valores de potencial zeta cercanos a +30 mV y 30 mV se consideran normalmente estables (*(Malvern Instruments user manual, 2009)*). Por último, en cuanto a la eficacia de encapsulación, la EE% de las micropartículas MP4 es del 88,11%. Al aumentar la carga de EGF de 0,1% (MP4) a 1% (MP5) la EE% disminuye al 68,82%, como era esperable ya que es sabido que el 20 aumento de carga de EGF supone una peor encapsulación. Igualmente, al someter a las micropartículas a radiación gamma (MP5- γ) se observa una ligera disminución en la eficacia de encapsulación ($60,01 \pm 1,10 \%$), resultado que puede ser atribuido a la degradación del fármaco producida por el proceso de esterilización.

25 **EJEMPLO 3. Ensayo de liberación *in vitro***

El perfil de liberación del EGF de las micropartículas se llevó a cabo tal y como se describe en Salvador *et al.* (*Combination of immune stimulating adjuvants with poly(lactide-co-glycolide) microspheres enhances the immune response of vaccines, Vaccine, 2012, 30(3):589–596*).

30

La cantidad de EGF se cuantificó mediante ELISA siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 para la determinación de la EE%. Los resultados obtenidos se expresaron mediante el porcentaje acumulado de EGF liberado respecto al 100% del contenido en la muestra de micropartículas en función del tiempo.

5

Los resultados obtenidos aparecen en la Fig. 2, donde se muestra que las diferencias en la liberación del EGF comparando las micropartículas MP4, MP5 y MP5-γ son mínimas. En este ensayo se incluyeron también micropartículas con los componentes de las micropartículas del estado de la técnica, es decir, con PLGA y EGF.

10

Sorprendentemente, la liberación de EGF de las micropartículas de la invención ocurre durante al menos 62 días, mientras que micropartículas con PLGA y EGF (MP1) no tienen una liberación sostenida en el tiempo, liberándose el EGF encapsulado en ellas en menos de un día (Fig. 2A).

15

EJEMPLO 4. Estudio *in vitro* de la actividad biológica del EGF

La actividad biológica del EGF se evaluó mediante la adición de EGF a un cultivo celular en ausencia de suero. La proliferación celular, incrementada por la presencia del factor en el medio, se cuantificó utilizando el ensayo CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma-Aldrich, Saint Louise) tal y como se describe en Zhou et al (*Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Proliferation and Odontoblastic Differentiation of Human Dental Pulp Cells*. J Endod 2011;37(6):819-824.).

20

Conociendo la concentración de EGF añadida al medio celular es posible determinar la dosis eficaz 50 (ED₅₀, dosis mínima necesaria para que la mitad de la población prolifere). La ED₅₀ está directamente relacionada con la actividad biológica del EGF. Un valor bajo de ED₅₀ es indicativo de una mayor actividad biológica del EGF.

25

Las muestras que se analizaron fueron las siguientes:

- EGF estándar liofilizado sin encapsular (EGF liofilizado).
- EGF extraído de micropartículas en el ensayo de liberación. (MP5)
- EGF extraído de micropartículas irradiadas en el ensayo de liberación. (MP5-γ)

30

En la Tabla 2 se recogen las Dosis Eficaces 50 (ED₅₀) determinadas de los estándares de EGF utilizados (EGF liofilizado) y las del EGF extraído de las micropartículas con una carga de 1% de EGF antes y después de someterlas al proceso de esterilización.

Tabla 2.- ED₅₀ y desviación estándar (D.E.)

	Concentración pg/ml	D.E.
EGF liofilizado	66,95	10,67
MP5	54,87	8,58
MP5-γ	60,78	11,75

Tal y como se muestra en la Tabla 2, no existen diferencias significativas en la actividad

5 biológica del EGF cuándo se somete a liofilización. Tampoco se observan diferencias cuándo se encapsula en las micropartículas de la invención, ni cuándo éstas se esterilizan por radiación gamma. Así, la micropartícula de la invención puede ser esterilizada por radiación gamma sin que sus propiedades fisicoquímicas se vean sustancialmente afectadas.

10

EJEMPLO 5. Ensayo de la cicatrización *in vitro*

El ensayo de la cicatrización *in vitro* se llevó a cabo tal y como se describe en Walter et

al. (*Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays*, Experimental Cell Research

15 2010, 316: 1271-1281), en particular se analizó el efecto en los siguientes grupos experimentales: (A) medio fresco libre de suero, (B) 15 ng/mL rhEGF obtenido de micropartículas MP5 en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) libre de suero y (C) 15 ng/ml rhEGF libre en medio (DMEM) libre de suero. La anchura media de los huecos se calculó utilizando el software ImageJ® a partir de las micrografías tomadas 20 a las 0, 5, 18 y 24 h de la creación de la herida (Fig. 3).

Como se puede ver en la Fig. 3, el EGF liberado de las micropartículas de la invención reduce el área de la herida más rápido que los grupos control. Además, se ve que las

25 células tratadas con EGF no sufren cambios morfológicos, a diferencia de las tratadas únicamente con medio libre de suero, las cuales pierden su morfología fusiforme y elongada a partir de las 5 horas de tratamiento. Por lo que se demuestra que el EGF liberado de la micropartícula de la invención mantiene su actividad biológica *in vitro*.

EJEMPLO 6. Ensayo de cicatrización *in vivo*

30 Para la realización de este ensayo se utilizaron ratas Wistar hembras y se indujo diabetes siguiendo el protocolo descrito en Li et al. (*Research of PDGF-BB Gel on the Wound Healing of Diabetic Rats and Its Pharmacodynamics*. J Surg Res 2008

3;145(1):41-8.

La inducción de las heridas se llevó a cabo tal y como se describe en Galiano y Michaels (*Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. Wound repair and regeneration* 2004;12(4):485-492).

Los grupos experimentales analizados fueron los siguientes:

- Grupo control: Cicatrización espontánea, sin tratamiento.
- Grupo control vehículo: administración de 500 µL de vehículo (carboximetilcelulosa al 0,3% y tween 20 al 0,1% en cloruro sódico al 0,9%). Administración el día de la operación.
- Grupo control MP vacías: administración micropartículas resuspendidas en 500 µL de vehículo. Administración de 1 dosis el día de la operación.
- Grupo EGF libre: administración de 75 µg EGF libre disuelto en 500 µL de vehículo 2 veces por semana (días 0, 4, 7, 11, 14 y 17).
- Grupo MP:EGF: administración de MP5 (correspondientes a 75 µg de EGF) resuspendidas en 500 µL de vehículo. Administración de 1 dosis el día de la operación.

En todos los casos, la administración se hizo repartiendo la dosis por el centro y los bordes de la herida, administrando las formulaciones de manera subcutánea, por debajo de la fascia del *panniculus carnosum*.

El análisis macroscópico se realizó sacando fotos de las heridas los días 0, 4, 7, 11, 14 y 17 representando gráficamente la evolución del diámetro de la herida en función del tiempo (Fig. 4, Tabla 3).

25

Tabla 3.- Porcentaje del cierre de la herida en función del tiempo en días. Datos mostrados como media ± desviación estándar.

Grupos experimentales	Día 4	Día 7	Día 11	Día 14	Día 17
Control	14,34±7,82	50,76±4,58	79,60±11,98	88,91±5,60	94,40±2,88
Control vehículo	13,06±8,88	47,19±6,58	74,24±9,96	89,58±4,34	95,43±0,62
Control MP vacías	14,98±6,57	43,54±10,84	77,23±7,41	89,14±0,89	95,13±0,34
EGF libre	25,44±11,15*▲	51,47±10,29	78,97±4,44	95,08±1,03	97,00±0,20
MP:EGF	36,43±5,45*#	61,06±8,69*•▼	90,29±3,60*	97,31±1,11	99,16±0,49

*p<0,001 vs. control, control vehículo y control MP vacías.

#p<0,01 vs. EGF libre.

•p<0,01 vs. control vehículo.

▲p<0,05 vs. control y control vehículo.

5 ▨p<0,001 vs. control MP vacías.

▼p<0,05 vs control y EGF libre.

Como se muestra en la Tabla 3, el EGF liberado de la micropartícula de la invención mantiene su actividad biológica *in vivo*. Cuatro días después de la inducción de las 10 heridas, en los grupos tratados con EGF ya sea libre o liberado de la micropartícula (MP:EGF), la herida se reduce más que en los grupos control. A los 7 y 11 días, el grupo MP:EGF muestra un disminución del área de la herida estadísticamente significativa (61,06±8,69 %), en comparación con el EGF libre (51,46±10,29 %). En los días 7 y 11 15 después de la herida, la velocidad de cierre de la herida del grupo MP:EGF significativamente más alta que la de los demás grupos. Es importante destacar que la administración del EGF libre es de dos veces por semana (dosis de 75 µg de EGF) mientras que el EGF liberado de las micropartícula se aplica únicamente una vez. Esto supone una importante ventaja ya que se disminuyen el número de inyecciones repetidas a realizar en el área de la herida y se disminuye la probabilidad de padecer 20 efectos adversos al tratamiento.

Re-epitelialización

Para el análisis histológico se sacrificaron los animales con CO₂ los días 7, 11 y 17 (Fig. 5).

25 El grado de re-epitelización se midió siguiendo el criterio establecido en Sinha et al. (*Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO₂ laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa*. Laryngoscope 2003;113(2):228-236) Las zonas dónde se encontraba la lesión fueron extraídas con la ayuda de un bisturí, fijadas en formaldehido al 10% durante 24 horas y teñidas mediante 30 tinción hematoxilina-eosina. Se estudió la re-epitelización a partir del séptimo día.

Tal y como se muestra en la Fig. 5, en el grupo tratado con micropartículas con EGF y en el grupo control sin tratar la re-epitelialización se completa sin irregularidades el día 11. En el resto de grupos experimentales no se consiguió una re-epitelialización 35 completa hasta el final del estudio. Además, únicamente en el grupo MP:EGF la re-epitelización fue de espesor normal, lo que no ocurre cuando se utilizan soluciones

control o EGF libre. Esto supone una importante ventaja ya que con el EGF liberado de las micropartículas de la invención la cicatrización es similar a la fisiológica siendo el tejido cicatricial maduro y fisiológicamente bien organizado.

5 EJEMPLO 7. Micropartículas embebidas en una matriz de fibrina

Preparación de la solución de trombina: Alicuotar trombina a una concentración de 50 U/mL en una solución de BSA al 0,1% (p/v) y 0,025 mM de CaCl₂. Conservar a -20°C.

Preparación de la solución de fibrinógeno: Pesar 30-60 mg de fibrinógeno y añadir 1 mL de suero fisiológico (30 mg/mL). Dejar a 37°C hasta que se disuelva.

10 Gelificación del gel de fibrina: Añadir 0,5 mL de la solución de fibrinógeno a un tubo de ensayo dónde están las micropartículas de rhEGF. Añadirle 0,125 mL de solución de trombina, recoger rápidamente todo y añadir a pocillo de placa de 24. Poner a gelificar en estufa a 37°C y esperar a que gelifique. El gel de fibrina así preparado contiene 15-30 mg de fibrina.

15

En la Tabla 4 se muestra el porcentaje del cierre de la herida en función del tiempo en días. Datos mostrados como media ± desviación estándar.

Tabla 4. Porcentaje del cierre de la herida y desviación estándar.

20

	Día 1		Día 4		Día 8	
	% cierre	D.E.	% cierre	D.E.	% cierre	D.E.
Control	0,00	0,00	5,04	5,71	9,86	7,94
Control vehículo	0,00	0,00	1,75	6,98	14,49	8,81
Control MP vacías	0,00	0,00	7,35	4,36	9,63	5,85
EGF libre	0,00	0,00	8,42	3,96	19,94	5,21
MP EGF	0,00	0,00	22,10	7,73	43,12	3,97
Fibrina	0,00	0,00	5,92	3,46	19,09	9,63
MP EGF + fibrina	0,00	0,00	17,91	1,74	29,36	4,34

Como se ve en la Tabla 4, el EGF liberado de micropartículas embebidas en una matriz de fibrina mantiene su actividad biológica *in vivo* y es capaz de promover la cicatrización de heridas (Tabla 4).

REIVINDICACIONES

1. Micropartícula que comprende un polímero de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), un polímero de alginato, y factor de crecimiento epidérmico (EGF).
- 5 2. Micropartícula según la reivindicación 1 donde el factor de crecimiento epidérmico es el factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (rhEGF).
3. Micropartícula según la reivindicación 1 ó 2 que comprende entre 82,7% y 99,897% (p/p) de PLGA, entre 0,003% y 1,5 % (p/p) de factor de crecimiento epidérmico y entre 0,1% y 5% (p/p) de alginato, respecto al peso total de la micropartícula.
- 10 4. Micropartícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende 0,1-10% (p/p) de albúmina sérica humana y 0,1-0,8% (v/p) de polietilenglicol respecto al peso total de la micropartícula.
5. Micropartícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizada porque el factor de crecimiento epidérmico se libera durante al menos 30 días.
- 15 6. Micropartícula según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores embebida en una matriz de fibrina.
7. Composición farmacéutica que comprende una micropartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Uso de una micropartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento.
- 20 9. Uso de una micropartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la elaboración de un medicamento para promover la cicatrización de heridas en un individuo.
10. Uso según la reivindicación anterior, donde las heridas se seleccionan del grupo formado por úlceras de pie diabético, úlceras por presión, úlceras vasculares y combinaciones de las mismas.
- 25 11. Kit para promover la cicatrización de heridas que comprende una micropartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
12. Kit para promover la cicatrización de heridas que comprende una composición farmacéutica según la reivindicación 7.
- 30 13. Procedimiento para preparar una micropartícula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende las siguientes etapas:
 - a. Adición de una solución de PLGA en un disolvente orgánico (solución orgánica de PLGA) sobre una solución que comprende alginato y EGF (solución de EGF y alginato), y mezcla de la solución orgánica de PLGA y la solución de EGF y alginato,

- b. Adición de la emulsión obtenida en la etapa a) sobre una solución acuosa que comprende tensoactivos y cloruro de sodio (solución acuosa), y mezcla de la emulsión obtenida en la etapa a) y la solución acuosa,
 - c. Adición de la emulsión obtenida en b) a una solución que comprende cloruro de sodio y cloruro de calcio (solución de cloruros), y mezcla de la emulsión obtenida en la etapa b) y la solución de cloruros,
 - 5 d. Extracción del solvente, y
 - e. Aislamiento de la micropartícula.
14. Procedimiento según la reivindicación anterior donde el disolvente orgánico de la
10 solución orgánica de PLGA es una mezcla de diclorometano y acetona (3:1).
15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14 donde la
solución acuosa de la etapa b) comprende NaCl al 5-10% (p/v) respecto al volumen
total de la solución acuosa y la solución de cloruros de la etapa c) comprende NaCl
al 5-10% (p/v) en volumen respecto al volumen total de la solución de cloruros y de
15 0,6 al 1,2 mM de CaCl₂.
16. Procedimiento para la preparación de una micropartícula según la reivindicación 6
que comprende después de las etapas del procedimiento según una cualquiera de
las reivindicaciones 13-15 las siguientes etapas:
- 20 f. Liofilizar la micropartícula aislada en la etapa e), y
 - g. Embeber la micropartícula liofilizada obtenida en la etapa f) en una matriz
de fibrina.

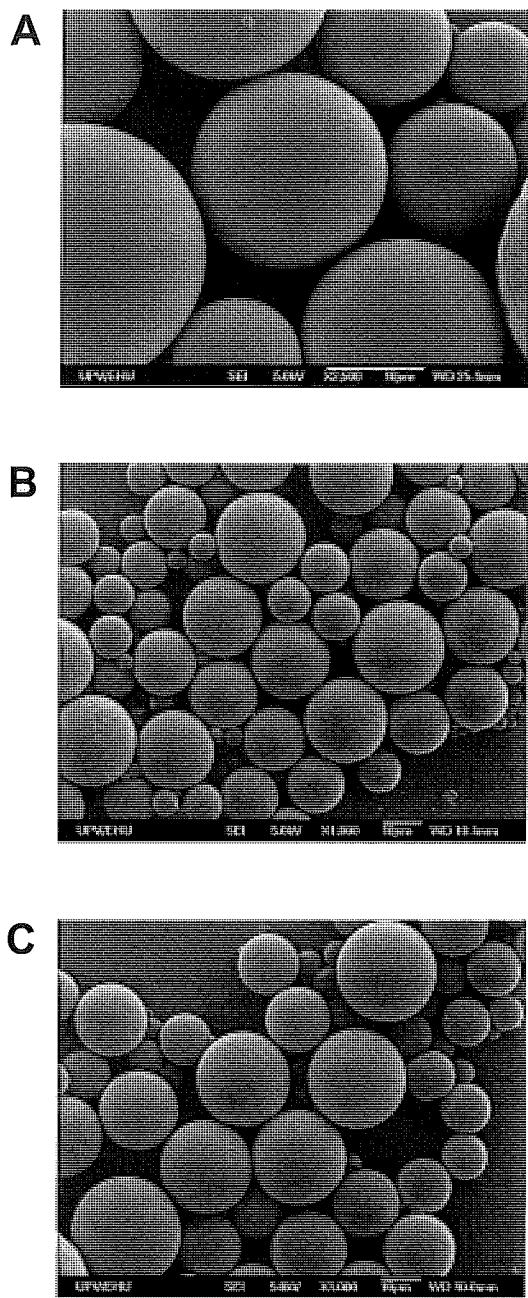
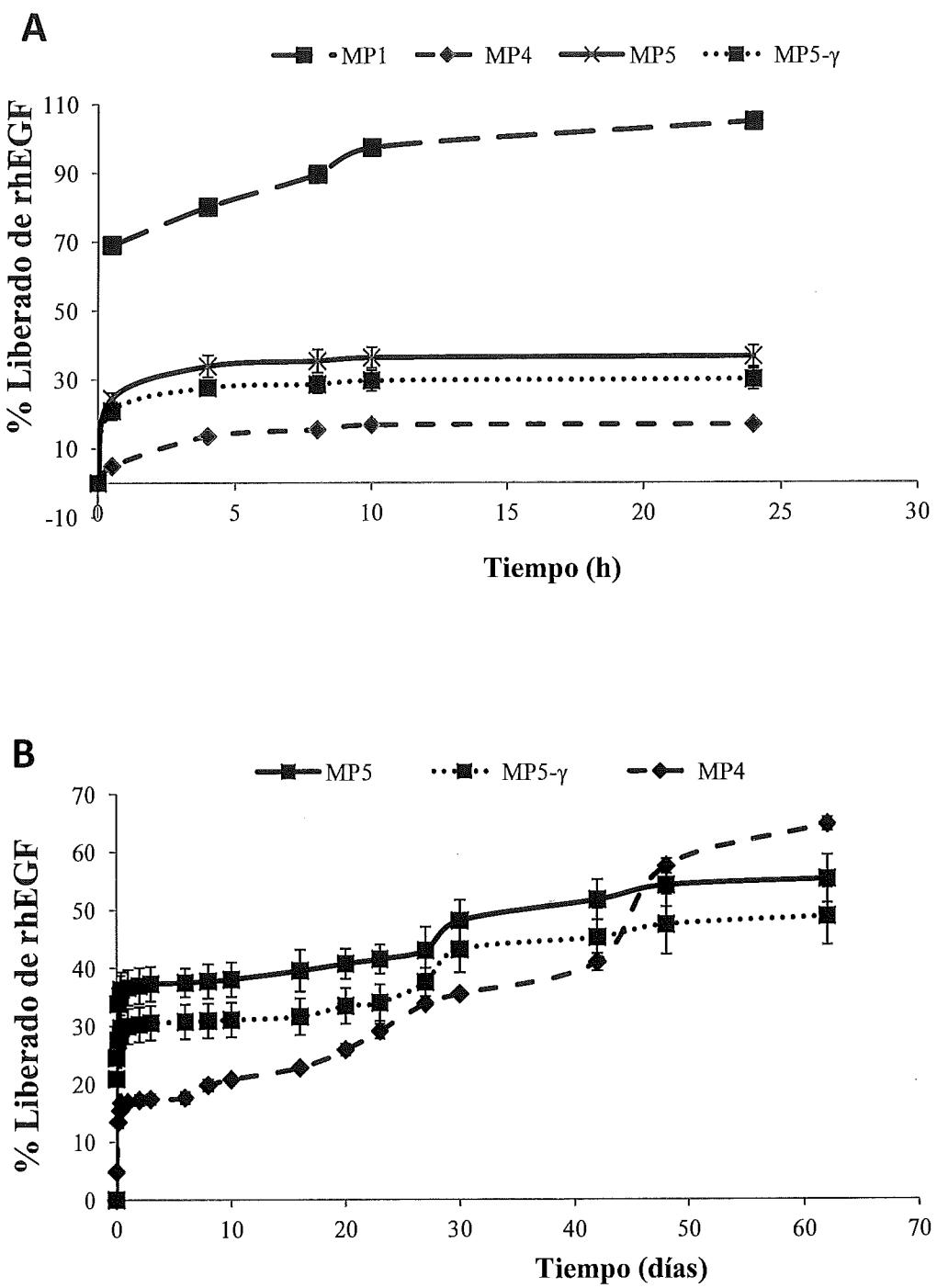


FIG. 1

**FIG. 2**

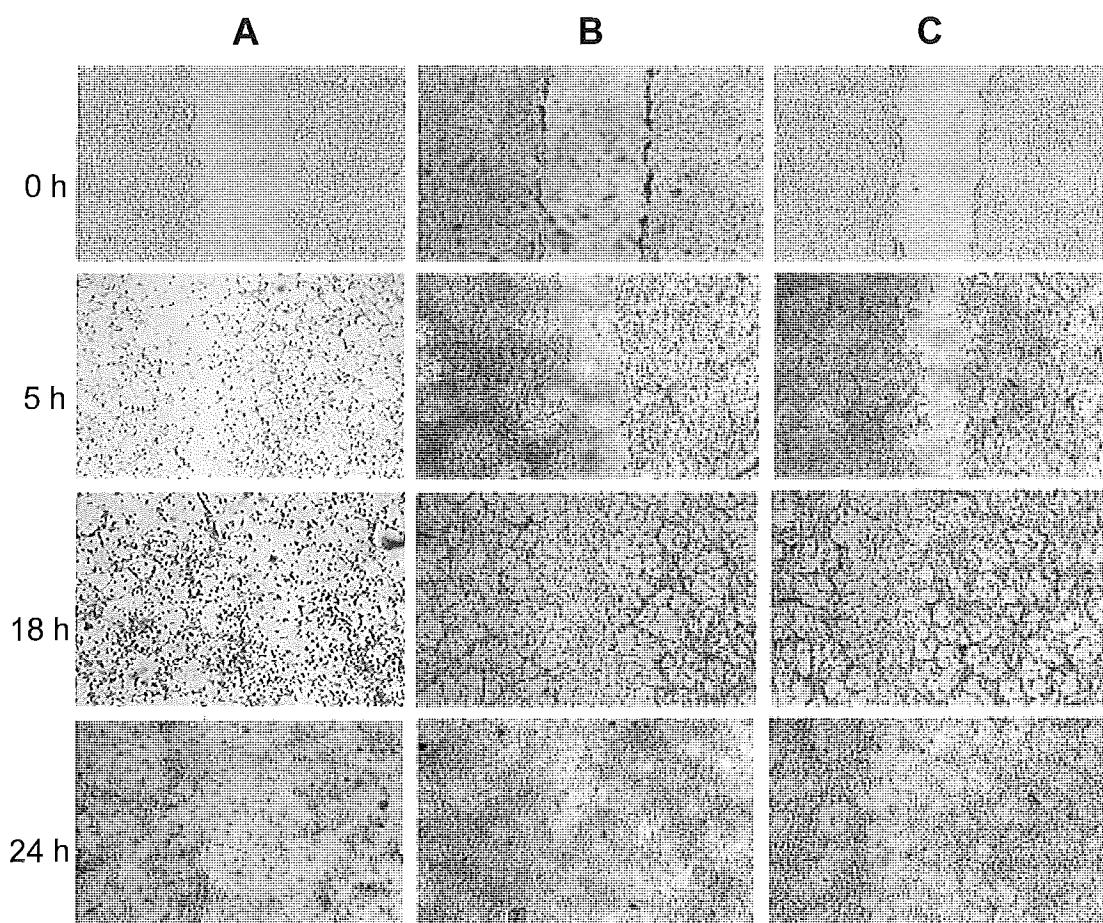


FIG. 3

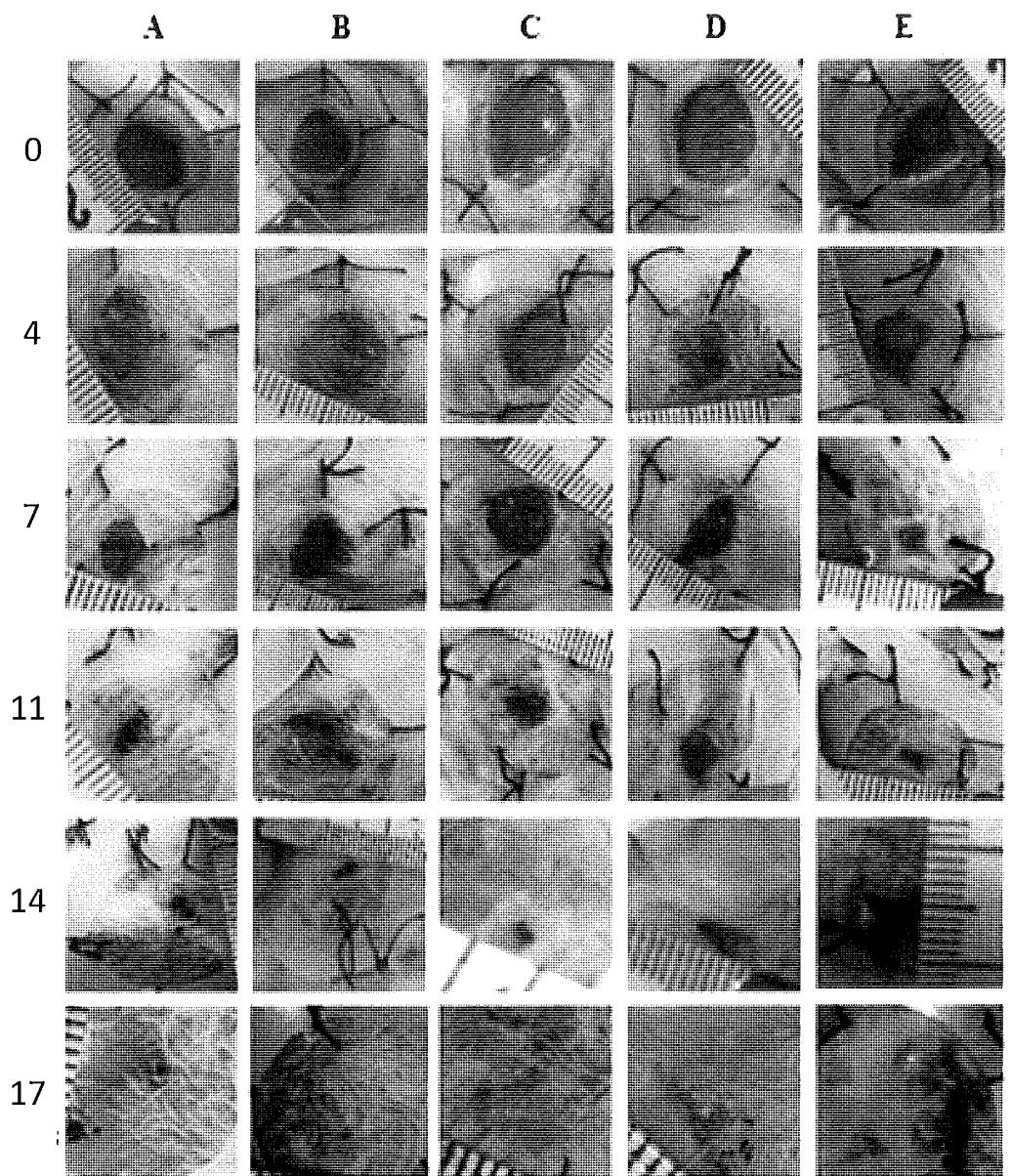


FIG. 4

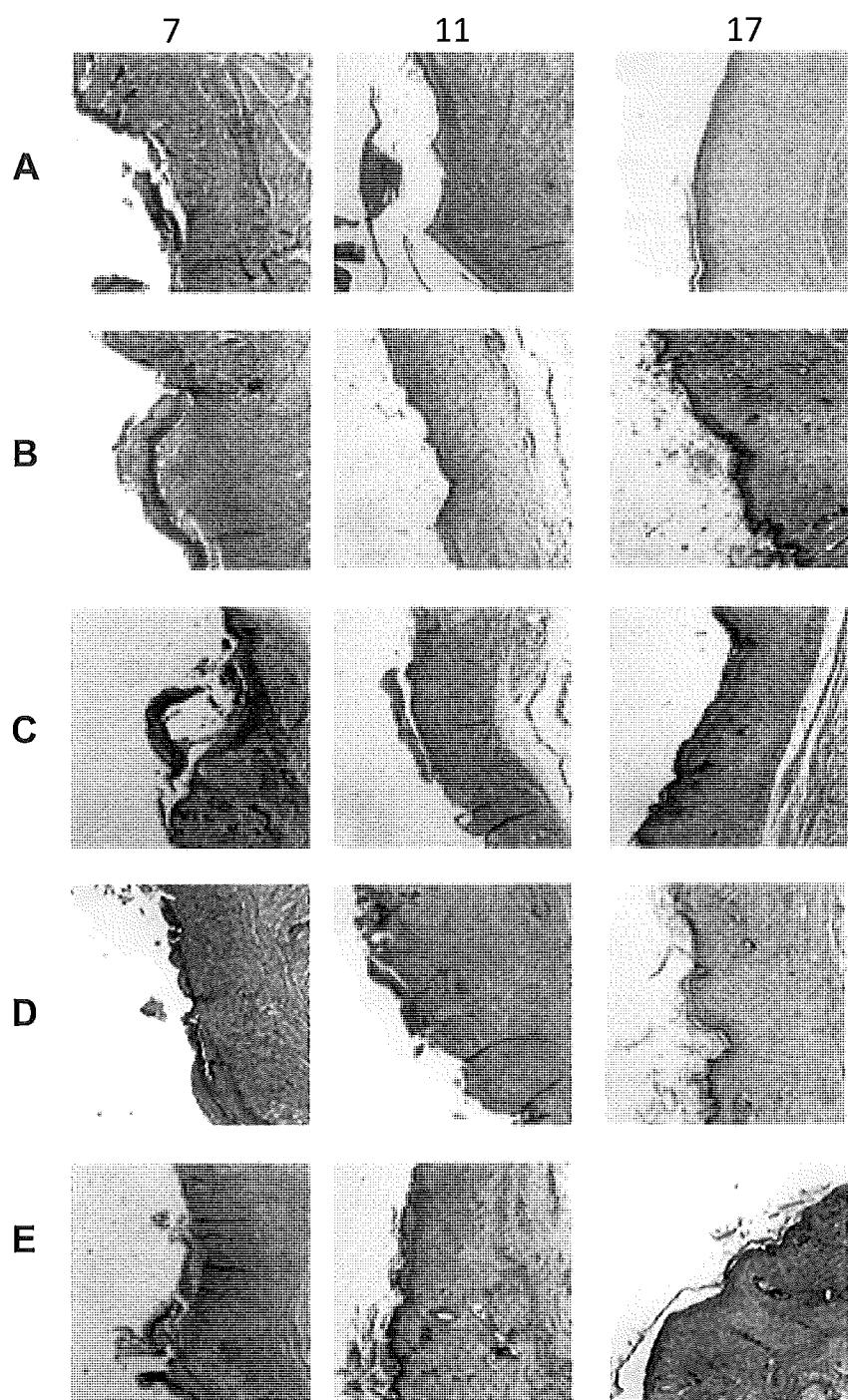


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201590050

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2013

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 1720989 A (SHENZHEN TSINGHUA YUANXING BIO) 18.01.2006, todo el documento.	1-16
A	EP 2075004 A1 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH) 01.07.2009, ejemplo 4.	1-16
A	EP 1987817 A2 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH) 05.11.2008, ejemplo 1.	1-16
A	DOWNS E C et al. "CALCIUM ALGINATE BEADS AS A SLOW-RELEASE SYSTEM FOR DELIVERING ANGIOGENIC MOLECULES IN VIVO AND IN VITRO." Journal of Cellular Physiology, 19920801 Wiley Subscription Services, Inc, US 01.08.1992 VOL: 152 No: 2 Págs: 422-429 ISSN 0021-9541 Doi: doi:10.1002/jcp.1041520225; todo el documento.	1-16
A	FERNANDEZ-MONTEQUIN J I et al. "Intralesional administration of epidermal growth factor-based formulation (Heberprot-P) in chronic diabetic foot ulcer: Treatment up to complete wound closure." INTERNATIONAL WOUND JOURNAL, 20090201 BLACKWELL PUBLISHING LTD, UK 01.02.2009 VOL: 6 No: 1 Págs: 67-72 ISSN 1742-4801 Doi: doi:10.1111/j.1742-481X.2008.00561.x; todo el documento.	1-16

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 15.02.2016	Examinador M. Á. García Coca	Página 1/4
--	---------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/18 (2006.01)**A61K9/52** (2006.01)**C07K14/485** (2006.01)

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

A61K, C07K

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, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-4, 6, 10, 13-16 Reivindicaciones 1, 5, 7-9, 11, 12	SI NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones Reivindicaciones 1-16	SI NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CN 1720989 A (SHENZHEN TSINGHUA YUANXING BIO)	18.01.2006
D02	EP 2075004 A1 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH)	01.07.2009
D03	EP 1987817 A2 (CT INGENIERIA GENETICA BIOTECH)	05.11.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-16, es una micropartícula que comprende un polímero de PLGA, un polímero de alginato y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (reiv. 1-6). Es también objeto de la invención una composición farmacéutica que comprende la micropartícula (reiv. 7), el uso de dicha micropartícula (reiv. 8-10), un kit que comprende la micropartícula (reiv. 11) y otro kit que contiene la composición que la contiene (reiv. 12). Por último es objeto de la invención el procedimiento para la obtención de la micropartícula de la invención (reiv. 13-16).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes)

El documento D01 divulga micropartículas que comprenden PLGA y factor de crecimiento epidérmico (EGF) a las que se le puede incorporar además, alginato de calcio (ver ejemplos 1, 2 y 5). Con estas micropartículas se obtiene una liberación sostenida de EGF durante más de 2 semanas. En este documento se describen las micropartículas como ingredientes activos de composiciones farmacéuticas, y su uso para promover la cicatrización de heridas.

Por lo tanto, en vista de lo divulgado en el documento D01, la invención recogida en las reivindicaciones 1, 5, 7-9, 11 y 12, carecen de novedad en el sentido del art. 6.1 LP.

Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 se considera el más cercano del estado de la técnica. Este documento divulga un método para la elaboración de micropartículas que comprende la adición de una solución de PLGA a una solución de EGF, la adición de emulsionantes, la extracción del solvente y el aislamiento de las micropartículas. El alginato de calcio puede ser añadido posteriormente a las micropartículas para el paso posterior de liofilización.

La diferencia entre la invención recogida en la reivindicación 13 y lo divulgado en el documento D01, radica en que el alginato se añade en la solución acuosa junto con el EGF, y esta solución se incorpora a la solución orgánica de PLGA, y que posteriormente, la mezcla obtenida se añade a la solución de cloruros.

No se observa un efecto técnico en esta diferencia, ya que las micropartículas de EGF obtenidas mediante el procedimiento descrito en el documento D01 también presentan una liberación sostenida del EGF. Por lo tanto, el problema técnico objetivo sería la provisión de un método alternativo de obtención de micropartículas de EGF de liberación sostenida. Como no se encuentra un efecto técnico sorprendente asociado al procedimiento de la invención, para un experto en la materia sería obvio el añadir el alginato en una etapa anterior del procedimiento, así como la elección de la solución de cloruros parece una mera opción de entre las posibles que el experto en la materia podría elegir, dependiendo de las circunstancias, para solucionar el problema planteado, sin que ello implique un ejercicio inventivo.

Por lo tanto, el objeto de la invención tal y como se recoge en la reivindicación 13 carece de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 LP.

Las características indicadas en las reivindicaciones 2-4, 6, 10 y 14-16 suponen una combinación de características obvias que un experto en la materia tendría en cuenta a partir de lo divulgado en los documentos del estado de la técnica citados, o son meras modificaciones a lo ya establecido en el estado de la técnica y que forman parte de la práctica habitual del experto en la materia. En consecuencia, las reivindicaciones 2-4, 6, 10 y 14-16 carecen de actividad inventiva en el sentido del art. 8.1 LP.