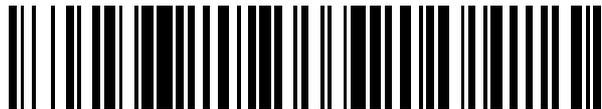


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 402**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2014 PCT/ES2014/070541**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15001163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2014 E 14761385 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 3023105**

54 Título: **Nanopartículas lipídicas para la cicatrización de heridas**

30 Prioridad:

04.07.2013 EP 13382275

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

09.03.2018

73 Titular/es:

**PRAXIS BIOPHARMA RESEARCH INSTITUTE
(100.0%)**

**C/ Hermanos Lumiere, 5, Parque Tecnológico de
Álava**

01510 Miñano (Araba/Álava), ES

72 Inventor/es:

GAINZA LAFUENTE, EUSEBIO;

GAINZA LUCEA, GARAZI;

VILLULLAS RINCÓN, SILVIA;

PASTOR NAVARRO, MARTA;

IBARROLA MORENO, OIHANE;

ALONSO HORNES, GORKA;

DEL POZO PÉREZ, ÁNGEL;

HERNÁNDEZ MARTÍN, ROSA MARÍA;

IGARTUA OLAECHEA, MANUELA y

PEDRAZ MUÑOZ, JOSÉ LUIS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 658 402 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas lipídicas para la cicatrización de heridas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nanopartículas lipídicas y a su uso como composiciones farmacéuticas para la cicatrización de heridas, en particular como suspensiones, apósitos o geles de nanopartículas para aplicación tópica.

Antecedentes de la invención

10 El tratamiento de heridas crónicas se ha convertido en un problema grave para los sistemas de salud de todo el mundo, representando un gran desafío económico y de salud pública. El aumento actual de factores de riesgo tales como el envejecimiento de la población, el tabaquismo, la diabetes y la obesidad pueden complicar y ralentizar el proceso de cicatrización de heridas, provocando heridas de difícil cicatrización.

En la actualidad se usan varios tratamientos paliativos incluyendo oxígeno hiperbárico, presión negativa y desbridamiento quirúrgico para el tratamiento de heridas crónicas en personas mayores. Además, está disponible en el mercado una amplia gama de apósitos sintéticos comerciales para el tratamiento de úlceras crónicas, aunque muestran una eficacia de cicatrización limitada.

15 El factor de crecimiento epidérmico (EGF) desempeña un papel importante en la regeneración y reparación tisular estimulando la migración, diferenciación y proliferación celular, así como promoviendo la formación de tejido de granulación. Desde un punto de vista clínico, el EGF se ha usado para potenciar la cicatrización de heridas, especialmente en las úlceras de pie diabético. En ensayos clínicos se han mostrado pruebas de los efectos beneficiosos de la aplicación de EGF por vía tópica en úlceras neuropáticas leves; sin embargo, el efecto de una
20 formulación de EGF para vía tópica puede verse disminuido, especialmente en heridas graves, ya que se ha identificado una actividad de proteasas aumentada en este tipo de heridas. Rengen-D 150™ es un gel que contiene 150 µg/g de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF), que se fabrica en la India para el tratamiento de úlceras diabéticas de grado I o II. Se requiere una administración de dos veces al día, durante un tiempo de tratamiento promedio de 6 semanas. Heberprot®, una formulación liofilizada que contiene 75 µg de
25 rhEGF, se administra tres veces por semana mediante inyecciones intralesionales. Se comercializa en Argelia, Argentina, Colombia, Cuba, República Dominicana y Venezuela. Un estudio piloto llevado a cabo en 20 pacientes diabéticos demostró que Heberprot® era un tratamiento viable y seguro para promover la cicatrización en heridas crónicas de pacientes con úlceras de tercer grado. Sin embargo, la corta semivida del rhEGF requiere una exposición continua (de al menos 6-12 horas) para potenciar el efecto mitogénico en las células epiteliales. Por lo tanto, para lograr un efecto terapéutico significativo en la cicatrización de heridas, es necesario optimizar la
30 administración de los factores de crecimiento, tales como el rhEGF, en cuanto a la dosis, el sistema de administración y la seguridad. Para este fin, Chu *et al.*, 2010 (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) han desarrollado un procedimiento para preparar nanopartículas del polímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) con un contenido en rhEGF del 2 %. La eficacia de encapsulación de rhEGF fue del 85,6 % y
35 presentó una liberación controlada de rhEGF biológicamente activo durante hasta 24 horas. La aplicación por vía tópica una vez al día de estas nanopartículas en heridas de tercer grado inducidas en ratas diabéticas promovió niveles de proliferación de fibroblastos más altos y velocidades de cicatrización más altas en comparación con rhEGF no encapsulado.

40 Además, la patente EP 1 987 817 B1 reivindica el procedimiento de producción de microesferas poliméricas que contienen rhEGF para la infiltración intralesional en las extremidades inferiores de pacientes diabéticos para prevenir la amputación de extremidades por diabetes. Las microesferas desarrolladas con un contenido en rhEGF del 1,6-2,4 % mostraron una liberación controlada de rhEGF de 5 y 10 µg al día durante 14 días y una cicatrización de lesiones mayor en humanos en comparación con cantidades equivalentes de rhEGF no encapsulado.

45 Sorprendentemente, los inventores han desarrollado nanopartículas lipídicas que comprenden factor de crecimiento epidérmico con altas eficacias de encapsulación, que aplicadas en una formulación para vía tópica dos veces por semana mejoran la cicatrización de heridas.

Breve resumen de la invención

50 De acuerdo con un aspecto, la solicitud se refiere a una nanopartícula lipídica (nanopartícula de la invención) que comprende al menos un lípido sólido a temperatura ambiente, al menos un tensioactivo no iónico y EGF. De acuerdo con un aspecto adicional, la solicitud se refiere a un procedimiento para la preparación de la nanopartícula lipídica de la invención caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 55
- (i) preparar una solución acuosa que comprende un tensioactivo no iónico,
 - (ii) preparar una solución lipófila que comprende un lípido sólido a temperatura ambiente en un disolvente orgánico,

- (iii) añadir la solución acuosa (i) a la solución lipófila (ii), someter la mezcla resultante a sonicación hasta obtener una emulsión,
- (iv) evaporar el disolvente orgánico de la emulsión obtenida en (iii), y
- (v) recoger las nanopartículas lipídicas,

5 en el que se añade EGF a la solución (ii).

De acuerdo con un aspecto adicional, la solicitud se refiere a una composición farmacéutica (composición farmacéutica de la invención) que comprende la nanopartícula lipídica de la invención y un vehículo farmacéutico.

10 De acuerdo con un aspecto adicional, la solicitud se refiere a la nanopartícula lipídica de la invención y a la composición farmacéutica que la comprende, para su uso como medicamento, y para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas.

Otros objetivos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

15 La **figura 1** muestra una representación gráfica del efecto *in vitro* de las nanopartículas lipídicas cargadas con rhEGF sobre la proliferación celular.

La **figura 2** muestra una microfotografía de la captación celular de las formulaciones de SLN-rojo Nilo y NLC-rojo Nilo.

20 La **figura 3** muestra una representación gráfica del efecto *in vivo* de (A) SLN cargadas con rhEGF y (B) NLC cargados con rhEGF sobre el cierre de heridas y (C) fotografías de las heridas en ratas control no tratadas y en ratas tratadas con SLN vacías, NLC vacíos, rhEGF-MS, control MS vacías, rhEGF libre, 20 µg de rhEGF-SLN, 10 µg de rhEGF-SLN, 20 µg de rhEGF-NLC, 10 µg de rhEGF-NLC. Datos mostrados como medias ± desviación estándar (D.E.). *Significativamente mayor que el control no tratado (*p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001); ■ Significativamente mayor que control MS vacías (■p<0,05, ■■p<0,01 y ■■■p<0,001); ● Significativamente mayor que SLN vacías (●p<0,05, ●●p<0,01 y ●●●p<0,001); ▼ Significativamente mayor que NLC vacíos (▼p<0,05, ▼▼p<0,01 y ▼▼▼p<0,001); ° Significativamente mayor que rhEGF libre (°p<0,05, °°p<0,01 y °°°p<0,001); ◇ Significativamente mayor que 75 µg de rhEGF-MS (◇p<0,05, ◇◇p<0,01 y ◇◇◇p<0,001); ▲ Significativamente mayor que 10 µg de rhEGF-SLN (▲p<0,05, ▲▲p<0,01 y ▲▲▲p<0,001).

30 La **figura 4** muestra una representación gráfica del efecto *in vitro* de las nanopartículas lipídicas cargadas con rhEGF sobre la calificación de inflamación (A, C) y sobre la calificación de reepitelización (B, D). Datos mostrados como medias ± D.E. *Significativamente mayor que el control no tratado (*p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001); ■ Significativamente mayor que control MS vacías (■p<0,05, ■■p<0,01 y ■■■p<0,001); ● Significativamente mayor que SLN vacías (●p<0,05, ●●p<0,01 y ●●●p<0,001); ▼ Significativamente mayor que NLC vacíos (▼p<0,05, ▼▼p<0,01 y ▼▼▼p<0,001); ° Significativamente mayor que rhEGF libre (°p<0,05, °°p<0,01 y °°°p<0,001); ◇ Significativamente mayor que 75 µg de rhEGF-MS (◇p<0,05, ◇◇p<0,01 y ◇◇◇p<0,001); ▲ Significativamente mayor que 10 µg de rhEGF-SLN (▲p<0,05, ▲▲p<0,01 y ▲▲▲p<0,001).

40 La **figura 5** muestra microfotografías (A) y una representación gráfica (B) de la captación cutánea de SLN-rojo Nilo y NLC-rojo Nilo y parafina-rojo Nilo (valores de brillo de píxel arbitrarios (ABU) corregidos con respecto a la fluorescencia de fondo en el estrato córneo, epidermis y dermis). *Significativamente mayor que parafina-rojo Nilo (*p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001). Los números insertados aportan la potenciación respectiva de la penetración con respecto a la crema de parafina (PEE).

La **figura 6** muestra una representación gráfica del efecto *in vitro* de las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 sobre la proliferación celular.

La **figura 7** muestra una representación gráfica del efecto *in vitro* de la combinación de rhEGF y LL37 sobre la proliferación celular.

45 La **figura 8** muestra (A) una representación gráfica del efecto *in vivo* de NLC vacíos, rhEGF libre y 20 µg de rhEGF-NLC sobre el cierre de heridas en cerdos a los 15, 25, 36 y 43 días y (B) fotografías de las heridas en cerdos tratados con NLC vacíos, rhEGF libre y 20 µg de rhEGF-NLC.

50 La **figura 9** muestra (A) una representación gráfica de la longitud epitelial en los diferentes grupos estudiados (NLC vacíos, rhEGF libre y 20 µg de rhEGF-NLC) a los 15, 25 y 43 días y (B) imágenes histológicas de las heridas a los 15, 25 y 43 días. Datos mostrados como medias ± D.E. *** Significativamente mayor que NLC vacíos y rhEGF libre (p<0,001).

La **figura 10** muestra una representación gráfica de la extensión de la cicatrización de heridas (mm) a los 15 (A), 25 (B) y 43 (C) días. Datos mostrados como medias \pm D.E. ***p <0,001 en comparación con los grupos de NLC vacíos y rhEGF libres.

Descripción detallada de la invención

- 5 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una nanopartícula lipídica caracterizada porque comprende al menos un lípido sólido a temperatura ambiente, al menos un tensioactivo no iónico y EGF.

Cabe destacar que, como se usa en la presente solicitud, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

- 10 En el contexto de la presente invención, nanopartículas lipídicas se refieren a partículas en el intervalo nanométrico que presentan una matriz sólida. La matriz se compone por lípidos que son sólidos a temperatura ambiente, pero también a temperatura corporal. En el caso de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN), la matriz consiste solo en un lípido sólido. En el caso de vehículos lipídicos nanoestructurados (NLC, del inglés *Nanostructured Lipid Carriers*) la matriz consiste en una combinación de lípidos sólidos con lípidos líquidos (aceites), pero siendo esta combinación a su vez sólida a temperatura ambiente y también a temperatura corporal (Muller *et al.*, 2002, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (1) S131-S155). El término “cargado con factor de crecimiento” se refiere al factor de crecimiento incluido o encapsulado en la matriz de la nanopartícula. Así, en una realización particular, las nanopartículas lipídicas son SLN y en otra realización particular, las nanopartículas lipídicas son NLC. Así, en una realización particular, las nanopartículas lipídicas son SLN o NLC. El factor de crecimiento pertenece a la familia de factores de crecimiento epidérmicos (EGF), y más preferiblemente el factor de crecimiento es el factor de crecimiento epidérmico.
- 15 En una realización particular, las nanopartículas lipídicas son SLN cargadas con EGF (también denominadas EGF-SLN a continuación en el presente documento) y/o NLC cargados con EGF (también denominados EGF-NLC a continuación en el presente documento). En una realización particular de la invención, el factor de crecimiento epidérmico es el factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF). Dicho rhEGF se puede obtener comercialmente (Peptotech, Promega, Pharmchem, etc.) o producir por medio de tecnología de ADN recombinante, como se describe por ejemplo 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*. 25 de enero de 1991; 266(3): 1728-32), o en la solicitud de patente WO 91/18999 A1. En una realización particular, la nanopartícula lipídica de la invención tiene una proporción de factor de crecimiento, en particular EGF comprendida entre el 0,01 % y el 20 % en peso con respecto al peso total de la nanopartícula lipídica, preferiblemente entre el 0,1 % y el 10 % en peso y más preferiblemente entre el 0,5 % y el 5 % en peso con respecto al peso total de la nanopartícula lipídica.
- 20
- 25
- 30

- 35 Como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas lipídicas de la presente invención comprenden al menos un lípido sólido a temperatura ambiente. En el contexto de la presente invención, se entiende “lípido sólido a temperatura ambiente” como el lípido que es sólido a menos de 45 °C, pudiendo ser saturado o insaturado. Dicha definición incluye mono-, di-, o triglicéridos, ácidos grasos, esteroides y ceras. Asimismo, se pueden usar derivados de esos ácidos grasos, conocidos como los compuestos producidos como resultado de la reacción del grupo ácido con alcoholes o aminas tales como, por ejemplo, los ésteres o amidas de dichos ácidos grasos. Así, en una realización particular, el lípido sólido a temperatura ambiente se selecciona de acilglicéridos, ácidos grasos saturados con una cadena de al menos 10 átomos de carbono o derivados de los mismos o mezclas de los mismos. En una realización preferida, los acilglicéridos se seleccionan de palmitoestearato de glicerilo (Precirol® AT05), monoestearato de glicerilo (Imwitor® 900) y behenato de glicerilo (Compritrol® 888ATO). En una realización más preferida, el componente lipídico es palmitoestearato de glicerilo (Precirol® AT05).
- 40

- 45 En una realización particular de la invención, la nanopartícula lipídica tiene una proporción de lípido sólido comprendida entre el 1 % y el 40 % de peso con respecto al peso total de la nanopartícula lipídica, preferiblemente entre el 5 % y el 15 %.

- 50 Como se ha mencionado anteriormente, las nanopartículas lipídicas de la invención también comprenden un tensioactivo no iónico. El término “tensioactivo no iónico” se entiende como el compuesto que tiene una parte hidrófoba y una parte hidrófila que le permite producir una emulsión. En una realización particular de la presente invención, el tensioactivo no iónico se selecciona de polisorbatos, copolímeros de polietilenglicol, y copolímeros de polipropilenglicol, y mezclas de los mismos. En una realización particular, el tensioactivo no iónico se selecciona del grupo que consiste en Tween, Span, poloxámero y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el tensioactivo no iónico es Tween 80, y en otra realización preferida, el tensioactivo no iónico es una mezcla de Tween 80 y poloxámero.

- 55 En una realización particular de la invención, la proporción de tensioactivo no iónico está comprendida entre el 0,01 % y el 10 % en peso con respecto al peso total de la nanopartícula lipídica, preferiblemente entre el 0,05 % y el 5 %.

En una realización particular de la invención, la nanopartícula lipídica de la invención comprende entre el 1 % y el 40 % del lípido sólido a temperatura ambiente, entre el 0,01 % y el 10 % del tensioactivo no iónico y entre el 0,01 % y el 20 % del factor de crecimiento, todos los porcentajes dados en peso con respecto al peso total de la nanopartícula lipídica.

- 5 En una realización particular, la nanopartícula lipídica de la invención se puede presentar opcionalmente como producto liofilizado o desecado.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a las nanopartículas lipídicas del primer aspecto que comprenden además un lípido líquido a temperatura ambiente. En el contexto de la presente invención, "lípido líquido a temperatura ambiente" se conoce como el lípido que es líquido a temperatura ambiente y a menos de 45 °C, pudiendo ser saturado o insaturado. El lípido líquido a temperatura ambiente se selecciona de ésteres de ácidos grasos, aceites, ácidos grasos y triglicéridos saturados o insaturados que tienen una cadena con menos de 10 átomos de carbono, y sus mezclas (por ejemplo triglicérido de ácido caprílico y ácido cáprico (Miglyol®), aceite de soja, miristato de isopropilo, aceite de ricino). En una realización preferida, se usa Miglyol® como lípido líquido. En una realización preferida, el componente lipídico de las nanopartículas lipídicas es una combinación de palmitoestearato de glicerilo (Precirol® AT05) y triglicérido de ácido caprílico y ácido cáprico (Miglyol®). En otra variante de este segundo aspecto de la invención, cuando el lípido líquido a temperatura ambiente se incorpora en la nanopartícula, está en una proporción comprendida entre el 1 % y el 30 % en peso con respecto al peso total de la nanopartícula lipídica, preferiblemente entre el 5 % y el 15 %. En otra realización, la proporción de lípido sólido:lípido líquido está entre 0,5:10 y 5:10.

20 En un tercer aspecto de la invención, la presente invención se refiere a un procedimiento (procedimiento 1 de la invención) para la preparación de la nanopartícula lipídica del primer aspecto de la invención definida en los párrafos anteriores, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- (i) preparar una solución acuosa que comprende un tensioactivo no iónico,
 (ii) preparar una solución lipófila que comprende un lípido sólido a temperatura ambiente en un disolvente orgánico,
 (iii) añadir la solución acuosa (i) a la solución lipófila (ii), someter la mezcla resultante a sonicación hasta obtener una emulsión,
 (iv) evaporar el disolvente orgánico de la emulsión obtenida en (iii), y
 (v) recoger las nanopartículas,

30 en el que se añade EGF a la solución (ii).

Las nanopartículas lipídicas obtenidas con este procedimiento 1 son SLN. La primera etapa (i) consiste en disolver el tensioactivo no iónico en una solución acuosa, preferiblemente agua. La segunda etapa (ii) de preparación de la solución lipófila se lleva a cabo por medio de la disolución del lípido sólido a temperatura ambiente en un disolvente orgánico, donde la proporción de lípido sólido es de al menos el 1 % en peso con respecto al peso total del disolvente orgánico. El factor de crecimiento, preferiblemente EGF, y más preferiblemente rhEGF, se disuelve junto con el lípido en el disolvente orgánico. La elección del disolvente orgánico depende en gran medida del componente lipídico. En una realización particular de la invención, el disolvente orgánico se selecciona de diclorometano, acetona, cloroformo, y mezclas de los mismos, más preferiblemente es diclorometano.

Una vez que se han preparado ambas soluciones, la solución acuosa (i) se añade a la solución lipófila (ii). A continuación, la mezcla resultante se somete a sonicación hasta obtener una emulsión. Posteriormente, el disolvente orgánico se evapora por medio de cualquier procedimiento conocido por el experto en la técnica. En una realización particular, la etapa de evaporación del disolvente orgánico se lleva a cabo manteniendo la emulsión con agitación mecánica durante al menos 60 minutos, preferiblemente al menos 120 minutos. Tras eliminar el disolvente orgánico, la solución lipófila se solidifica, y se obtiene una suspensión de nanopartículas, que a continuación se filtra mediante centrifugación. Finalmente, las nanopartículas lipídicas recogidas se lavan y resuspenden en agua purificada.

En un cuarto aspecto de la invención, la presente invención se refiere a un procedimiento (procedimiento 2 de la invención) para la preparación de la nanopartícula lipídica del segundo aspecto de la invención definida en los párrafos anteriores, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- (i) preparar una solución acuosa que comprende un tensioactivo no iónico,
 (ii) preparar una solución lipófila que comprende una combinación de un lípido sólido y un lípido líquido fundidos a una temperatura más alta que el punto de fusión del lípido líquido,
 (iii) calentar la solución acuosa (i) hasta la misma temperatura que la solución lipófila (ii),
 (iv) añadir la solución acuosa (i) a la solución lipófila (ii), someter la mezcla resultante a sonicación hasta obtener una emulsión,
 (v) enfriar la emulsión (iv) a 5 °C ± 3 °C para permitir la recristalización de lípidos y la formación de nanopartículas, y
 (vi) recoger las nanopartículas,

en el que se añade EGF a la solución (ii).

Las nanopartículas lipídicas obtenidas con este procedimiento 2 son NLC. La primera etapa (i) consiste en disolver el tensioactivo no iónico en una solución acuosa, preferiblemente agua. La segunda etapa (ii) de preparación de la solución lipófila se lleva a cabo fundiendo una combinación de un lípido sólido y un lípido líquido a una temperatura mayor que el punto de fusión del lípido líquido. El factor de crecimiento, EGF, y más preferiblemente rhEGF, se disuelve junto con la combinación de lípidos.

Una vez que la solución acuosa (i) se calienta hasta la temperatura a la que se ha fundido la combinación de lípidos, se añade la solución acuosa (i) a la solución lipófila (ii). A continuación, la mezcla resultante se somete a sonicación hasta obtener una emulsión. Posteriormente, la emulsión (iv) se enfría a una temperatura de $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir la recristalización lipídica y la formación de nanopartículas. Tras la recristalización lipídica, se obtiene una suspensión de nanopartículas, que a continuación se filtra mediante centrifugación. Finalmente, las nanopartículas lipídicas recogidas se lavan y resuspenden en agua purificada.

Un quinto aspecto se refiere a las nanopartículas lipídicas obtenidas por el procedimiento 1 y a las nanopartículas lipídicas obtenidas por el procedimiento 2.

Las nanopartículas lipídicas de los aspectos primero, segundo y quinto de la presente invención se caracterizan por tener un tamaño de partícula medio igual a o menor de $1\text{ }\mu\text{m}$, preferiblemente tienen un tamaño medio comprendido entre 1 nm y 100 nm , y más preferiblemente entre 150 nm y 400 nm . El tamaño medio se puede medir por procedimientos estándar conocidos por el experto en la técnica, y que se describen, por ejemplo, en la parte experimental, dada a continuación (tabla 1, ejemplo 2). Además, las nanopartículas lipídicas pueden tener una carga superficial (medida por medio del potencial Z), la magnitud puede variar entre -50 mV y $+80\text{ mV}$ (tabla 1, ejemplo 2). Además, las nanopartículas lipídicas tienen una eficacia de encapsulación mayor del 70% para SLN y mayor del 95% para NLC (tabla 1, ejemplo 2).

Una característica importante de las nanopartículas lipídicas de la presente invención es que liberan el factor de crecimiento cargado de una manera de liberación prolongada. Las nanopartículas lipídicas cargadas con factor de crecimiento presentan un perfil de liberación caracterizado por una liberación inicial (liberación brusca) asociada al porcentaje de proteína asociada a la superficie, seguida de una fase de liberación rápida de desde 4 horas hasta 24 horas y finalmente, se describe una fase más lenta de desde 24 horas hasta 72 horas terminando con la liberación de la cantidad total de factor de crecimiento (tabla 3, ejemplo 2).

Esta característica de liberación prolongada proporciona una ventaja importante, ya que permite tratamientos más seguros en comparación con los que usan EGF libre, que requieren de administraciones continuas del factor de crecimiento y dosis más altas para lograr el mismo efecto terapéutico. Además, reduciendo la dosis se pueden disminuir más efectos secundarios adversos no deseados ya que la administración de dosis más altas de factor de crecimiento ya no es necesaria porque el factor de crecimiento encapsulado se libera a lo largo del tiempo, en una dosis menor pero más eficaz. Finalmente, la liberación prolongada del factor de crecimiento permite disminuir el número de administraciones, aumentando la adherencia al tratamiento por parte del paciente y en consecuencia, la calidad de vida del paciente.

Sorprendentemente los inventores encontraron que las nanopartículas lipídicas de la presente invención, es decir, nanopartículas lipídicas cargadas con EGF, muestran una tasa de proliferación de fibroblastos *in vitro* inesperadamente mayor que la del EGF libre (ejemplo 3, sección 3.1, figura 1). Además, las nanopartículas lipídicas de la invención, es decir, EGF-SLN y EGF-NLC, pueden entrar en la célula (ejemplo 3, sección 3.2, figura 2).

De manera interesante, estudios *in vivo* muestran que 4 administraciones por vía tópica de rhEGF-SLN a una dosis de $10\text{ }\mu\text{g}$ y $20\text{ }\mu\text{g}$ de rhEGF mejora adicionalmente la cicatrización de heridas, en cuanto al cierre de heridas (figura 3A, C), resolución de la inflamación (figura 4A) y proceso de reepitelización (figura 4B), en comparación con $300\text{ }\mu\text{g}$ de rhEGF administrado en 4 aplicaciones intralesionales. Además, estudios *in vivo* muestran que 4 administraciones por vía tópica de rhEGF-NLC a una dosis de $10\text{ }\mu\text{g}$ y $20\text{ }\mu\text{g}$ de rhEGF mejoran adicionalmente la cicatrización de heridas, en cuanto al cierre de heridas (figura 3B, C), resolución de la inflamación (figura 4C) y proceso de reepitelización (figura 4D), en comparación con $300\text{ }\mu\text{g}$ de rhEGF administrado en 4 aplicaciones intralesionales. Además, los datos obtenidos revelan que el proceso de cicatrización de heridas se mejoró considerablemente con $20\text{ }\mu\text{g}$ o $10\text{ }\mu\text{g}$ de rhEGF encapsulado en SLN y NLC, en términos de cierre de heridas tras 8 y 11 días de estudio, en comparación con una dosis intralesional de $75\text{ }\mu\text{g}$ de microesferas rhEGF-MS de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Así, el uso de lípidos como material de matriz para una nanopartícula es ventajoso con respecto al uso de polímeros comunes biodegradables e hidrolíticamente degradables, tales como PLGA, porque las nanopartículas lipídicas permiten la administración por vía tópica de la molécula cargada en las nanopartículas lipídicas.

Además, los estudios *in vivo* mostrados en el ejemplo 6 (figuras 8-10) muestran que la administración local y por vía tópica de rhEGF-NLC puede potenciar la cicatrización de heridas no solo en términos de velocidad de cicatrización de heridas y número de heridas cicatrizadas (medición de cierre de heridas), sino también en términos de calidad de cicatrización basándose en la microvasculatura formada recientemente, la migración de fibroblastos, la deposición de colágeno y la evolución de la respuesta inflamatoria. Además, estos resultados son muy relevantes porque los animales tratados con $20\text{ }\mu\text{g}$ de rhEGF-NLC administrado por vía tópica potenciaron significativamente su cicatrización en comparación con las lesiones tratadas con $75\text{ }\mu\text{g}$ de rhEGF libre administrado intralesionalmente.

Estos datos, junto con los datos de porcentaje de heridas cerradas y reepitelización demuestran que la nanoencapsulación de rhEGF en rhEGF-NLC permite la administración por vía tópica y reducción de la dosis porque la encapsulación evita la degradación del factor de crecimiento en el lugar de la herida.

5 De manera interesante, EGF-SLN y EGF-NLC muestran una capacidad de penetración en la piel mejorada en comparación con crema de parafina (ejemplo 3, sección 3.4, figura 5). Esta es una ventaja importante porque permite la administración por vía tópica de la molécula cargada en las nanopartículas lipídicas.

10 Así, un sexto aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la nanopartícula lipídica de la invención definida en el primer, segundo y quinto aspecto de la invención, como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores y un vehículo farmacéutico. En una realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica se administra por vía tópica. Se puede administrar en forma de gel, crema, pomada, apósito o como parche. Así, en una realización particular, la composición farmacéutica también comprende colágeno, ácido hialurónico, aloe vera, fibrina, polímeros de carbopol® y derivados de celulosa.

15 Además, un séptimo aspecto de la presente invención se refiere a la nanopartícula lipídica definida en el primer, segundo y quinto aspecto de la invención como se describe en cualquiera de los párrafos anteriores para su uso como medicamento. Además, en un octavo aspecto, la invención se refiere a la composición farmacéutica definida en el sexto aspecto para su uso como medicamento.

20 Teniendo en cuenta los resultados *in vivo* descritos anteriormente, otro aspecto de la invención, noveno aspecto de la invención, se refiere a la nanopartícula lipídica definida en el primer, segundo y quinto aspecto de la invención descrita en cualquiera de los párrafos anteriores, para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto. Preferiblemente, se refiere a SLN cargadas con EGF, para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto, y a NLC cargados con EGF, para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto. Además, en un décimo aspecto, la invención se refiere a la composición farmacéutica definida en el sexto aspecto para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto. El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier animal vertebrado, preferiblemente a un mamífero, y más preferiblemente a un ser humano. En el contexto de la presente invención, herida se refiere a heridas crónicas, heridas de difícil cicatrización, heridas isquémicas y quemaduras. En una realización particular, la herida se selecciona del grupo que comprende heridas crónicas, heridas isquémicas, quemaduras y combinaciones de las mismas. Las heridas crónicas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en úlceras de pie diabético, úlceras de presión, úlceras vasculares y mezclas de las mismas.

30 En el contexto de la presente invención, las heridas crónicas se definen como heridas que no logran pasar por un proceso de reparación de manera ordenada y oportuna para restablecer la integridad anatómica y funcional a lo largo de un periodo de tres meses. Todos los tipos de heridas tienen el potencial de convertirse en crónicas y, como tal, las heridas crónicas se dividen tradicionalmente por su etiología en tres categorías: úlceras de presión, diabéticas y vasculares (úlceras venosas y arteriales). Una úlcera de presión se define como un área de daño localizado en la piel y/o tejido subyacente, generalmente en una prominencia ósea, como resultado de presión o cizalla y/o una combinación de ambas. Las úlceras de pie diabético son una de las complicaciones más temidas de la diabetes, debido a las graves consecuencias que tienen sobre la calidad de vida del paciente, y que aparecen como resultado de diversos factores tales como cambios mecánicos en la conformación de la arquitectura ósea del pie, neuropatía periférica (nervios dañados) y enfermedad vascular periférica (bloqueo de arterias), que todas ellas se producen con mayor frecuencia e intensidad en la población diabética. Las úlceras vasculares, se localizan generalmente en las extremidades inferiores. La gran mayoría de úlceras vasculares son crónicas o recurrentes. Provocan una morbilidad considerable entre los pacientes con enfermedad vascular periférica. Las heridas arteriales o isquémicas se provocan por una perfusión escasa a las extremidades inferiores. La isquemia limita el suministro de nutrientes y oxígeno, matando los tejidos y provocando en el área la formación de una herida abierta. El flujo sanguíneo reducido al lugar de la herida afecta gravemente a la respuesta cicatrizante, provocando una herida crónica que puede dar lugar a gangrena, y por tanto, a amputación. Finalmente, las heridas de difícil cicatrización se caracterizan por la persistencia crónica de células inflamatorias, síntesis desordenada y remodelación de la matriz extracelular, y la falta de reepitelización; y las quemaduras son daños en la piel provocados por el efecto de calor, fuego, radiación, luz solar, electricidad o productos químicos.

50 Sorprendentemente los inventores encontraron que la combinación de EGF y el péptido antimicrobiano de catelicidina LL37 muestra una proliferación celular inesperadamente mayor que EGF libre y LL37 libre, respectivamente (ejemplo 4, figura 7). El péptido LL37 corresponde al fragmento C-terminal de la proteína antimicrobiana catelicidina humana, hCAP18, que es un componente del sistema inmunitario innato y que tiene una amplia actividad antimicrobiana (Heilborn *et al.*, 2003, The cathelicidin antimicrobial peptide LL37 is involved in re-epithelization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol* 120(3): 379-389). Así, un decimoprimer aspecto de la presente invención se refiere a una composición (composición de la invención) que comprende nanopartículas lipídicas de acuerdo con el primer, segundo y quinto aspecto de la presente invención y nanopartículas lipídicas que comprenden al menos un lípido sólido a temperatura ambiente, al menos un tensoactivo no iónico y el péptido LL37. En una realización particular de este aspecto, la composición comprende NLC cargados con EGF y NLC cargados con LL37. En otra realización particular, la composición comprende SLN cargadas con EGF y SLN cargadas con LL37. En otra realización particular de este aspecto, en la composición de la

invención la proporción de nanopartículas lipídicas cargadas con factor de crecimiento, preferiblemente cargadas con EGF, y nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 está entre 1:17 y 1:34. En otra realización particular, la composición comprende 15 ng/ml de nanopartículas lipídicas cargadas con EGF y de 0,25 a 5 µg/ml de nanopartículas lipídicas cargadas con LL37.

5 Un decimosegundo aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con el decimoprimer aspecto de la invención descrito en el último párrafo y un vehículo farmacéutico. En una realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica se administra por vía tópica. Así, en una realización particular, la composición farmacéutica también comprende colágeno, ácido hialurónico, aloe vera, fibrina, polímeros de carbopol® y derivados de celulosa.

10 Además, un decimoterceer aspecto de la presente invención se refiere a la composición farmacéutica del decimosegundo aspecto, para su uso como medicamento.

Un decimocuarto aspecto de la presente invención, se refiere a la composición farmacéutica definida en el decimosegundo aspecto, para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto.

15 Un decimoquinto aspecto de la presente invención, se refiere a una nanopartícula lipídica que comprende al menos un lípido sólido a temperatura ambiente, al menos un tensioactivo no iónico y el péptido LL37. Las realizaciones particulares descritas en el primer aspecto de la presente invención son aplicables a las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 del decimoquinto aspecto, sustituyendo el factor de crecimiento o EGF por el péptido LL37.

20 Un decimosexto aspecto de la presente invención, se refiere a la nanopartícula lipídica del decimoquinto aspecto que comprende además un lípido líquido a temperatura ambiente. Las realizaciones particulares descritas en el segundo aspecto de la presente invención son aplicables a las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 de este aspecto, sustituyendo el factor de crecimiento o EGF por el péptido LL37.

25 Un decimoséptimo aspecto de la presente invención, se refiere a un procedimiento (procedimiento 3, dado a continuación en el presente documento) para la preparación de nanopartículas lipídicas de acuerdo con el decimoquinto aspecto de la presente invención, que se caracteriza por las mismas etapas que el procedimiento 1 descrito en el tercer aspecto de la presente invención, pero donde el péptido LL37 se añade a la solución lipófila (ii), en vez del factor de crecimiento. Las realizaciones particulares descritas para el procedimiento 1 descrito en el tercer aspecto de la presente invención son aplicables al procedimiento 3, sustituyendo el factor de crecimiento o EGF por el péptido LL37.

30 Un decimoctavo aspecto de la presente invención, se refiere a un procedimiento (procedimiento 4, dado a continuación en el presente documento) para la preparación de nanopartículas lipídicas de acuerdo con el decimosexto aspecto de la presente invención, que se caracteriza por las mismas etapas que el procedimiento 2 descrito en el cuarto aspecto de la presente invención, pero donde el péptido LL37 se añade a la solución lipófila (ii), en vez del factor de crecimiento.

35 Un decimonoveno aspecto de la presente invención, se refiere a las nanopartículas lipídicas que se pueden obtener por el procedimiento 3 y a las nanopartículas lipídicas que se pueden obtener por el procedimiento 4, descritos en los aspectos decimoséptimo y decimoctavo, respectivamente.

40 Con respecto al LL37, este péptido se puede sintetizar usando un sintetizador de péptidos automático y procedimientos estándar para la síntesis peptídica. Además, se puede obtener comercialmente, por ejemplo de Sigma-Aldrich. LL37 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES).

45 Una característica importante de las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 de la presente invención es que liberan el LL37 cargado de una manera de liberación prolongada. Las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 presentan un perfil de liberación caracterizado por una liberación inicial (liberación brusca) asociada al porcentaje de péptido asociado a la superficie, seguida de una fase de liberación rápida de desde 4 horas hasta 24 horas y finalmente, se describe una fase más lenta de desde 24 horas hasta 72 horas terminando con la liberación de la cantidad total de LL37 (tabla 4, ejemplo 2). Sorprendentemente los inventores demuestran que las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37, tienen una tasa de proliferación de fibroblastos *in vitro* inesperadamente mayor que LL37 libre (ejemplo 3, sección 3.3, figura 6). Así, un vigésimo aspecto de la presente invención se refiere a las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 de los aspectos decimoquinto, decimosexto y decimonoveno de la presente invención, para su uso como medicamento.

50 Un vigesimoprimer aspecto de la presente invención, se refiere a las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 de los aspectos decimoquinto, decimosexto y decimonoveno de la presente invención, para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto.

55 Un vigesimosegundo aspecto de la presente invención, se refiere a una composición farmacéutica que comprende las nanopartículas lipídicas cargadas con LL37 de los aspectos decimoquinto, decimosexto y decimonoveno de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida de este aspecto, la

composición farmacéutica se administra por vía tópica. Así, en una realización particular, la composición farmacéutica también comprende colágeno, ácido hialurónico, aloe vera, fibrina, polímeros de carbopol® y derivados de celulosa.

5 La presente invención también se refiere, en un vigesimotercer aspecto, a la composición farmacéutica del vigesimosegundo aspecto, para su uso como medicamento.

Un vigesimocuarto aspecto de la presente invención, se refiere a composición farmacéutica definida en el vigesimosegundo aspecto, para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas.

10 Finalmente, un vigesimoquinto aspecto de la presente invención, se refiere a un kit que comprende una cualquiera de las nanopartículas lipídicas descritas en el primer, segundo, quinto, decimoquinto, decimosexto y decimonoveno aspecto de la presente invención o mezclas de las mismas. Además, se refiere a un kit que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el sexto, decimosegundo y vigesimosegundo aspecto de la invención.

15 Los ejemplos dados a continuación sirven para ilustrar adicionalmente la invención, y para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se preparan y evalúan las nanopartículas lipídicas en el presente documento, y no pretenden limitar el alcance de la invención. En los ejemplos, a menos que se establezca expresamente de otro modo, las cantidades y porcentajes son en peso, la temperatura está en grados Celsius o está a temperatura ambiente, y la presión es presión atmosférica o próxima a la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de nanopartículas lipídicas

20 Se prepararon SLN y NLC mediante el procedimiento basado en emulsificación-ultrasonificación (Muller *et al* 2002; Che *et al.* 2010 (Effects of lipophilic emulsifiers on the oral administration of lovastatin from nanostructured lipid carriers: Physicochemical characterization and pharmacokinetics. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 74, 474-482).

25 En el caso de las SLN cargadas con rhEGF, se añadieron 10 ml de una solución acuosa de Tween 80 al 1 % (v/v) a 2 ml de una solución de diclorometano que contenía rhEGF comercial al 0,1 % (p/v) y Precirol® ATO 5 al 10 % (p/p). Inmediatamente después, se emulsionó la mezcla durante 30 segundos a 50 W (sonicador Branson® 250, CT, EE. UU.). Esta etapa produjo una emulsión de aceite/agua que a continuación se agitó durante 2 horas para extraer el disolvente orgánico y para obtener el endurecimiento de partículas. A continuación, se recogieron las SLN mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos usando una unidad de filtrado centrífuga con un tamaño de poro de 100 kDa (Amicon® Ultra, Millipore, España), y se lavaron tres veces con agua miliQ. Finalmente, se añadió trehalosa como crioprotector en una solución acuosa al 15 % con respecto a Precirol® ATO 5.

30 En cuanto a la preparación de los NLC cargados con rhEGF, se vertió una solución acuosa caliente de poloxámero al 0,67 % (p/v) y Tween 80 al 1,33 % (p/v), calentada a 40 °C durante 1 minuto a una mezcla a base de Precirol® ATO 5 fundido de 200 mg que contenía 2 mg de rhEGF comercial y 20 mg de Miglyol, también calentada a 40 °C durante 1 minuto. A continuación, se emulsionó la combinación resultante durante 15 segundos a 50 W (sonicador Branson® 250, CT, EE. UU.) y se almacenó durante 12 horas a 4 °C, recristalizando el lípido, para permitir la formación de NLC. Finalmente, las partículas se recogieron, lavaron y liofilizaron como se ha descrito previamente. La carga diana de rhEGF tanto en las SLN como en los NLC era del 1 % (p/p).

40 Se prepararon las SLN cargadas con LL37 y los NLC cargados con LL37 como se ha descrito para las SLN cargadas con rhEGF y los NLC cargados con rhEGF, respectivamente, pero usando péptido LL37 sintético (Sigma-Aldrich 94261) o recombinante, en vez de rhEGF.

Ejemplo 2.- Caracterización de nanopartículas lipídicas

45 2.1.- Se midieron el tamaño medio (promedio de z) y el índice de polidispersidad (PI) mediante espectroscopia de correlación fotónica. Se realizó cada ensayo por triplicado antes y después de la liofilización de las nanopartículas. Se determinó el potencial zeta (ζ) mediante velocimetría de Doppler (LDV). Se evaluaron todas las mediciones descritas anteriormente usando un equipo Malvern® Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Worcestershire, R. U.). Se determinó la apariencia superficial y morfología esférica mediante microscopía electrónica de barrido (MEB; Jeol® JSM-35 CF) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

50 2.2.- Se calculó la eficacia de encapsulación (EE) midiendo indirectamente el rhEGF libre y el LL37 libre (no encapsulado) eliminado por la técnica de filtración/centrifugación usada para recoger las SLN y NLC. Se diluyó cada muestra 1:10000 con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) que contenía Tween 20 al 0,05 % (v/v) y seroalbúmina bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) al 0,1 % (p/v). Se estimó la cantidad de rhEGF libre y LL37 libre usando un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima de tipo sándwich disponible comercialmente para EGF humano (human EGF ELISA development kit, Peprotech) y para LL37 humano (human

LL-37 ELISA development kit, Hycult biotech), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la eficacia de encapsulación (EE) aplicando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{\text{Cantidad total de rhEGF (LL37)} - \text{rhEGF libre (LL37)}}{\text{Cantidad total de rhEGF (LL37)}} \times 100$$

Se realizaron todas las pruebas por triplicado y se presentan los resultados como las medias \pm D.E. de estos ensayos.

5

Tabla 1.- Caracterización de SLN y NLC cargados con rhEGF:

Formulación	Antes de la liofilización		Después de la liofilización		Potencial zeta (mV) EE (%)	
	Tamaño (nm)	PDI	Tamaño (nm)	PDI		
SLN	226,1 \pm 0,8	0,28	310,9 \pm 15,8	0,30	-33,8 \pm 0,3	73,9 \pm 2,2
NLC	241,5 \pm 23,3	0,38	353,6 \pm 4,53	0,37	-34,6 \pm 0,2	95,7 \pm 4,7

Tabla 2.- Caracterización de SLN y NLC cargados con LL37:

Formulación	Antes de la liofilización		Después de la liofilización		Potencial zeta (mV) EE (%)	
	Tamaño (nm)	PDI	Tamaño (nm)	PDI		
SLN	251,53 \pm 7,79	0,35 \pm 0,02	340,27 \pm 2,42	0,25 \pm 0,01	-33,97 \pm 0,57	70,67 \pm 0,22
NLC	225,4 \pm 1,26	0,35 \pm 0,07	320,90 \pm 3,72	0,37 \pm 0,01	-33,47 \pm 1,78	97,52 \pm 0,75

Como se muestra en las tablas 1 y 2, los valores de PDI eran menores de 0,5 en todas las formulaciones antes y después de la criodesecación, confirmando la distribución de tamaño homogénea de las formulaciones en todos los casos. La reconstitución de las partículas secas para las mediciones de tamaño no presentó ningún problema, lo que sugirió la ausencia de fusión o agregación de partículas, a pesar del aumento de tamaño. Con respecto al potencial zeta, ambas formulaciones presentaron una carga superficial similar, de aproximadamente -34 mV. Además, los ensayos ELISA demostraron que la EE de NLC era ligeramente más alta que la EE de SLN.

10

En ambas formulaciones, la superficie de las partículas era lisa y sin poros. Por el contrario, tanto las imágenes de MEB como las imágenes de MET sugirieron que las SLN eran más regulares en tamaño que los NLC (datos no mostrados).

15

2.3.- Estudios de liberación *in vitro*

Se llevó a cabo el estudio de liberación incubando 32 mg y 23 mg de SLN o NLC (que correspondían a -200 μ g de rhEGF o LL37) en 2 ml de solución salina tamponada con fosfato 0,02 M (PBS) durante 3 días. En intervalos seleccionados, se eliminó el medio de liberación mediante filtración/centrifugación y se sustituyó por la misma cantidad de PBS. Se analizó la cantidad de rhEGF y LL37 mediante ELISA usando el protocolo descrito en la sección 2.2.

20

Tabla 3.- Porcentaje acumulado de rhEGF liberado a lo largo del tiempo

Tiempo	Liberación acumulada de rhEGF de SLN	Liberación acumulada de rhEGF de NLC
30 minutos	25,15 \pm 3,19	26,88 \pm 3,19
4 horas	38,50 \pm 10,09	44,79 \pm 5,02
8 horas	57,11 \pm 13,44	61,31 \pm 5,04
24 horas	71,20 \pm 17,36	75,87 \pm 5,88
48 horas	88,27 \pm 23,80	86,10 \pm 6,23
72 horas	102,24 \pm 24,59	98,95 \pm 8,02

Tabla 4.- Porcentaje acumulado de LL37 liberado a lo largo del tiempo

Tiempo	Liberación acumulada de LL37 de SLN	Liberación acumulada de LL37 de NLC
30 minutos	27,60 \pm 2,96	31,21 \pm 10,56
4 horas	45,19 \pm 6,82	52,14 \pm 4,57

8 horas	55,87 ± 4,31	65,18 ± 6,21
24 horas	62,51 ± 21,22	74,93 ± 10,20
48 horas	89,00 ± 12,41	93,81 ± 5,25
72 horas	100,76 ± 19,20	105,70 ± 10,25

Los perfiles de liberación *in vitro* de rhEGF y LL37 representados en la tabla 3 y tabla 4, respectivamente, muestran que ambas formulaciones presentaron un comportamiento de liberación similar. En primer lugar, se describe una liberación inicial (liberación brusca) asociada al porcentaje de proteína o péptido asociado a la superficie, seguida de una fase de liberación rápida de desde 4 horas hasta 24 horas y finalmente, una fase más lenta de desde 24 horas hasta 72 horas terminando con la liberación de la cantidad total de rhEGF y LL37

Ejemplo 3.- Proliferación celular, captación celular y penetración en la piel de las nanopartículas

3.1.- Efecto de las nanopartículas cargadas con rhEGF sobre la proliferación celular

Se usó una placa de 24 pocillos para el ensayo de proliferación. Se sembraron 35000 fibroblastos Balb/C 3T3 resuspendidos en 1 ml de medio de cultivo completo (DMEM suplementado con FCS al 10 %) en cada pocillo. Tras 8 horas de incubación, se sustituyó el medio por 1 ml de DMEM suplementado con FCS al 0,2 % y se incubaron las células durante toda la noche. A continuación, se sustituyó el medio por 1 ml de: (i) DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (ii) 15 ng/ml de rhEGF libre en DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (iii) SLN vacías en DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (iv) 15 ng/ml de SLN cargadas con rhEGF (rhEGF-SLN) en DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (v) NLC vacíos en DMEM suplementado con FCS al 0,2 % y (vi) 15 ng/ml de NLC cargados con rhEGF (rhEGF-NLC) en DMEM suplementado con FCS al 0,2 %.

Se cultivaron las células en las mismas condiciones durante 24 horas, 48 horas y 72 horas. Se llevaron a cabo los experimentos por triplicado. Tras los diferentes intervalos de incubación, se añadieron 100 µl de CCK-8 (Sigma-Aldrich, Saint Louise, EE. UU.) a cada pocillo (Zhou, Y., Qian, M., Liang, Y., Liu, Y., Yang, X., Jiang, T., Wang, Y., 2011. Effects of Leukemia Inhibitory Factor on Proliferation and Odontoblastic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. *J. Endod*; 37:819-824). Tras 4 horas de incubación, se leyó la absorbancia a 450 nm y 650 nm como longitud de onda de referencia. La absorbancia era directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

El ensayo de proliferación llevado a cabo en células Balb/C 3T3 demostró el efecto mitogénico de rhEGF. La figura 1 muestra una proliferación celular superior en los grupos tratados con rhEGF (rhEGF-NLC, rhEGF-SLN y rhEGF libre) que en los grupos control, tras 48 horas y 72 horas. Sorprendentemente, el rhEGF encapsulado en nanopartículas lipídicas (SLN o bien NLC) mostró un aumento superior en el efecto mitogénico de fibroblastos Balb/C 3T3 que el rhEGF libre.

3.2.- Efecto de las nanopartículas cargadas con LL37 sobre la proliferación celular

Se llevó a cabo el experimento como se ha descrito en la sección 3.1, pero con células HUVEC (células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano) Los grupos sometidos a prueba fueron los siguientes: (i) DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (ii) 0,5 y 0,1 µg/ml de LL37 libre en DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (iii) SLN vacías en DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (iv) 0,5 and 0,1 µg/ml de SLN cargadas con LL37 (LL37-SLN) en DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (v) NLC vacíos en DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (vi) 0,5 y 0,1 µg/ml de NLC cargados con LL37 (LL37-NLC) en DMEM suplementado con FCS al 0,2 % y (vii) DMSO al 10 % como control negativo.

El ensayo de proliferación llevado a cabo en células HUVEC demostró el efecto mitogénico de LL37. La figura 6 muestra una proliferación celular mayor en los grupos tratados con LL37 (LL37-NLC, LL37-SLN y LL37 libre) que en los grupos control para ambas dosis tras 48 horas.

3.3.- Captación celular de las formulaciones de SLN-rojo Nilo y NLC-rojo Nilo

Se cultivaron 50000 fibroblastos Balb/C 3T3 y 100000 queratinocitos HaCaT, de forma separada, en cubreobjetos en medio de cultivo completo durante 24 horas. A continuación, se sustituyó el medio por 1 ml de medio de ensayo. Se sometieron a prueba los siguientes grupos: (i) 25 µg de SLN-rojo Nilo en DMEM completo y (ii) 25 µg de NLC-rojo Nilo en DMEM completo. Tras 1 hora de incubación, las células se lavaron y fijaron. A continuación, se tiñeron los núcleos con DAPI (500 ng/ml) y se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos para su examen en un microscopio de fluorescencia.

Se presentan los resultados obtenidos del estudio de captación celular en la figura 2. El citoplasma celular se vuelve rojo (flechas blancas en la figura 2) debido a la internalización de las SLN y NLC. La figura muestra la capacidad de las SLN-rojo Nilo y NLC-rojo Nilo de entrar en la célula. No se observaron diferencias entre la capacidad de captación de SLN y NLC.

3.4.- Captación cutánea de las formulaciones de SLN y NLC

Se llevó a cabo el experimento como se describe por Küchler *et al.* 2009 (Nanoparticles for skin penetration enhancement - A comparison of dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.*; 71:243-250). Se usó la piel del mismo animal para los experimentos tratados y de control. Los grupos estudiados fueron (n=3) (i) SLN-rojo Nilo, (ii) NLC-rojo Nilo y (iii) crema de parafina cargada con rojo Nilo usada como referencia. Todas las preparaciones tenían rojo Nilo a la misma concentración del 0,004 %. Se mantuvo la piel durante 24 horas a 32 °C. A continuación, se lavó la piel con PBS, se secó y se cortó en secciones verticales (de fondo a superficie) de 20 µm de grosor usando un criomicrotomo (Frigocut 2800 N, Leica, Bensheim, Alemania). Se almacenaron los cortes a -20 °C y se analizaron tras 24 horas, sometiéndolos a continuación a luz normal y luz fluorescente.

Para todos los experimentos, los valores de brillo de píxel arbitrarios (ABU) obtenidos de la captación del colorante se relacionaron con los datos de captación de la crema de parafina cargada con rojo Nilo. Se calculó el parámetro resultante, denominado efecto de potenciación de penetración (PEE), para todas las capas de la piel. El valor de la crema de parafina era de 1 por definición (Lombardi Borgia, S., Regehly, M., Sivaramakrishnan, R., Mehnert, W., Korting, H.C., Danker, K., Roder, B., Kramer, K.D., Schafer-Korting, M., 2005. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement-correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parelectric spectroscopy. *J. Control. Release* 110, 151-163).

Se presentan los valores del efecto de potenciación de penetración (PEE), estimados de los valores de brillo de píxel arbitrarios (ABU) de las secciones de piel en la figura 5. Los valores de PEE mostraron que la penetración del colorante de SLN-rojo Nilo y NLC-rojo Nilo superan los encontrados con la crema de parafina en todos los portaobjetos con piel. Los valores de PEE para SLN-rojo Nilo y NLC-rojo Nilo aumentaron cuatro veces en el estrato córneo (4,74 y 4,62 respectivamente) y aproximadamente dos veces en la epidermis (2,09 y 2,03 respectivamente). También se observó una penetración potenciada en menor medida, aunque a menudo todavía significativa en la dermis (1,29 y 1,32 respectivamente). En resumen, los valores de ABU y PEE superiores a 1 demuestran una capacidad de penetración en la piel mejorada de SLN y NLC en comparación con la crema de parafina. Además, los datos también reflejan la capacidad de estas nanopartículas de suministrar rojo Nilo a la piel y por lo tanto rhEGF y LL37.

Ejemplo 4.- Proliferación *in vitro* de rhEGF / LL37 / combinación de rhEGF y LL37

Se llevó a cabo el experimento como se ha descrito en la sección 3.1. Se sometió a prueba el efecto sinérgico de LL37 y rhEGF en fibroblastos Balb/C y queratinocitos HaCat. Se usó una placa de 24 pocillos para el ensayo de proliferación. Se sembraron 35000 fibroblastos Balb/C 3T3 resuspendidos en 1 ml de medio de cultivo completo (DMEM suplementado con FCS al 10 %) en cada pocillo. Tras 8 horas de incubación, se sustituyó el medio por 1 ml de DMEM suplementado con FCS al 0,2 % y se incubaron las células durante toda la noche. A continuación, se sustituyó el medio por 1 ml de: (i) DMEM suplementado con FCS al 0,2 %, (ii) 15 ng/ml de rhEGF libre, (iii) 5, 0,5 y 0,25 µg/ml de LL37, (iv) 15 ng/ml de rhEGF y 5, 0,5 y 0,25 µg/ml de LL37. Se cultivaron las células a 37 °C y una atmosfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas, 48 horas y 72 horas.

El ensayo de proliferación llevado a cabo en HaCaT (queratinocitos humanos) y fibroblastos Balb/C demostró que tras 48 horas, 10 y 50 ng/ml de LL37 y 15 ng/ml de rhEGF potenciaron en mayor medida la mitosis que rhEGF libre solo (figura 7).

Ejemplo 5.- Cicatrización de heridas *in vivo* con SLN cargadas con rhEGF y NLC cargados con rhEGF

Se sometió a prueba la eficacia de cicatrización de heridas *in vivo* de SLN cargadas con rhEGF y NLC cargados con rhEGF con respecto a dos formulaciones de rhEGF diferentes: (i) 75 µg de rhEGF liofilizado (similar al Heberprot[®] comercializado) y (ii) 75 µg de rhEGF encapsulado en microesferas poliméricas cargadas al 1 % (p/p) (75 µg de rhEGF-MS) preparadas en nuestro laboratorio mediante la combinación de alginato y poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) usando el procedimiento de emulsión doble como se describe en la solicitud de patente europea EP12382476. Resumiendo brevemente, se emulsionaron 2 ml de solución de diclorometano:acetona (3:1) que contenía el 5 % (p/v) de PLGA (Resomer RG503) mediante sonicación durante 15 segundos a 50 W con 0,2 ml de una fase acuosa interna (en agua miliQ) que contenía el 0,05 % (p/v) de rhEGF, 2,5 % mg (p/v) de seroalbúmina humana (HSA), 0,25 % (p/v) de polietilenglicol 400 (PEG400) y alginato sódico MVG al 2,5 % (p/v) (Pronova UP, NovaMatrix FMC BioPolymer, Sandvika, Noruega). Se vertió la emulsión resultante (agua₁/aceite) en 15 ml de solución acuosa que contenía poli(alcohol vinílico) (PVA) al 5 % y NaCl al 5 % y se emulsionó usando un agitador de paletas durante 60 segundos para obtener la emulsión doble (agua₁/aceite/agua₂). Finalmente, se añadieron 400 ml una solución acuosa de NaCl al 5 % y 0,6 mM de cloruro cálcico y se mezcló durante 30 minutos. A continuación, se recogieron las microesferas mediante filtración y se liofilizaron.

5.1.- Animales

Se usaron ochenta ratones *db/db* macho de 8 semanas. Se obtuvieron ratones *db/db* genéticamente diabéticos (BKS.Cg-m +/- Lepr^{db}/J) de Javier Laboratories (Saint Berthevin Cedex). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de la Universidad del País Vasco.

5.2.- Procedimiento experimental

Se realizaron los experimentos adaptando el procedimiento usado por Michaels *et al.* (2007) (db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model. *Wound Repair and Regeneration* 15, 665-670). Se dividieron los animales en los siguientes 10 grupos (n=8): (i) control no tratado, (ii) 75 µg de rhEGF libre, (iii) MS vacías, (iv) SLN vacías, (v) NLC vacíos, (vi) 75 µg de rhEGF-MS, (vii) 10 µg de rhEGF-SLN, (viii) 20 µg de rhEGF-SLN (ix) 10 µg de rhEGF-NLC y (x) 20 µg de rhEGF-NLC.

Se administraron las nanopartículas resuspendidas previamente en 20 µl de vehículo (carboximetilcelulosa al 0,5 % en solución salina al 0,9 %) por vía tópica dos veces por semana con una micropipeta y se dejó que se propagase por todo el lecho de la herida. Se administró rhEGF libre resuspendido en 0,5 ml de vehículo, dos veces por semana por vía intralesional, introduciendo profundamente la aguja dentro de la herida. Se administraron por vía intralesional 75 µg de rhEGF-MS igualmente resuspendido en 0,5 ml de vehículo, una única vez el día que se indujeron las heridas.

5.3.- Evaluación de la cicatrización de heridas

Se evaluó la eficacia de los tratamientos para la mejora de la cicatrización de heridas midiendo el área de herida (cm²) el día de la cirugía y los días 4, 8, 11 y 15 tras la inducción de las heridas (figura 3B), usando una cámara digital (Lumix FS16, Panasonic®, España) y un programa de análisis de imagen (ImageJ®, Biophotonics Facility, University of McMaster, Canadá). Se expresó el cierre de heridas como el área en porcentaje del tamaño de herida inicial.

Todos los grupos experimentales (20 y 10 µg de rhEGF-SLN, 20 y 10 µg de rhEGF-NLC, y 75 µg de rhEGF-MS) presentaron una reducción del área de herida superior desde el día 4 (figura 3A) en comparación con sus grupos control (para los grupos rhEGF-SLN sus controles son rhEGF libre, SLN vacías y control no tratado; para los grupos de rhEGF-NLC sus controles son rhEGF libre, NLC vacíos y control no tratado; y para 75 µg de rhEGF-MS sus controles son rhEGF libre, MS vacías y control no tratado). No se encontraron diferencias estadísticas entre ambas formulaciones lipídicas (rhEGF-SLN y rhEGF-NLC); por el contrario, la contracción de heridas fue significativamente mayor que en los grupos de 75 µg de rhEGF-MS y rhEGF libre (p<0,001). En cuanto a los grupos control, 75 µg de rhEGF-MS también mostró un cierre de heridas estadísticamente significativo. A día 8, la contracción de heridas alcanzó las mayores diferencias entre todos los grupos experimentales y sus controles. De nuevo, no se encontraron diferencias entre las formulaciones de rhEGF-SLN, rhEGF-NLC y 75 µg de rhEGF-MS. De forma interesante, a los 11 días tras la inducción de heridas, los animales tratados con 20 µg de rhEGF-SLN mostraron una significativa mayor reducción de la herida en comparación con los otros grupos experimentales (p<0,05 para 10 µg de rhEGF-SLN, 20 y 10 µg de rhEGF-NLC, y p<0,001 para 75 µg de rhEGF-MS) y sus grupos control. Sin embargo, los otros grupos experimentales también presentaron contracción de heridas, aunque más leve. Al final del ensayo, a día 15, las heridas de los grupos tratados con todas las formulaciones de nanopartículas lipídicas casi se habían cerrado. Sorprendentemente, 75 µg de rhEGF-MS presentaron una contracción de heridas retardada (73,16 ± 3,24 %) en comparación con las nanopartículas lipídicas (-95 %). También se puede destacar que administraciones de rhEGF libre múltiples mostraron menos diferencias entre todos los grupos control que las presentadas por los grupos con rhEGF nanoformulado.

Tabla 5.- Cicatrización de heridas

Grupos experimentales	4º día (%)	7º día (%)	11º día (%)	14º día (%)
Control no tratado	5,04 ± 5,71	9,86 ± 7,94	46,76 ± 3,77	61,12 ± 2,85
MS vacías	7,35 ± 4,36	9,63 ± 5,85	36,94 ± 6,46	59,55 ± 4,82
SLN vacías	2,66 ± 5,25	19,50 ± 8,07	42,18 ± 8,82	59,53 ± 5,37
NLC vacíos	3,57 ± 7,95	13,51 ± 11,43	35,14 ± 11,54	48,38 ± 7,57
rhEGF libre	8,42 ± 3,96	19,94 ± 5,21	44,80 ± 2,64	61,83 ± 2,99
75 µg de rhEGF-MS	22,10 ± 7,73	43,12 ± 3,97	62,31 ± 4,88	73,16 ± 3,24
10 µg de rhEGF-SLN	17,03 ± 7,61	42,70 ± 14,40	71,05 ± 18,53	92,33 ± 9,05
20 µg de rhEGF-SLN	21,08 ± 16,29	45,02 ± 13,84	88,40 ± 3,53	97,75 ± 1,67
10 µg de rhEGF-NLC	17,88 ± 10,55	44,28 ± 9,16	68,80 ± 8,15	93,64 ± 3,95
20 µg de rhEGF-NLC	24,64 ± 10,17	43,81 ± 6,20	70,10 ± 8,47	90,11 ± 6,17

5.4.- Estimación histológica de cicatrización de heridas

En los días 8 y 15 se sacrificaron los animales mediante inhalación de CO₂. Se extirparon las heridas y el tejido circundante (~ 1 cm) y se fijaron en paraformaldehído al 3,7 % durante 24 horas. A continuación, se bisecaron los

tejidos fijados, se incluyeron en parafina y se cortaron en capas de 5 µm de grosor. Se procesaron las muestras mediante tinción con H-E para observaciones morfológicas.

Con respecto a las fases de resolución de la recuperación inflamatoria (figura 4A) y la maduración de heridas, se usó la escala descrita por Cotran *et al.* (2000) (Cotran, R., Kumar, V., Collins, T., 2000. Reparación de los tejidos: regeneración celular y fibrosis. Patología estructural y funcional: Mc Graw Hill Interamericana, 2000, págs. 95-120). Se determinó la puntuación de cada herida de manera semicuantitativa dentro de un intervalo de 0 a 4. 0: Ausencia de respuesta inflamatoria. 1: inflamación aguda (formación del coágulo de fibrina y membrana piogénica, migración de leucocitos y neutrófilos polinucleados), 2: predominancia de inflamación aguda difusa (predominancia de tejido de granulación y membrana piogénica, neogénesis vascular), 3: predominancia de inflamación crónica (proliferación de fibroblastos), 4: resolución y cicatrización (reducción o desaparición de la inflamación crónica aunque pueden persistir ocasionalmente células redondas).

Se midió el proceso de reepitelización (figura 4B, D) de acuerdo con los criterios establecidos por Sinha *et al.* (Sinha, U.K., Gallagher, L.A., 2003. Effects of steel scalpel, ultrasonic scalpel, CO2 laser, and monopolar and bipolar electrosurgery on wound healing in guinea pig oral mucosa. Laryngoscope 113, 228-236). 0: reepitelización en el borde de la herida, 1: reepitelización que cubre menos de la mitad de la herida, 2: reepitelización que cubre más de la mitad de la herida, 3: reepitelización que cubre toda la herida con un grosor irregular y 4: reepitelización que cubre toda la herida con un grosor normal.

5.5.- Análisis estadístico

Se expresaron todos los datos como medias \pm desviación estándar. Basándose en los resultados de la prueba de Levene de homogeneidad de varianzas, se compararon las medias a través de la prueba de t de Student o ANOVA de un factor para comparaciones múltiples. Posteriormente, se aplicó la prueba de Bonferroni o Tamhane *a posteriori*. Se consideraron las diferencias significativas a $p < 0,05$. Se realizaron los cálculos usando el programa SPSS 20.0 (SPSS®, Inc., Chicago, IL).

El día 8, solo 20 µg de rhEGF-SLN presentaron un estado inflamatorio crónico próximo a la resolución completa, donde prevalecía la proliferación de fibroblastos (puntuación de $3,67 \pm 1,15$) (tabla 6). Los animales tratados con 20 µg de rhEGF-NLC, casi con predominancia de estado inflamatorio agudo cercano al estado crónico, mostró una puntuación de inflamación menor ($2,75 \pm 0,46$). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, ambas formulaciones presentaron una restauración significativamente mayor que sus grupos control. Por lo contrario, 10 µg de rhEGF-SLN y 10 µg de rhEGF-NLC no dejaron el estado inflamatorio agudo ($< 2,00$); no obstante, se encontraron diferencias ($p < 0,001$) entre estos grupos y el grupo control no tratado, que mostró ausencia de respuesta inflamatoria. También mostraron diferencias 10 µg de rhEGF-NLC ($p < 0,05$) con su control (NLC vacíos).

Con respecto a la evaluación de la respuesta a la dosis (20 o 10 µg) entre las nanopartículas lipídicas, solo 20 µg de rhEGF-SLN presentaron una resolución mejorada (más alta que 10 µg de rhEGF-SLN).

El análisis histopatológico también indicó que en las heridas tratadas con rhEGF prevalecía un estado inflamatorio agudo difuso, con una puntuación de inflamación de $2,13 \pm 0,64$ (significativamente mayor que sus grupos control). Estas diferencias no alcanzaron significancia estadística con ninguna de las nanoesferas lipídicas (ni rhEGF-SLN ni rhEGF-NLC).

Como se ha mencionado anteriormente, 15 días tras la inducción de heridas las diferencias tienden a ser menores, sin alcanzar la significancia estadística entre ningún grupo y sus controles.

Con respecto al grado de reepitelización, los datos obtenidos a día 8 mostraron que solo los grupos tratados con nanopartículas lipídicas con la dosis más alta (20 µg) y los animales tratados con 75 µg de rhEGF-MS, presentaban nuevo epitelio que cubría más de la mitad de la herida ($> 2,00$, en relación con los criterios de Sinha U.K. (2003)). Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos y sus grupos control (rhEGF libre, SLN vacías y control no tratado para 20 µg de rhEGF-SLN y rhEGF libre, NLC vacíos y control no tratado para 20 µg de rhEGF-NLC) (figura 5). Por el contrario, en los grupos tratados con nanopartículas lipídicas con la dosis menor de rhEGF (10 µg de rhEGF-SLN y 10 µg de rhEGF-NLC) el nuevo epitelio no cubrió más de la mitad de la herida. Además, aunque se encontraron diferencias significativas con el grupo no tratado ($p < 0,01$), la significancia estadística tendía a perderse con las SLN vacías en el caso de 10 µg de rhEGF-SLN y con los NLC vacíos en el caso de 10 µg de rhEGF-NLC, a pesar de que las puntuaciones de reepitelización fueron más altas para el grupo de nanopartículas lipídicas cargadas con 10 µg de rhEGF (figura 4B). Con respecto a 75 µg de rhEGF-MS, a día 8 el área reepitelizada cubría más de la mitad de la herida y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre 75 µg de rhEGF-MS y sus grupos control (control no tratado y MS vacías).

Así, el estudio del proceso de reepitelización (tabla 7) reveló que los animales tratados con 4 dosis de 75 µg de rhEGF libre mostraban una puntuación de reepitelización más alta que los grupos no tratados ($1,25 \pm 0,89$ y $0,00 \pm 0,00$ respectivamente). Sorprendentemente, el efecto de múltiples dosis intralesionales de rhEGF libre mostró menos mejora en la reepitelización que el obtenido a partir de 4 administraciones por vía tópica de rhEGF-SLN y rhEGF-NLC y 1 dosis intralesional de 75 µg de rhEGF-MS.

15 días tras la inducción de las heridas, el estudio de reepitelización no reveló diferencias entre los grupos.

Tabla 6.- Puntuación de la inflamación

	Puntuación de la inflamación	
	Día 8	Día 15
Control no tratado	0,13 ± 0,51	1,83 ± 0,98
MS vacías	0,25 ± 0,46	2,83 ± 1,33
SLN vacías	1,25 ± 0,46	2,88 ± 0,83
NLC vacíos	1,00 ± 1,10	2,50 ± 1,38
rhEGF libre	1,75 ± 0,71	2,75 ± 0,95
75 µg de rhEGF-MS	2,13 ± 0,64	2,86 ± 0,90
10 µg de rhEGF-SLN	1,63 ± 1,51	3,50 ± 0,93
20 µg de rhEGF-SLN	3,67 ± 1,15	3,38 ± 0,52
10 µg de rhEGF-NLC	1,88 ± 1,21	3,13 ± 0,35
20 µg de rhEGF-NLC	2,75 ± 0,46*	3,00 ± 0,00

Tabla 7.- Puntuación de la reepitelización

	Puntuación de la reepitelización	
	Día 8	Día 15
Control no tratado	0,00 ± 0,00	2,50 ± 1,76
MS vacías	0,38 ± 0,52	3,00 ± 1,10
SLN vacías	1,00 ± 0,00	3,38 ± 0,92
NLC vacíos	1,00 ± 0,89	3,00 ± 0,89
rhEGF libre	1,25 ± 0,89	2,71 ± 0,49
75 µg de rhEGF-MS	2,13 ± 0,64	3,17 ± 0,98
10 µg de rhEGF-SLN	1,71 ± 0,76	3,00 ± 0,93
20 µg de rhEGF-SLN	2,33 ± 0,58	3,25 ± 0,71
10 µg de rhEGF-NLC	1,50 ± 1,05	3,38 ± 0,52
20 µg de rhEGF-NLC	2,75 ± 0,74	32,86 ± 0,69

Ejemplo 6.- Cicatrización de heridas *in vivo* en cerdos con NLC cargados con rhEGF

5 6.1.- Animales

10 Todos los protocolos y procedimientos usados se aprobaron previamente por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales del Centro de Cirugía Mínimamente Invasiva Jesús Usón (CCMIJU). Se emplearon 6 cerdos hembra Large White, con un peso medio de 26,82 ± 2,90 kg al comienzo del estudio, distribuidos en jaulas individuales de 2,90 x 1,35 m. Todos los animales del estudio se distribuyeron aleatoriamente en salas aclimatadas, donde se establecieron las siguientes condiciones de alojamiento: ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, temperatura de entre 20 y 25 °C, ocho cambios de aire por hora con ventilación con filtro HEPA y humedad relativa de entre el 50 y el 70 %. Como enriquecimiento ambiental de jaulas se instalaron cadenas colgantes y juguetes de goma como elementos masticables. Tras un periodo de aclimatación, se identificaron los animales mediante códigos de crotal para su inclusión en el estudio.

15 6.2.- Modelo de herida y procedimiento quirúrgico

20 Tras 12 horas de ayuno sólido y 6 horas de ayuno líquido, se sedaron los animales mediante la administración intramuscular de 15 mg/kg de ketamina y 0,2 mg/kg de diazepam. A continuación, se les indujo la anestesia mediante la administración de propofol (3 mg/kg), para permitir la intubación endotraqueal. Inmediatamente después, se conectaron los animales a una máquina anestésica a través de un circuito circular unido a un ventilador que suministra sevoflurano como agente anestésico a una concentración del 2,7 % en un flujo de oxígeno de 1 l/minuto. Como analgesia, se usó remifentanilo mediante infusión intravenosa a una velocidad de infusión continua de 0,1 µg/kg/min durante la cirugía.

5 A cada animal se le provocaron 6 heridas (6 cm x 5 cm) dejando un mínimo de 1,5-2,0 cm entre cada úlcera, tras tatuar los bordes de las úlceras usando un marco para tener una referencia permanente del área inicial de las heridas. Se provocaron las úlceras usando diatermia monopolar en modo de coagulación para obtener bordes de heridas isquémicos, de 2 mm de profundidad, dejando el panículo adiposo. Se administró analgesia posoperatoria mediante parches transdérmicos que contenían buprenorfina y tratamiento antibiótico sistémico con amoxicilina/ácido clavulánico (20 mg/kg) durante una semana.

6.3.- Grupos experimentales

10 La administración del tratamiento comenzó 24 horas tras la inducción de heridas (día 1 del estudio) para permitir la hemostasia primaria, adhesión y agregación plaquetaria y activación de la cascada de coagulación. Se dividieron los animales aleatoriamente en 3 grupos (n=2): (i) NLC vacíos, (ii) 20 µg de rhEGF-NLC y (iii) 75 µg de rhEGF libre. Se administraron por vía tópica las nanopartículas resuspendidas previamente en 150 µl de vehículo (carboximetilcelulosa al 0,5 % en solución salina al 0,9 %) dos veces por semana propagándolas por todo el lecho de la herida. Se administró rhEGF libre por vía intralesional, resuspendido en 1 ml de vehículo, dos veces por semana.

15 A lo largo de todo el estudio, se cubrieron las heridas para evitar la deshidratación y la contaminación microbiana. Asimismo, el apósito previno la formación de costra y facilitó la observación de los bordes epitelizados para mediciones de área de las heridas cicatrizadas. Para ello, se cubrió cada herida con una gasa de parafina para evitar la adhesión del vendaje, encima se colocaron tres gasas de algodón estériles, fijadas con un vendaje adhesivo y esparadrapo. Se cambiaron los apósitos dos veces por semana para evaluar de forma continua el estado y la evolución de la herida y su evolución, manteniendo de esta forma un nivel aséptico alto. Se llevó a cabo el procedimiento de limpieza con el máximo cuidado posible, usando gasas estériles y solución salina para eliminar exudados y suciedad, respetando la integridad del tejido de granulación recién formado.

6.4.- Muestras de sangre

25 Para monitorizar el estado de salud general de los animales, se recogieron muestras de sangre para evaluar los niveles hematológicos y bioquímicos el día de la inducción de heridas, el día 15 y al final del estudio (día 43). Los parámetros estudiados fueron: hematocrito, hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), glóbulos blancos, proteínas y plaquetas totales.

30 Además, se recogieron muestras de plasma de los animales tratados con rhEGF-NLC y rhEGF libre para evaluar la absorción sistémica de rhEGF. Se realizó la detección de rhEGF mediante ELISA (human EGF ELISA development kit, PeproTech). Se extrajeron las muestras cuando se esperaba que los niveles de rhEGF en plasma fuesen más altos. Así, se recogieron las muestras de los animales tratados con rhEGF-NLC el día 1 del experimento (antes de la administración del tratamiento), 4 horas y 12 horas tras la administración. Se obtuvieron las muestras de plasma de los animales tratados con rhEGF libre inmediatamente después de la administración y 30 minutos después de la primera dosis.

35 6.5.- Análisis de heridas en serie de heridas cicatrizadas

40 Se determinó la cinética de cicatrización de heridas midiendo el cierre de heridas (porcentaje de área de herida inicial cerrado) los días 1, 15, 25, 36 y 43. Se determinó el área de herida, de manera estandarizada, tomando fotos perpendicularmente a la superficie de la herida, usando la misma iluminación y colocando una regla de plástico estéril junto a las heridas para introducir una referencia métrica en las imágenes para su procesamiento adicional. Se calculó el área de herida usando el software para imágenes ImageJ (véase la sección 5.3). Se consideró que las heridas estaban cicatrizadas cuando el cierre era superior al 95 %.

6.6.- Evaluación histológica de la cicatrización de heridas

45 Se recogieron biopsias de todo el espesor de la piel del centro de la herida no cicatrizada con respecto al margen sano (2 mm) usando un bisturí estéril. Se fijaron inmediatamente las muestras recogidas en formalina al 4 %, se incluyeron en parafina y se cortaron en capas de 5 µm de grosor. Se tiñeron las muestras con hematoxilina-eosina (H-E) para observaciones morfológicas. Se recogieron biopsias el día 15 para las heridas 1, 2 y 3, y los días 25 y 43 para todas las heridas. El día 36, se tomaron imágenes de las heridas pero no se recogieron biopsias para no retrasar la cicatrización de heridas.

50 Se determinó la cicatrización de heridas en términos del grado de reepitelización, midiendo el epitelio recién formado, y la maduración de heridas y la calidad de cicatrización de acuerdo con los criterios de Cotran *et al.* (2000).

6.7.- Análisis hematológico

El análisis hematológico no reveló ningún cambio en ninguno de los parámetros estudiados a lo largo del estudio. Además, todos los valores obtenidos estaban dentro de los intervalos normales para cerdos sanos (datos no mostrados).

Se recogieron muestras de plasma de los animales tratados con rhEGF-NLC y rhEGF libre para evaluar la absorción de rhEGF a la circulación sistémica cuando la rhEGF se esperaba que fuese más alta en el plasma, porque el uso sistémico de rhEGF se ha limitado por la preocupación de crecimiento epitelial anormal. Se eligieron los momentos para la recogida de plasma en base a la semivida del EGF, la vía de administración y la liberación retardada del factor de crecimiento cargado en los rhEGF-NLC. A este respecto, dado que el rhEGF incorporado en los rhEGF-NLC se esperaba que se absorbiese más tarde que el rhEGF libre debido a la encapsulación, la toma de muestras de plasma se realizó el día 1 del experimento, 4 horas y 24 horas tras la administración de rhEGF-NLC, en vez de a los 30 minutos tras la administración, como se realizó en los animales tratados con rhEGF libre. Debido a las similitudes evidentes entre humanos y cerdos, se esperaron concentraciones plasmáticas de rhEGF similares. Como se ilustra en la tabla 8, la concentración plasmática de rhEGF mostró valores de aproximadamente 0, claramente por debajo de la concentración de EGF humano basal (0,4 ng/ml). Este hecho es muy sorprendente porque la existencia prácticamente nula de absorción sistémica, incluso cuando el rhEGF libre se inyecta directamente en la herida, puede minimizar los efectos secundarios, y por tanto, mejorar la seguridad del tratamiento y garantizar el efecto local del rhEGF en la lesión.

Tabla 8.- Concentraciones plasmáticas de rhEGF. Se muestran los resultados como las medias \pm D.E.

	Concentraciones plasmáticas de rhEGF (ng/ml)		
	30 minutos	4 horas	24 horas
rhEGF-NLC	-	0,03 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
rhEGF libre	0,20 \pm 0,01	-	-

6.8.- Análisis de heridas en serie de heridas cicatrizadas

Se evaluó la cicatrización potenciada calculando el número de heridas cicatrizadas en cada grupo experimental los días 15, 25, 36 y 43. Se encontraron las mayores diferencias entre los grupos el día 25 del experimento. Como se observa en la figura 8, a día 15 ninguna de las heridas se había cerrado por completo. A día 25, el porcentaje de heridas cicatrizadas era significativamente más alto para el grupo tratado con rhEGF-NLC que para el grupo tratado con NLC vacíos. Además, se ha de destacar que el tratamiento con rhEGF-NLC mostró una efectividad ligeramente superior en comparación con rhEGF libre (50 % y 40 % respectivamente). Aunque el porcentaje de heridas cicatrizadas era similar en ambos grupos, estos datos son particularmente significativos debido a que las heridas tratadas con rhEGF-NLC recibieron dos administraciones por vía tópica semanales de 20 μ g de rhEGF, mientras que las heridas tratadas con rhEGF libre recibieron dosis más altas (75 μ g dos veces por semana) administradas intralesionalmente. A día 36, casi todas las heridas habían cicatrizado completamente; las heridas tratadas con rhEGF (tanto con rhEGF-NLC como rhEGF libre) estaban completamente cerradas y las heridas tratadas con NLC vacíos alcanzaron una cicatrización del 90 %. Al final del estudio (día 43) todas las heridas estaban completamente cicatrizadas.

6.9.- Evaluación histológica de la cicatrización de heridas

6.9.1.- Grado de reepitelización

Como se muestra en la figura 9A, a día 15 la longitud del epitelio nuevo era significativamente mayor en los animales tratados con 20 μ g de rhEGF-NLC administrados por vía tópica que en las heridas tratadas con NLC vacíos y en las que recibieron 75 μ g de rhEGF libre administrado intralesionalmente ($p < 0,001$). La eficacia de reepitelización mejorada de rhEGF-NLC en comparación con el rhEGF libre, sugiere que la nanoencapsulación protege al factor de crecimiento frente al microambiente de la herida y reduce la inactivación empleada por las proteasas y el estrés oxidativo del área de herida. Esta protección puede ser responsable de la efectividad potenciada de rhEGF-NLC observada en los estudios *in vivo*. Sin embargo, las diferencias entre los grupos no alcanzaron la significación estadística los días 25 y 43 (figura 9A), a pesar de que los valores medios obtenidos a día 25 para los animales tratados con rhEGF (libre o encapsulado) eran más altos que para el grupo de NLC vacíos.

6.9.2.- Maduración de heridas y calidad de la cicatrización

Debido a las dimensiones de las lesiones provocadas, se pueden observar en la misma muestra histológica diferentes estadios de cicatrización de acuerdo con los criterios de Cotran *et al.* (2000). Como se observa en la figura 10A, a día 15 los animales tratados con rhEGF-NLC mostraron no solo una extensión menor estadísticamente significativa de tejido inflamatorio (grado 2) en comparación con las heridas que habían recibido NLC vacíos y rhEGF libre, sino que también una extensión significativamente más alta de epidermis cicatrizada casi completamente (grado 4) ($p < 0,001$). Por el contrario, las heridas tratadas con NLC vacíos y rhEGF libre mostraron principalmente una inflamación aguda difusa con presencia de algunos neutrófilos polimorfonucleares, formación de tejido de granulación y neogénesis vascular (grado 2).

A día 25, debido a que el proceso de cicatrización continuó en todos los grupos estudiados, la extensión de grado 2 era significativamente menor que la que se observó el día 15 y la extensión de grado 3 y grado 4 significativamente más alta ($p < 0,001$). Además, se ha de destacar que a pesar de que el día 25 no se pudieron encontrar diferencias

5 en la longitud de reepitelización entre los grupos, las diferencias todavía se apreciaban en la maduración de heridas y la calidad de cicatrización (figura 9A y figura 10B). Los animales tratados con rhEGF-NLC mostraron un grado de cicatrización más cercano a la cicatrización completa que los grupos que recibieron NLC vacíos y rhEGF libre, que todavía mostraban una inflamación crónica y un tejido de granulación rico en vasos nuevos y proliferación de fibroblastos.

Además, como se muestra en la figura 9B y figura 10C, a día 43 todas las heridas de todos los grupos experimentales mostraron algo de inflamación crónica (grado 3 y 4). Sin embargo, las lesiones tratadas con rhEGF-NLC presentaron un grado de cicatrización significativamente mejorado y maduración de heridas ($p < 0,001$).

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Praxis Biopharma Research Institute

<120> Nanopartículas lipídicas para la cicatrización de heridas

<130> PCT20140479

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> péptido LL37

<400> 1

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
 20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser
 35

REIVINDICACIONES

1. Nanopartícula lipídica **caracterizada porque** comprende al menos un lípido sólido a temperatura ambiente, al menos un tensioactivo no iónico y factor de crecimiento epidérmico (EGF), en la que la nanopartícula lipídica tiene una eficacia de encapsulación superior a un 70 %.
- 5 2. Nanopartícula lipídica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el factor de crecimiento epidérmico es factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF).
3. Nanopartícula lipídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un lípido líquido a temperatura ambiente.
- 10 4. Nanopartícula lipídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el EGF se libera de una manera de liberación prolongada durante hasta 72 h.
5. Composición **caracterizada porque** comprende una nanopartícula lipídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una nanopartícula lipídica que comprende nanopartículas lipídicas que comprenden al menos un lípido sólido a temperatura ambiente, al menos un tensioactivo no iónico y el péptido antimicrobiano de catelicidina LL37.
- 15 6. Composición **caracterizada porque** comprende una formulación de nanopartículas lipídicas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y una formulación de nanopartículas lipídicas que comprende nanopartículas lipídicas que comprenden al menos un lípido sólido a temperatura ambiente, al menos un lípido líquido a temperatura ambiente, al menos un tensioactivo no iónico y el péptido antimicrobiano de catelicidina LL37.
- 20 7. Nanopartícula lipídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, para su uso como medicamento.
8. Nanopartícula lipídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto.
- 25 9. Nanopartícula lipídica o composición de acuerdo con la reivindicación anterior, en la que las heridas se seleccionan del grupo que consiste en úlceras de pie diabético, úlceras de presión, úlceras vasculares, heridas isquémicas y combinaciones de las mismas.
10. Composición farmacéutica que comprende una nanopartícula lipídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 11. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación anterior, para su uso como medicamento.
12. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en la promoción de la cicatrización de heridas en un sujeto.
- 35 13. Kit que comprende una nanopartícula lipídica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y/o una composición de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, para promover la cicatrización de heridas.
14. Procedimiento de preparación de la nanopartícula lipídica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
 - (i) preparar una solución acuosa que comprende un tensioactivo no iónico,
 - 40 (ii) preparar una solución lipófila que comprende un lípido sólido a temperatura ambiente en un disolvente orgánico,
 - (iii) añadir la solución acuosa (i) a la solución lipófila (ii), someter la mezcla resultante a sonicación hasta obtener una emulsión,
 - (iv) evaporar el disolvente orgánico de la emulsión obtenida en (ii), y
 - (v) recoger las nanopartículas,
 - 45 en el que se añade EGF a la solución (ii).
15. Procedimiento para la preparación de la nanopartícula lipídica de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende las siguientes etapas:
 - (i) preparar una solución acuosa que comprende un tensioactivo no iónico,
 - 50 (ii) preparar una solución lipófila que comprende una combinación de lípidos sólidos y lípidos líquidos fundidos a una temperatura más alta que el punto de fusión del lípido líquido,
 - (iii) calentar la solución acuosa (i) hasta la misma temperatura que la solución lipófila (ii),

- 5
- (iv) añadir la solución acuosa (i) a la solución lipófila (ii), someter la mezcla resultante a sonicación hasta obtener una emulsión,
 - (v) enfriar la emulsión (iv) a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para permitir la recristalización de lípidos y la formación de nanopartículas, y
 - (vi) recoger las nanopartículas,
- en el que se añade EGF a la solución (ii).

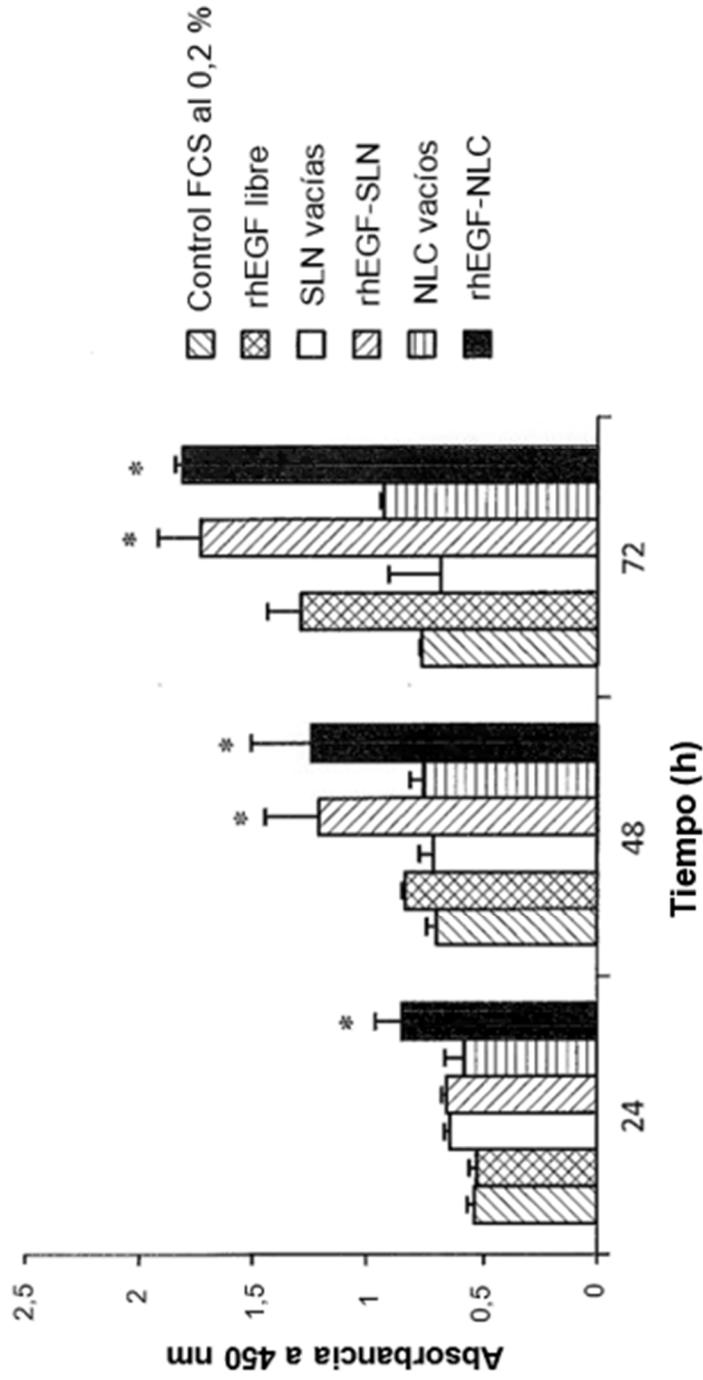


FIG. 1

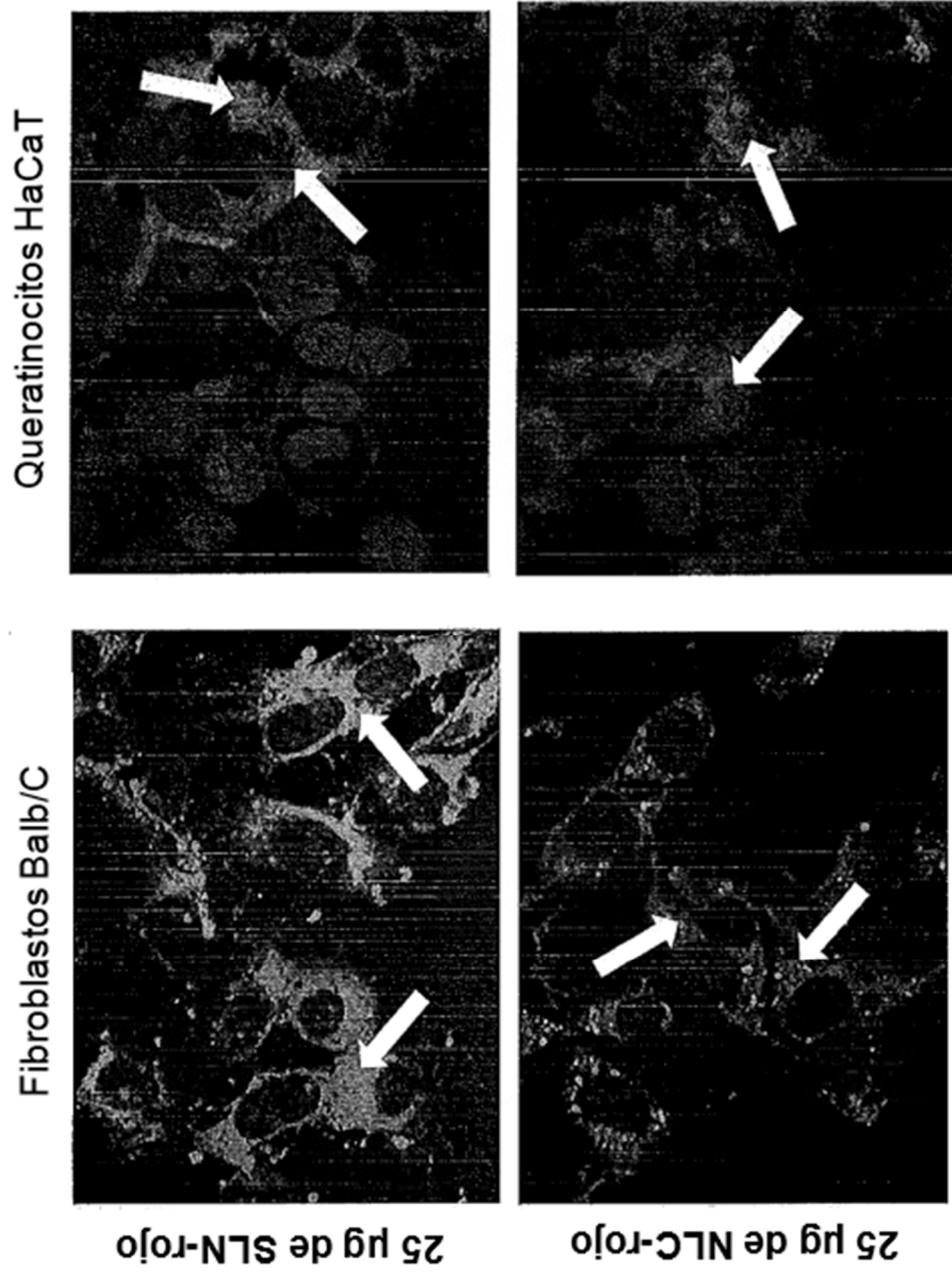


FIG. 2

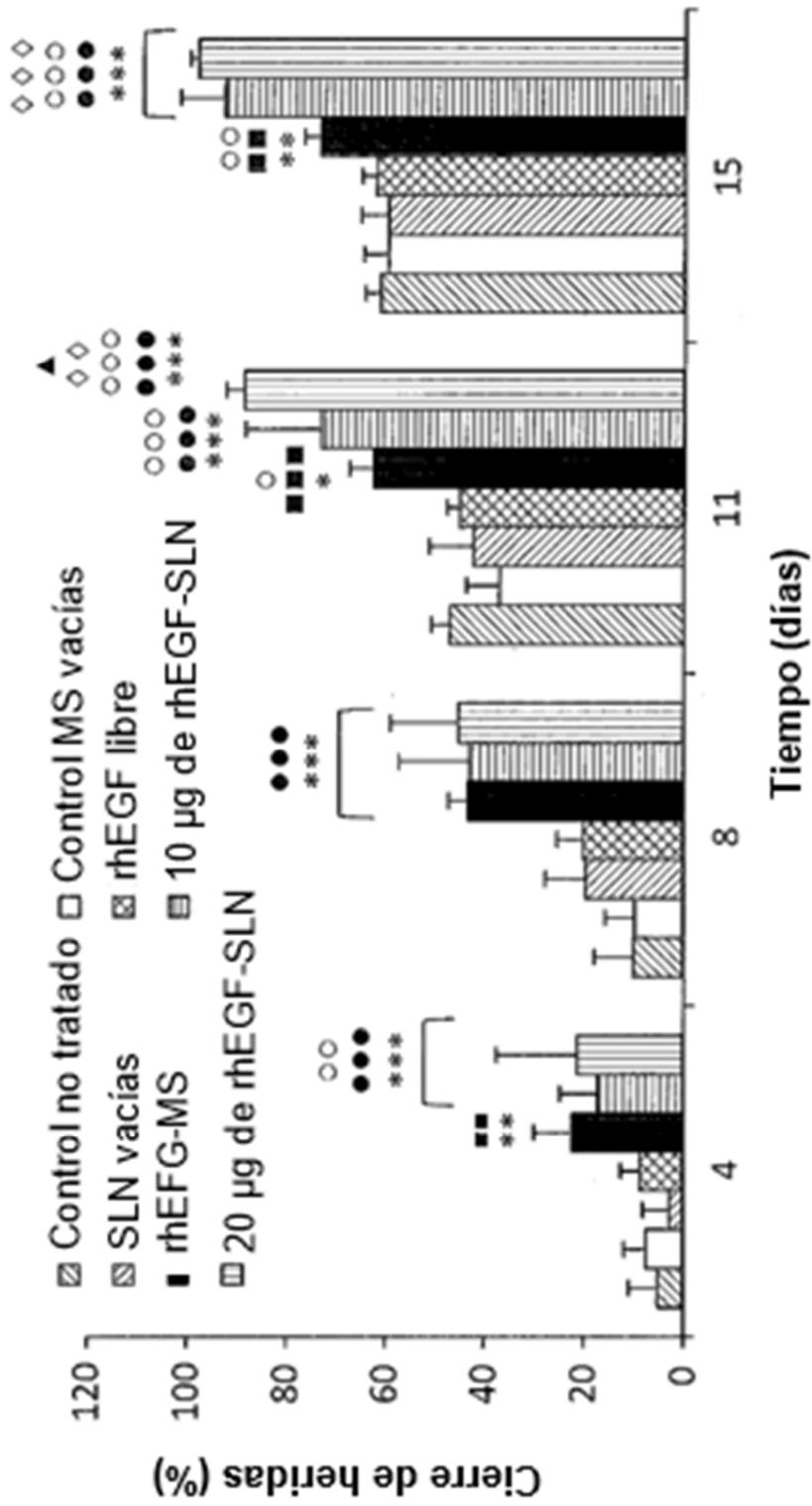


FIG. 3A

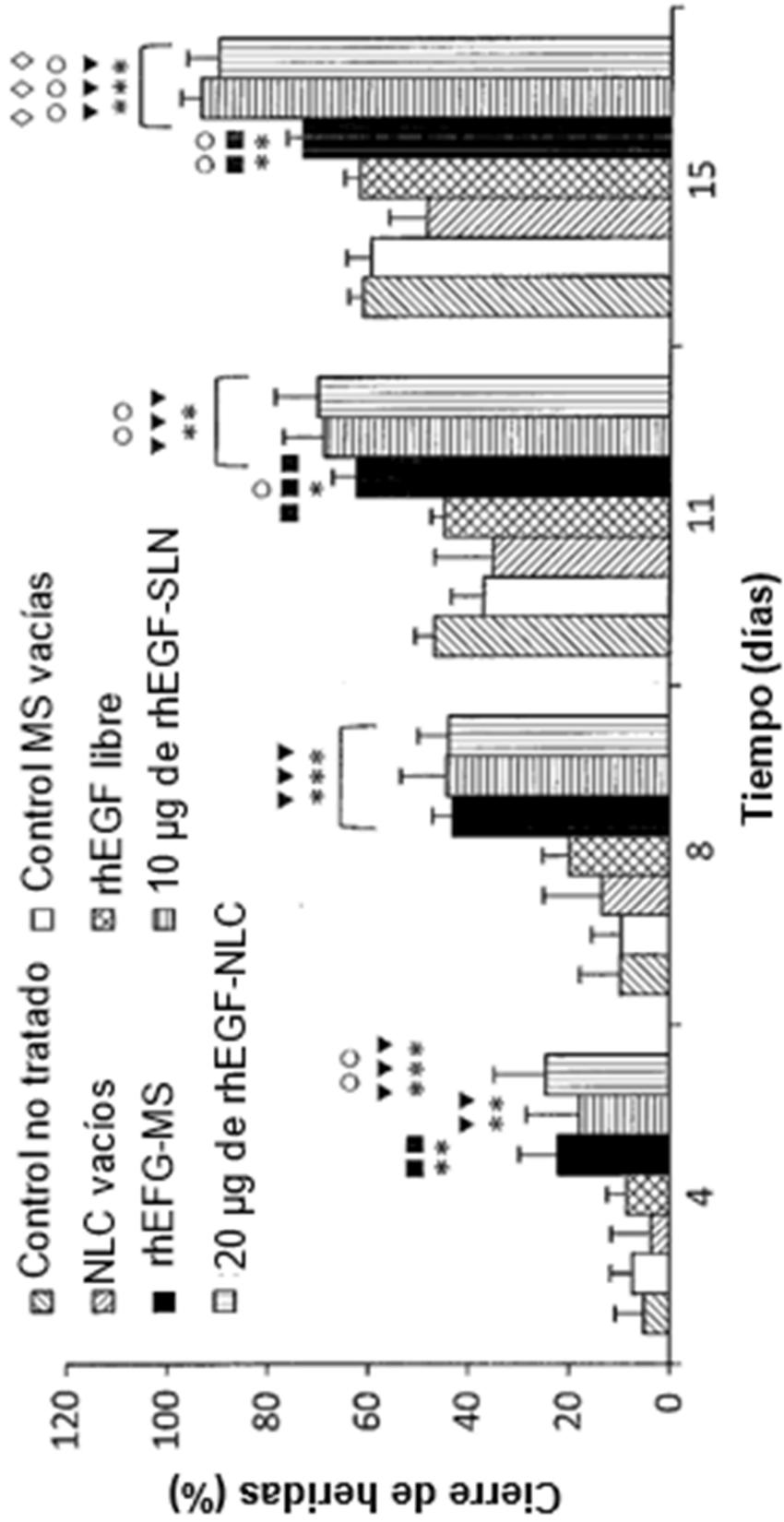


FIG. 3B

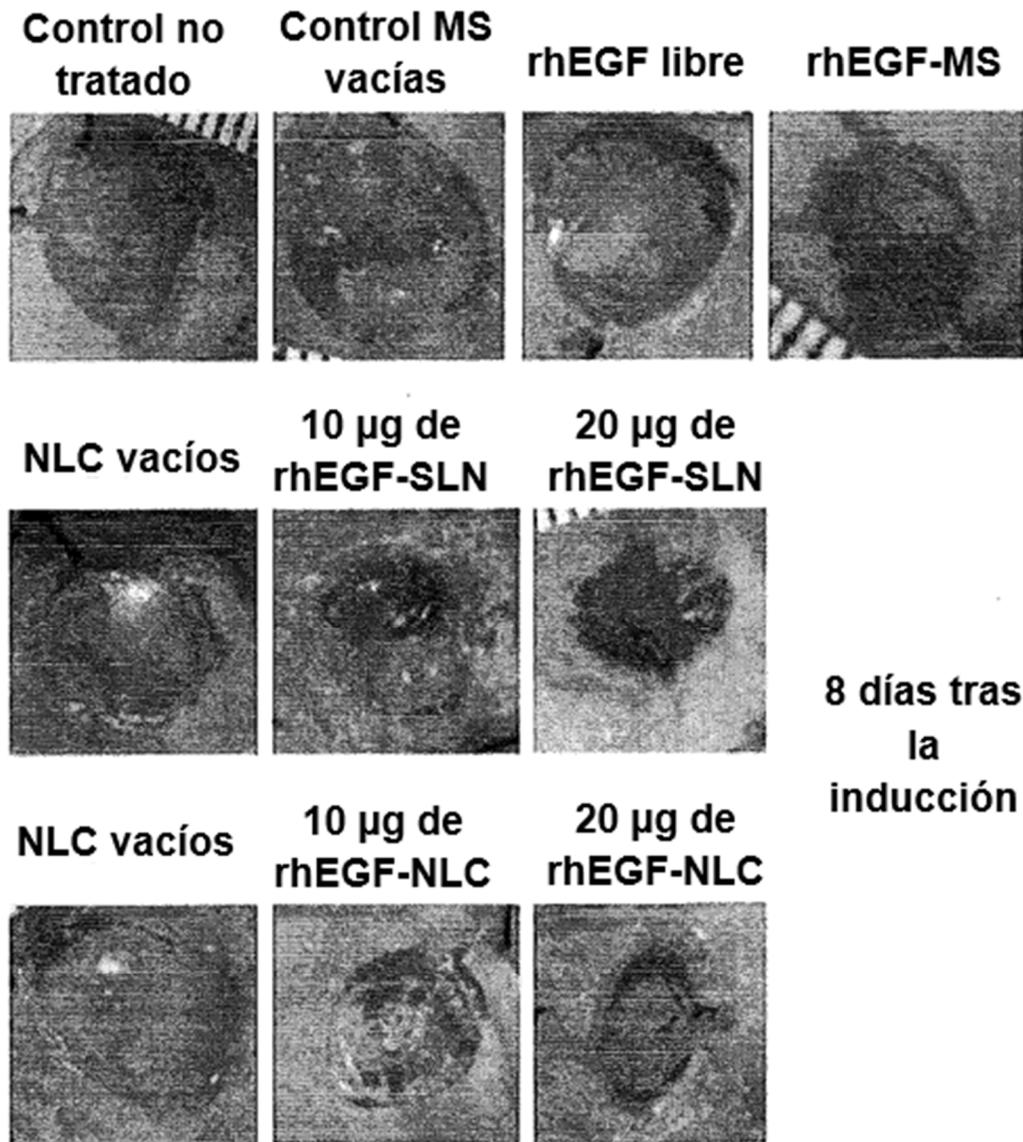


FIG. 3C

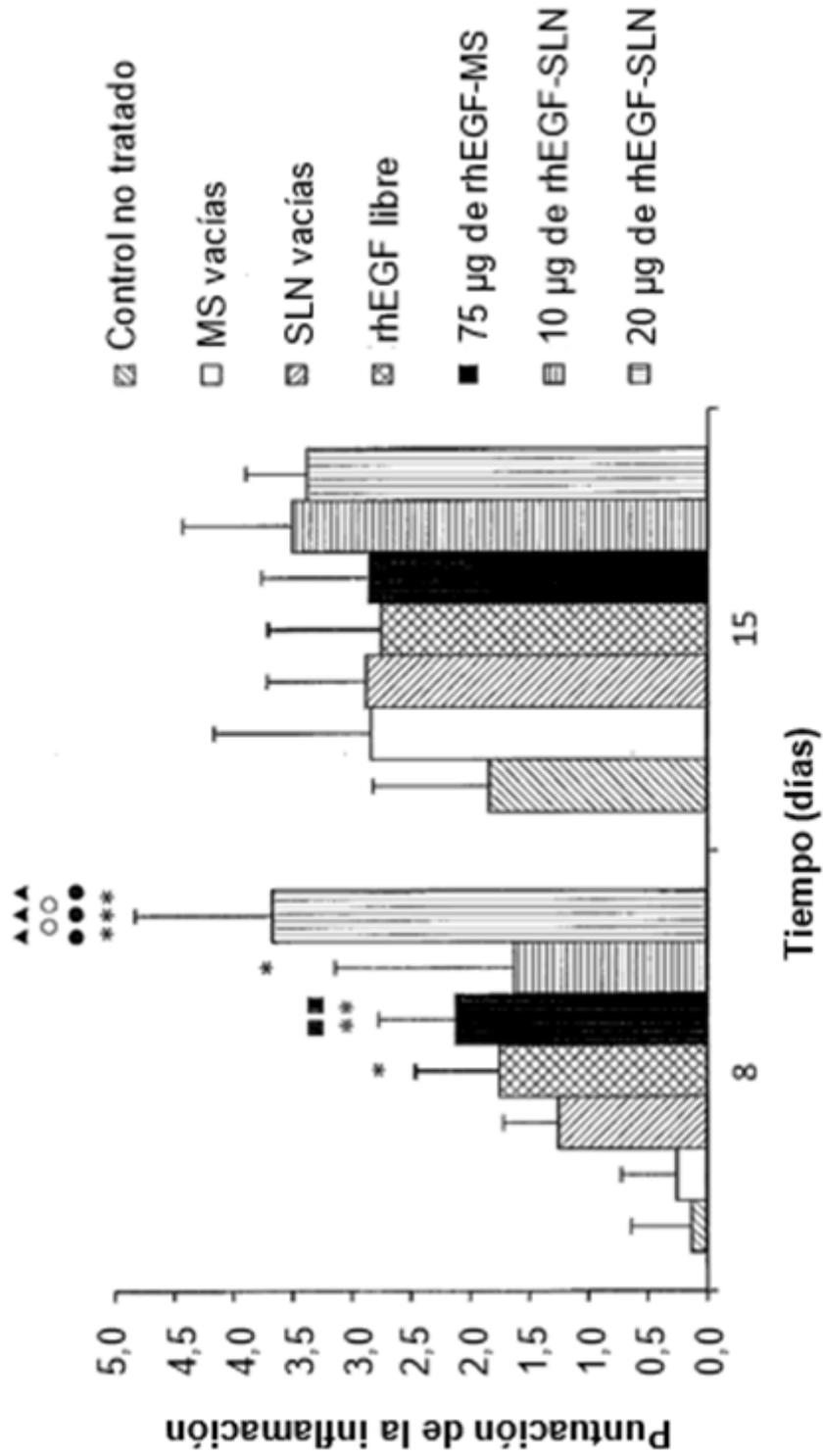


FIG. 4A

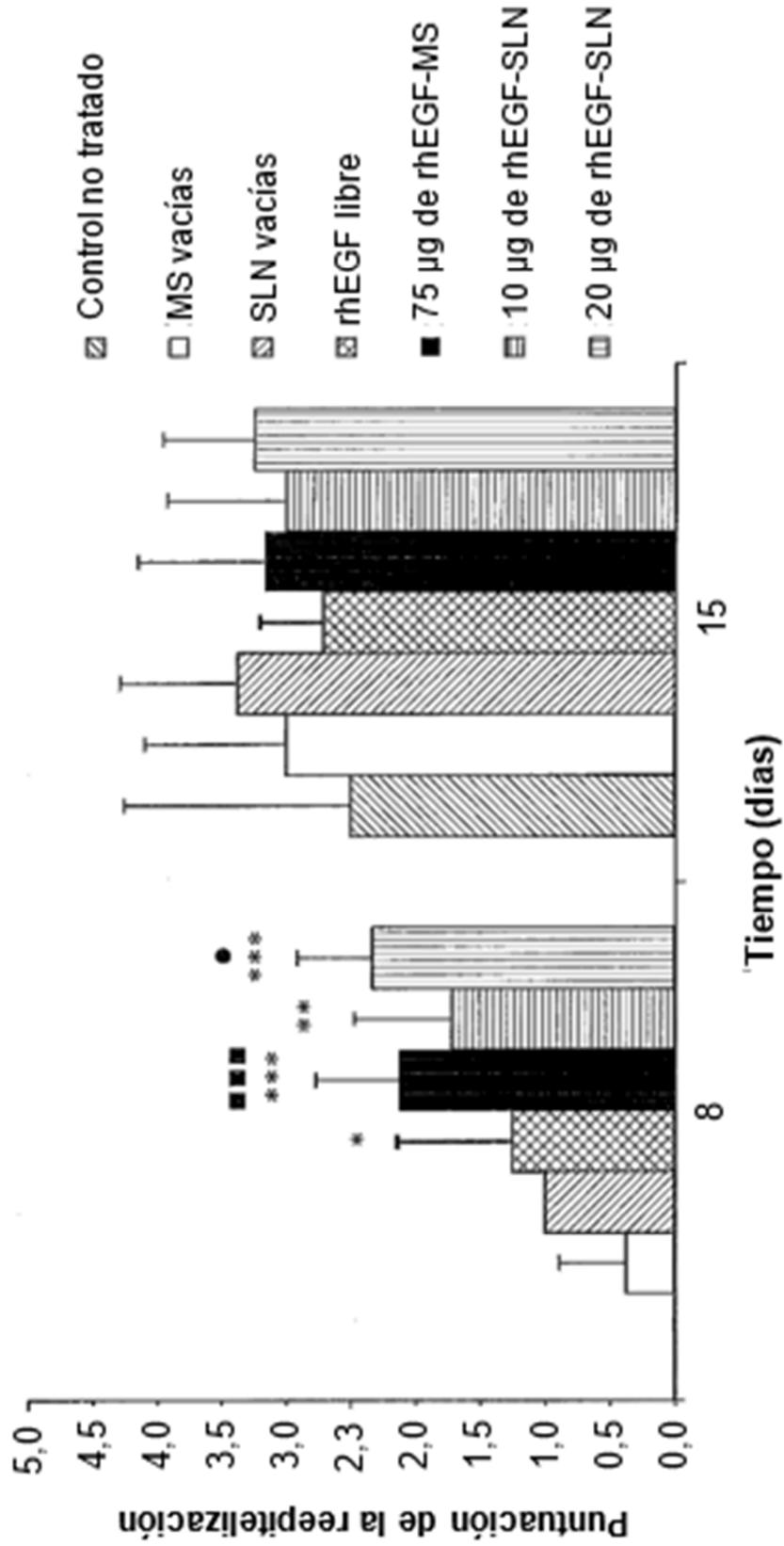


FIG. 4B

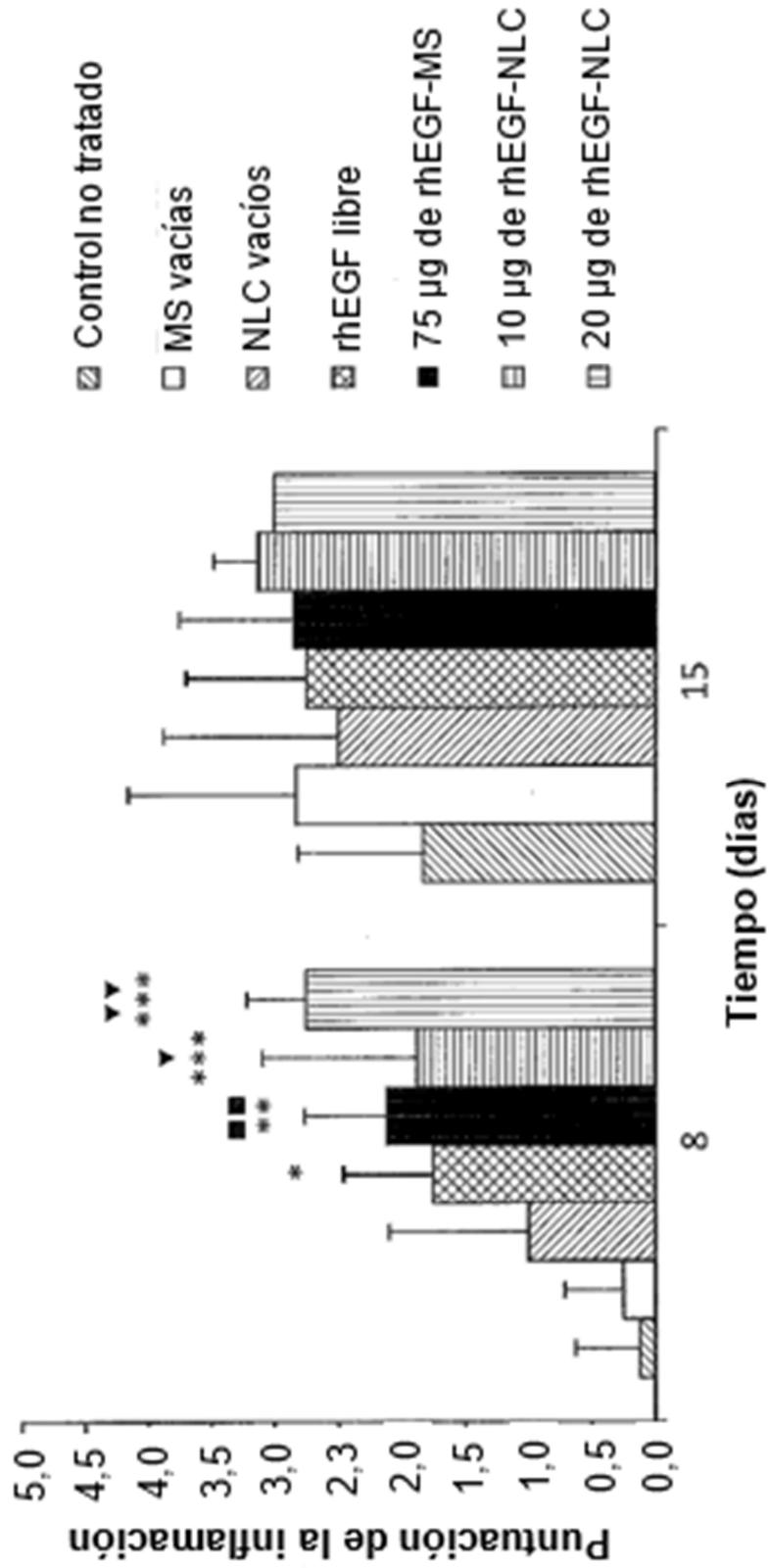


FIG. 4C

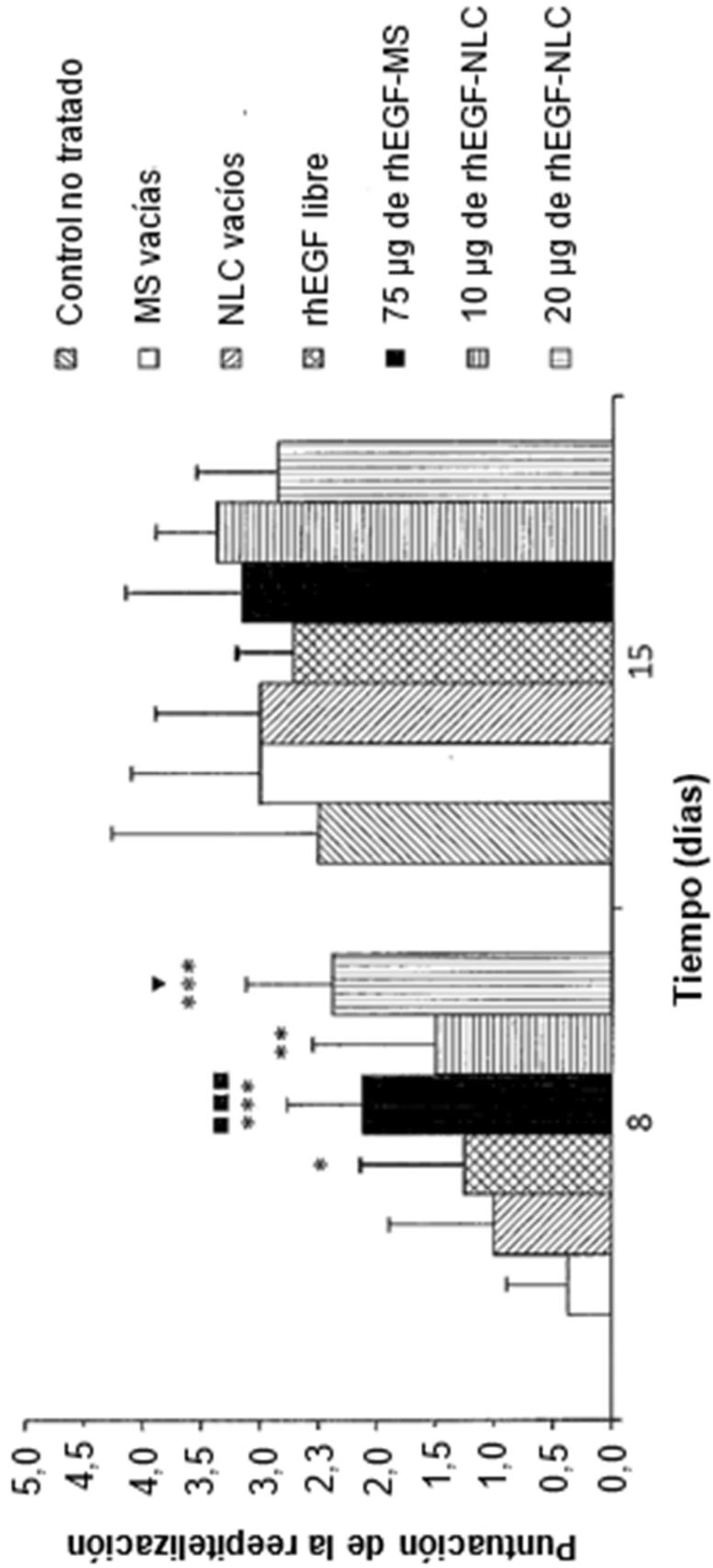
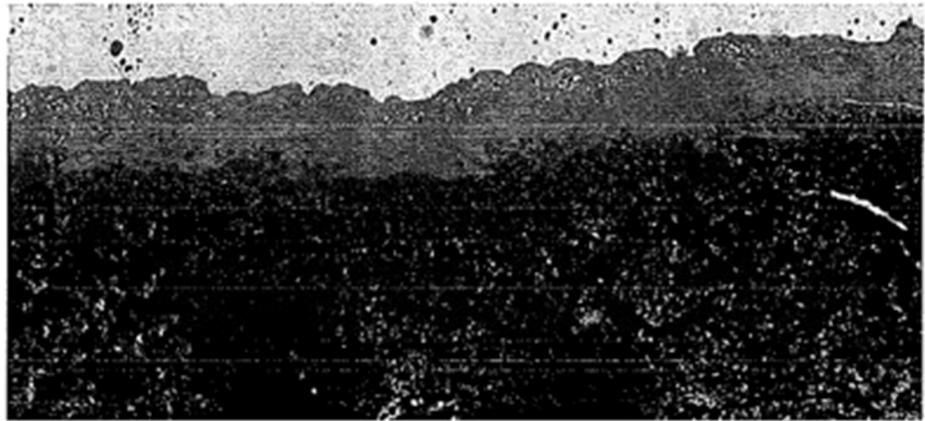


FIG. 4D

**SLN-
rojo**



**NLC-
rojo**



**Parafina-
rojo Nilo**



FIG. 5A

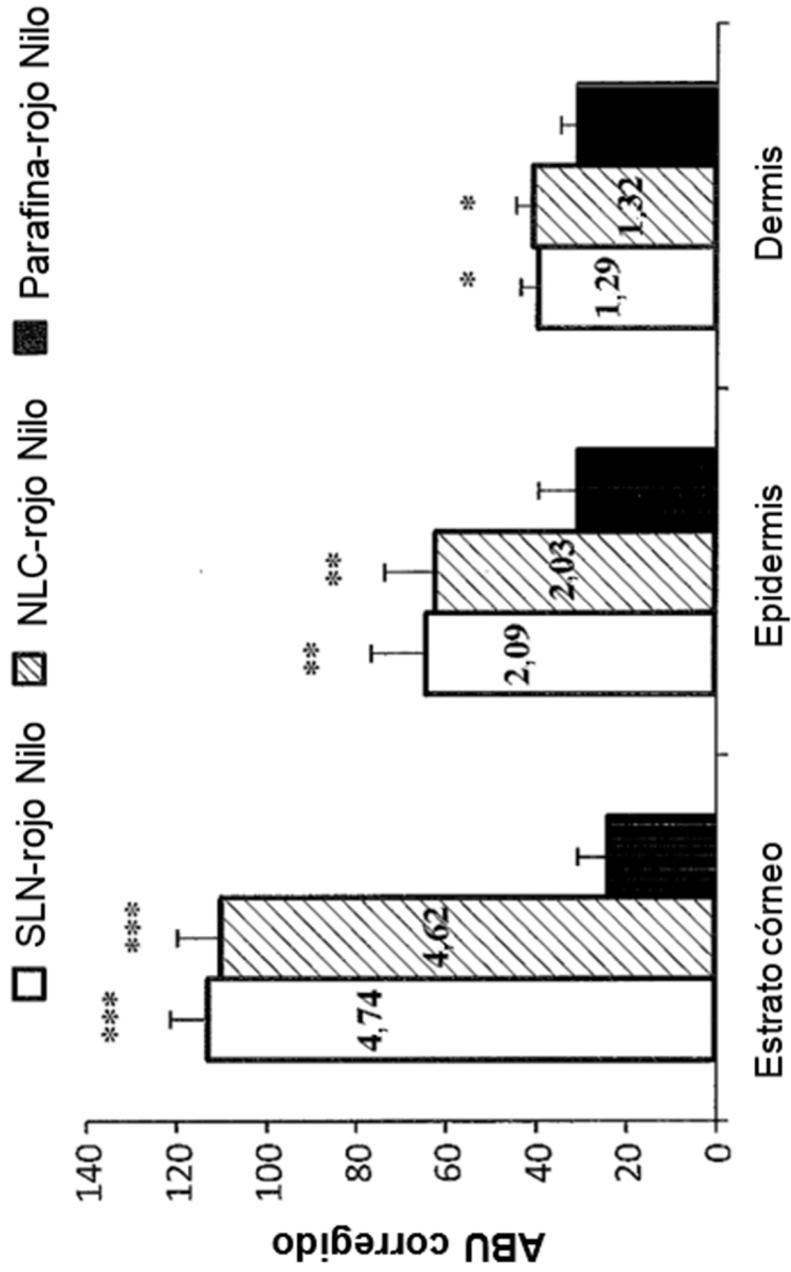


FIG. 5B

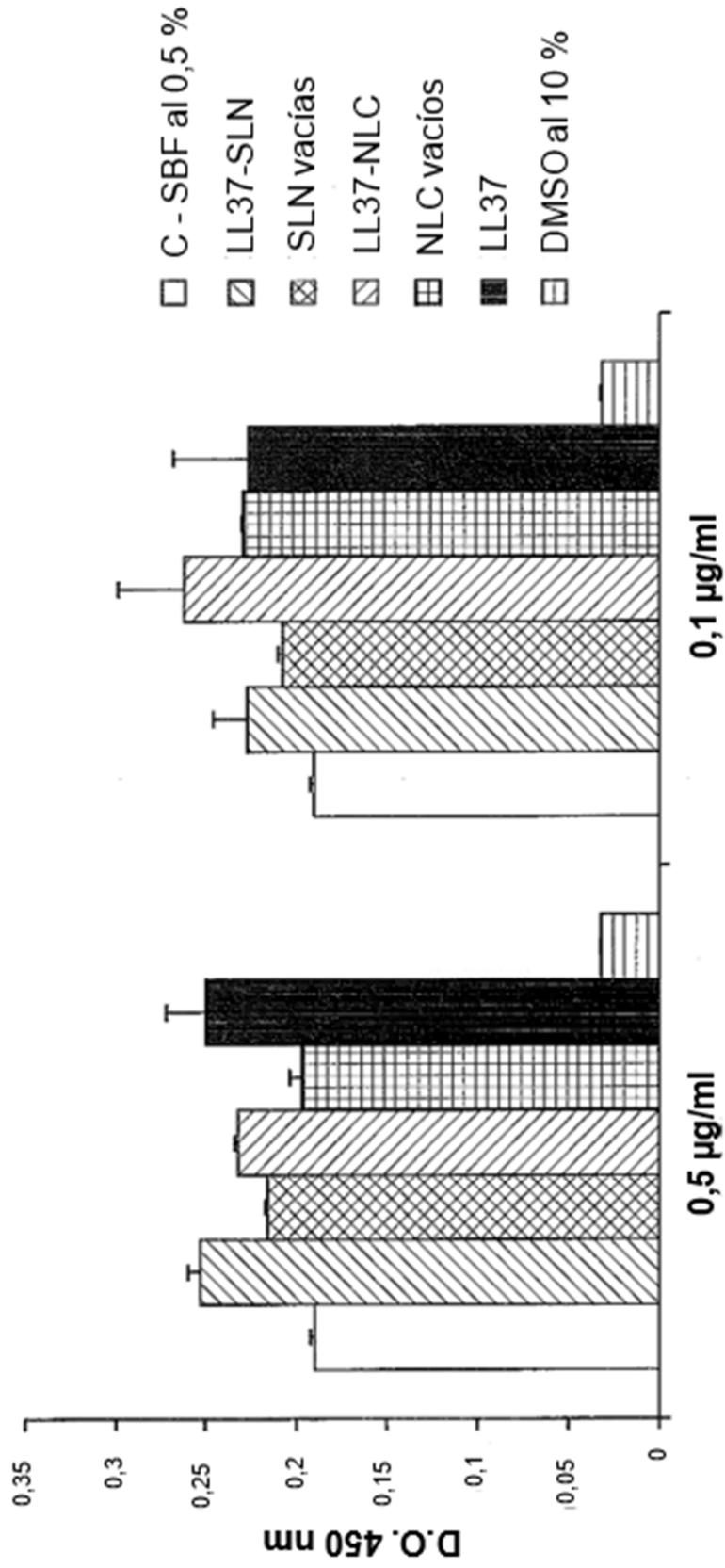


FIG. 6

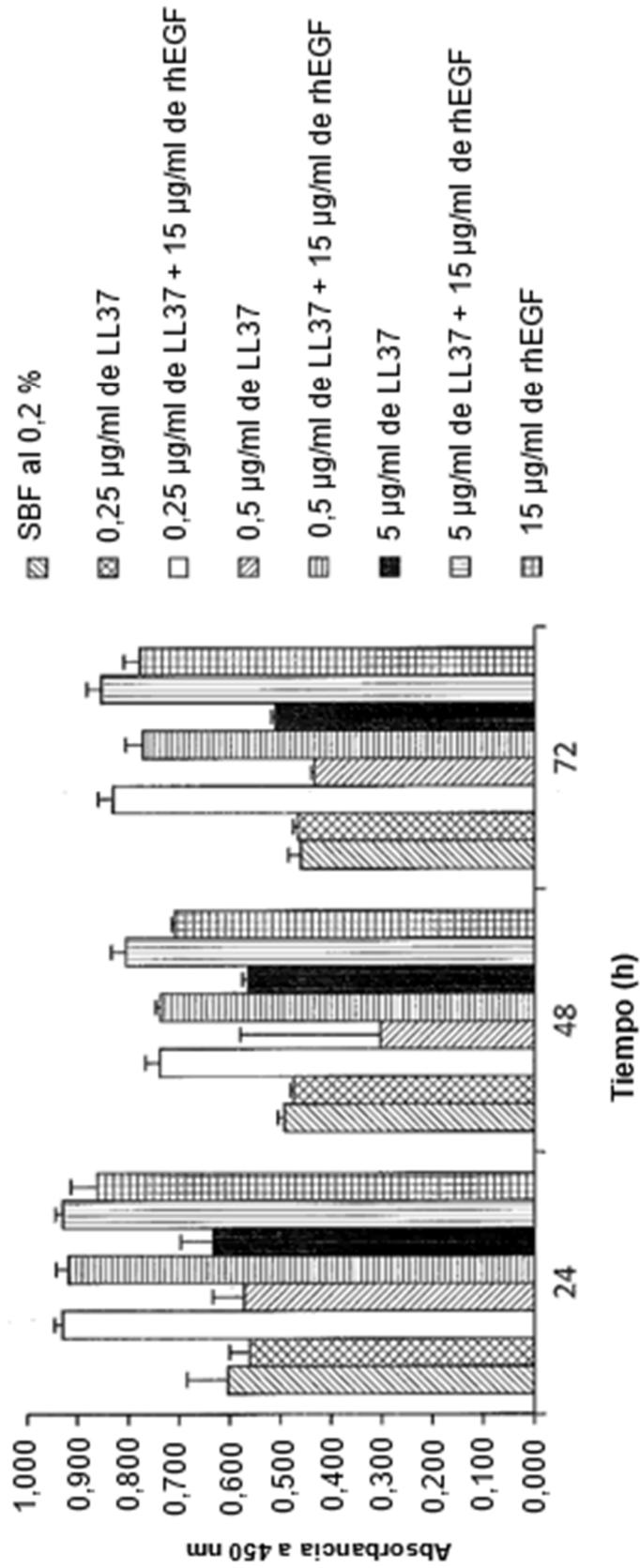


FIG. 7A

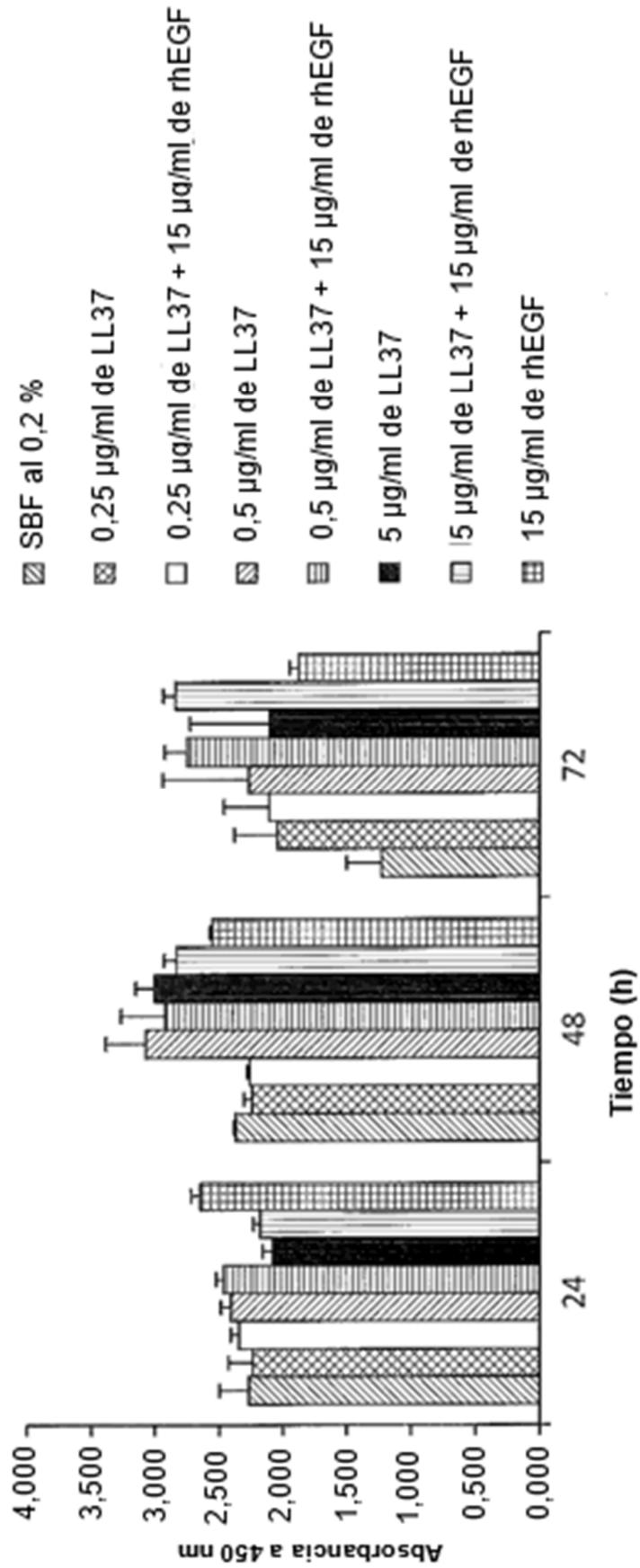


FIG. 7B

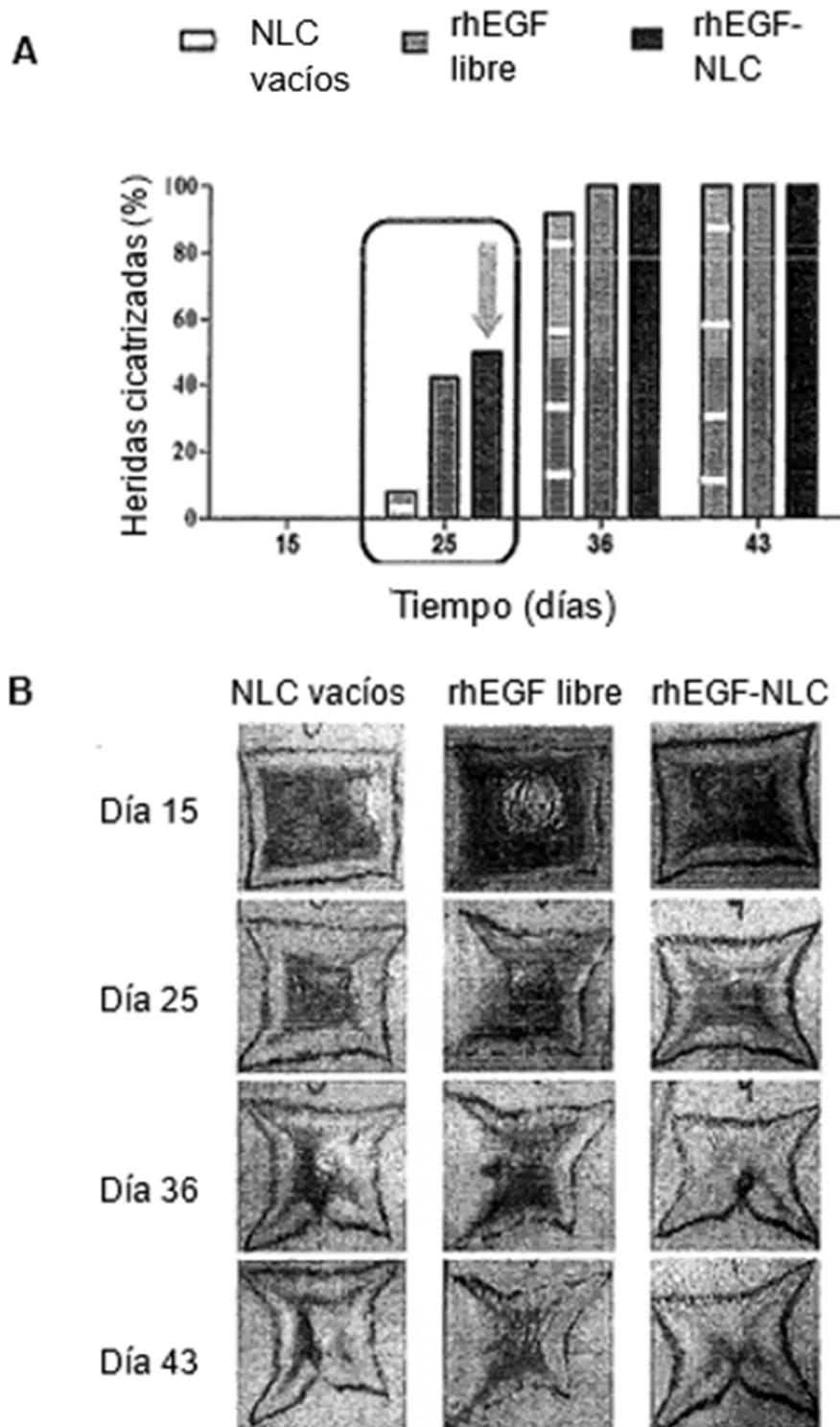


FIG. 8

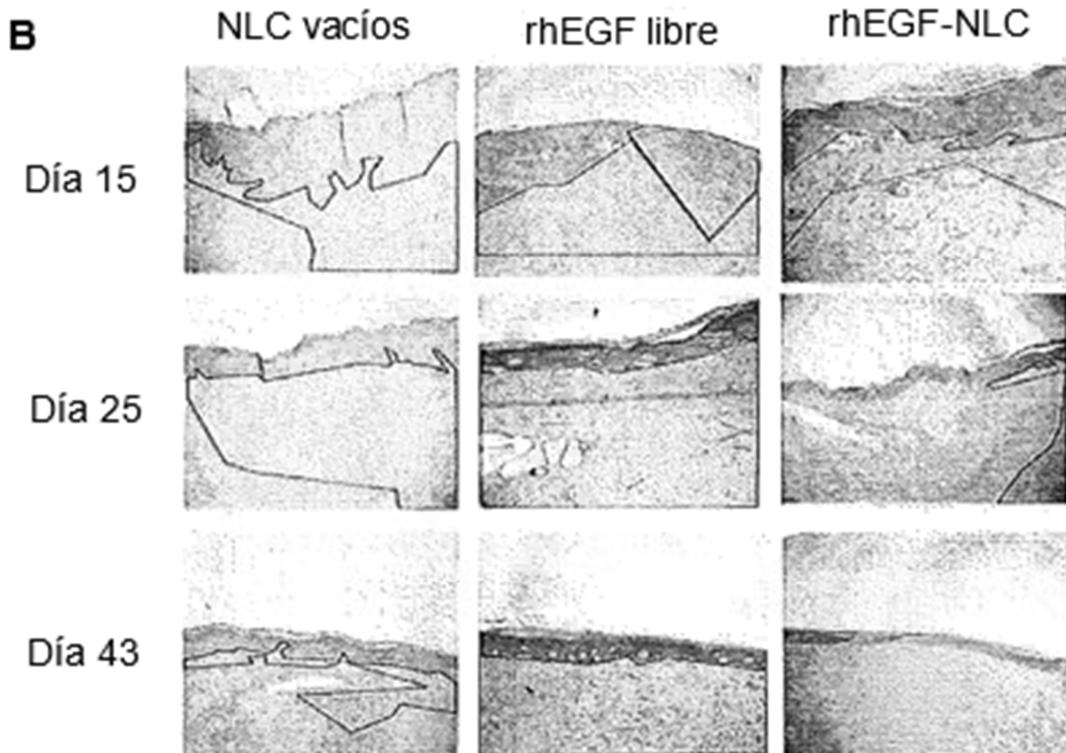
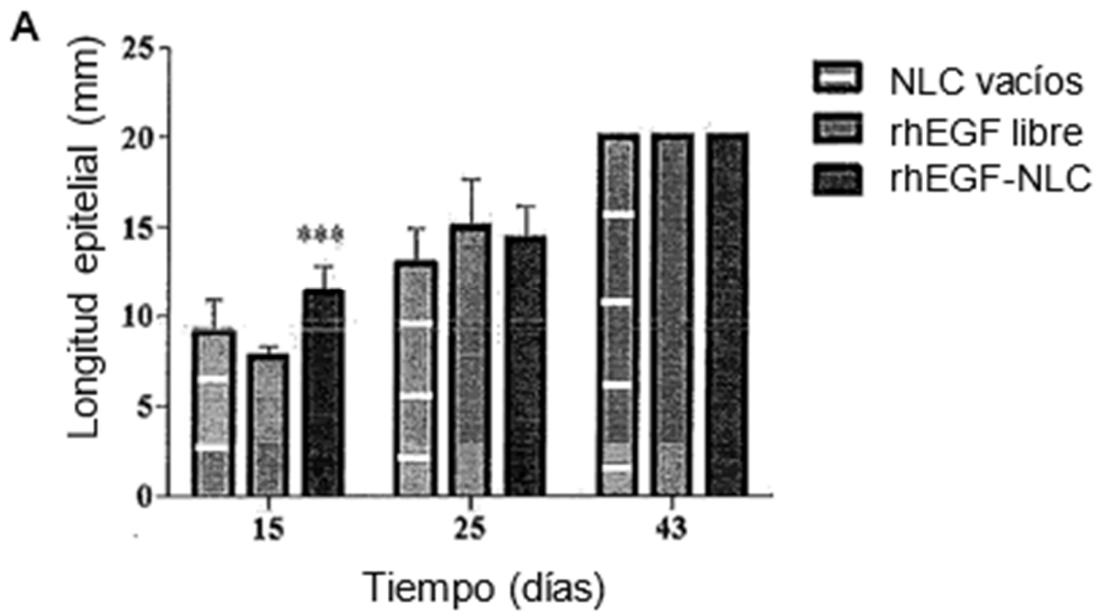


FIG. 9

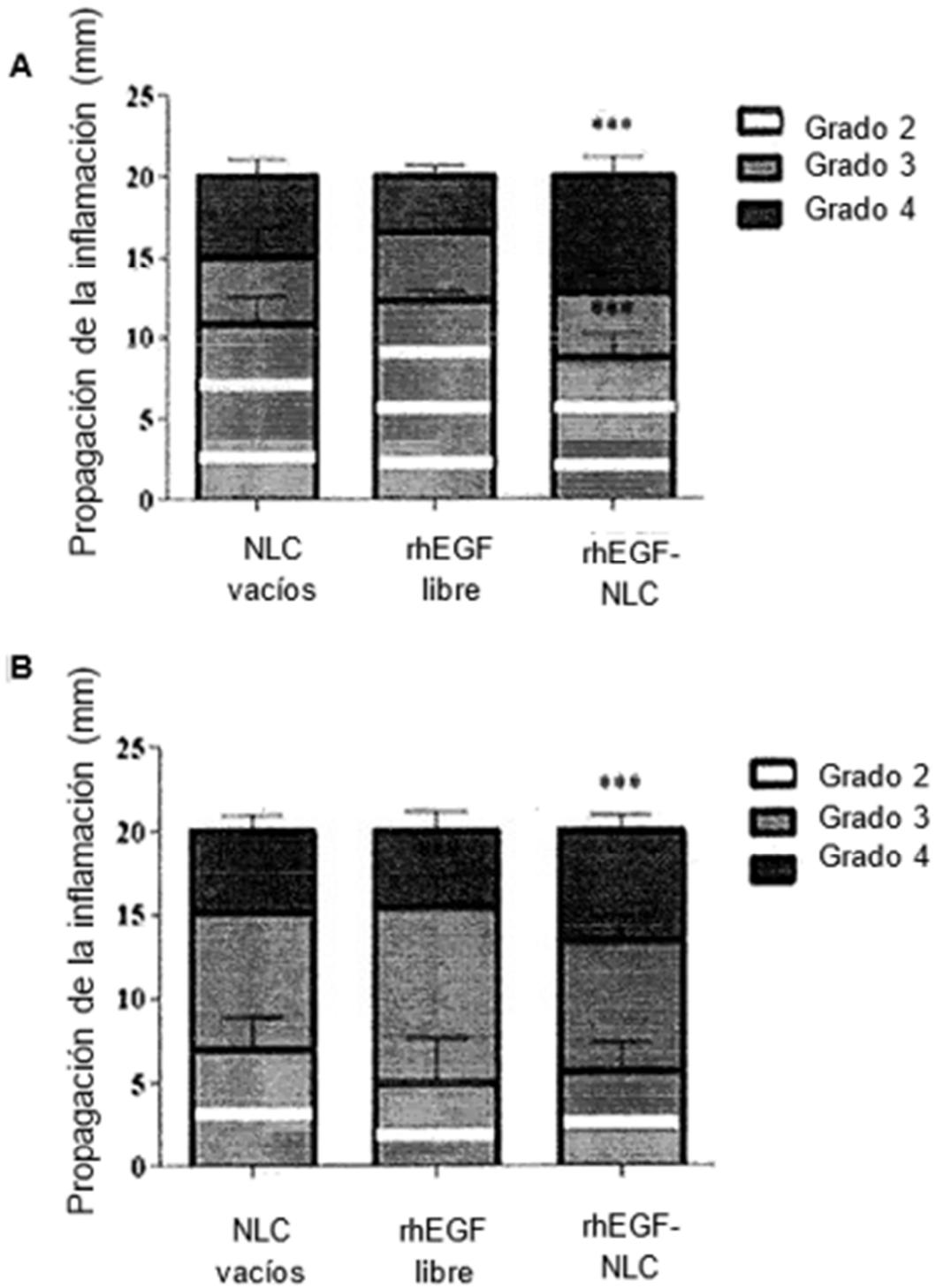


FIG. 10

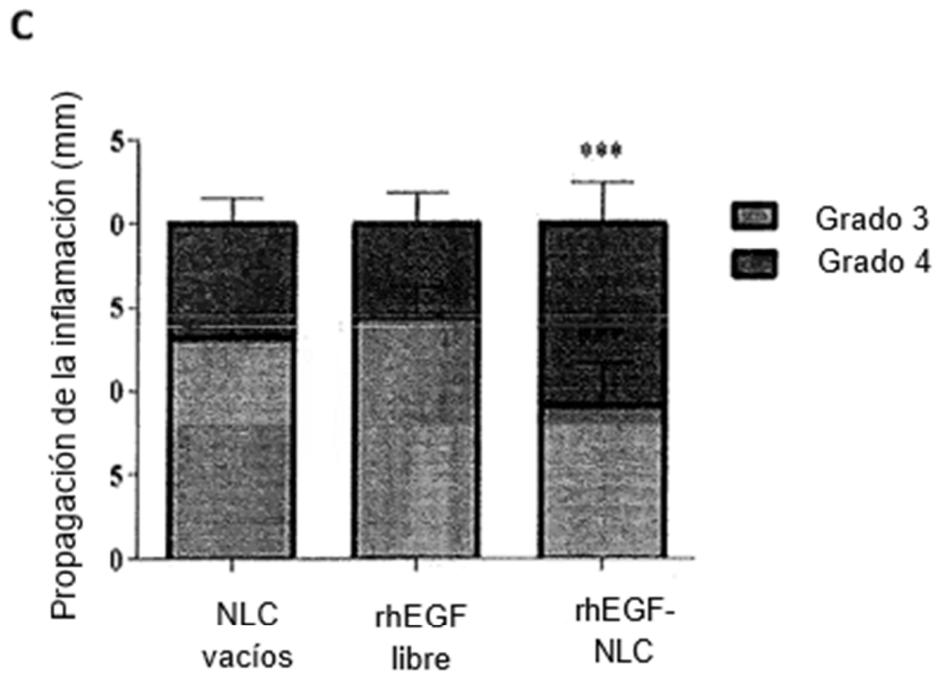


FIG. 10