

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 002**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)
A61L 27/24 (2006.01)
A61L 31/00 (2006.01)
A61F 2/18 (2006.01)
A61L 15/28 (2006.01)
A61L 15/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2014** **PCT/US2014/033536**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014** **WO14186075**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2014** **E 14798587 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 2996709**

54 Título: **Modulación de la actividad del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina para la curación de la membrana timpánica**

30 Prioridad:

15.05.2013 US 201361823749 P

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

10.02.2021

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**SANTA MARIA, PETER LUKE;
YANG, YUNZHI PETER;
KIM, SUNGWOON y
DOMVILLE-LEWIS, CHLOE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 805 002 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

Modulación de la actividad del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina para la curación de la membrana timpánica

5

Antecedentes de la invención

La perforación de la membrana timpánica (TM) surge muy habitualmente como resultado de otitis media o traumatismo. Clínicamente, las manifestaciones más comunes de la perforación de TM son pérdida auditiva
 10 conductiva e infección crónica. La causa más común de perforación de la TM es infección. Las perforaciones asociadas con otitis media aguda no complicada habitualmente son pequeñas; la inmensa mayoría se cura espontáneamente una vez se ha aplacado la infección. Además, pueden producirse perforaciones grandes por infección con organismos necrotizantes. El traumatismo del oído es la otra causa principal de perforaciones de la TM. Las causas principales de lesión son agresiones romas y penetrantes, cambios rápidos de presión barométrica
 15 (barotraumatismo) y presión acústica excesiva.

Después de una lesión, se sabe que el tejido experimenta varias fases de curación. Aunque la curación de heridas en la membrana timpánica implica fases iniciales hemostáticas e inflamatorias que son similares a la curación convencional de la piel, las fases proliferativa y migratoria de la membrana timpánica son marcadamente diferentes
 20 de las de otros tejidos. En la mayoría de situaciones de curación de heridas, se forma un lecho de tejido de granulación, que sirve como plataforma sobre la que se produce la reepitelización. En la curación de la membrana timpánica estos eventos suceden de una manera inversa. La capa epitelial escamosa forma inicialmente un puente a través de la herida y solamente entonces va seguido de la reformación del componente fibroso. La TM es única por que la capa epidérmica desempeña la función inicial crucial en la migración, controlando la capa de proliferación basal este proceso.
 25

La mayoría de las perforaciones de la membrana timpánica se curan espontáneamente, sin embargo, varios factores pueden retardar o evitar el cierre, provocando perforación crónica. Las perforaciones persistentes surgen habitualmente en el entorno de una infección persistente que altera el proceso de reparación. En estas situaciones,
 30 el proceso de curación regenerativo de la membrana se desbarata, evitando la quimiotaxis y la posterior migración epitelial a través de la herida. Histológicamente, en perforaciones crónicas, el epitelio escamoso crece sobre el borde de la perforación hasta encontrar la capa mucosa media de la TM.

El tratamiento para la perforación de TM crónica incluye como objetivos el tratamiento o la prevención de otitis media crónica y la restauración de la audición. El tratamiento convencional incluye el uso de injertos de tejido, por ejemplo, los autoinjertos empleados en tímpanoplastia pueden usar la fascia temporal como autoinjerto. Puede usarse la fascia temporal superficial compuesta de fibroblastos en una matriz de colágeno. Aunque la tímpanoplastia con un injerto de tejido conjuntivo autólogo es un método muy satisfactorio para la reparación de perforaciones persistentes de la TM, sería beneficioso desarrollar un procedimiento que no requiera habilidades microquirúrgicas, sea menos caro y pudiera aplicarse en un consultorio médico. La presente invención aborda esta necesidad.
 40

Publicaciones

Santa Maria et al. (2010) J Mol Histol. Dic. 2010;41 (6):309-14. Santa Maria (2011) Thesis, University of Western
 45 Australia. Johnson y Wang (2013) J Control Release 166(2):124-9. Ishihara et al. (2003) J Biomed Mater Res A. 64(3):551-9. Tolino et al. (2011) Biochim Biophys Acta. 1810(9):875-8; Shirakata et al. (2005) J Cell Sci. 118(Pt 11):2363-70; Huttenbrink (2005) HNO 53(6):515-6; Ma et al. (2002) Acta Otolaryngol. 122(6):586-99. Documento WO 2007/037514. Documento US 2010/0222265

Sumario de la invención

Se proporcionan composiciones y métodos para el tratamiento de perforación crónica de la membrana timpánica. En los métodos de la invención, una membrana timpánica perforada de manera crónica se pone en contacto por vía tópica con una dosis eficaz de factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, HB-EGF, o un agente que
 55 tenga actividad HB-EGF, durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar curación mejorada de la perforación de la membrana. En algunas realizaciones, la dosis de HB-EGF se proporciona en una formulación de liberación mantenida; en otras realizaciones, se proporciona administración normal de una formulación de liberación no mantenida. En algunas realizaciones, una formulación de liberación mantenida es biodegradable. En otras realizaciones, la liberación mantenida se proporciona mediante un dispositivo, por ejemplo, una bomba u otro dispositivo de liberación.
 60

La TM que se está tratando se pone en contacto con HB-EGF durante un periodo de tiempo suficiente para mejorar la curación de la perforación de la TM, es decir, para provocar un cierre sustancial de la perforación, por ejemplo, para una perforación de menos de aproximadamente 0,1 mm² de área. El cierre puede controlarse visualmente, incluyendo microscópicamente; funcionalmente, por ejemplo, en la reducción de la pérdida de la audición; y similares. El período de tiempo para el contacto con HB-EGF puede ser de al menos un día, al menos 3 días, al
 65

menos 5 días, al menos 7 días, al menos 10 días, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas; y puede ser de hasta un día, hasta 3 días, hasta 5 días, hasta 7 días, hasta 10 días, hasta 2 semanas, hasta 3 semanas o más de acuerdo con las necesidades del individuo.

5 En determinadas realizaciones específicas, la dosis eficaz de HB-EGF se proporciona en una formulación de liberación mantenida no ototóxica, por ejemplo, gel, espuma, inserción, etc., preferiblemente una formulación biodegradable. En una de dichas realizaciones, una dosis eficaz de HB-EGF se formula en un gel que comprende quitosano, poli(ácido láctico) y fibrinógeno.

10 En una realización, la invención comprende un método de (i) identificación de un paciente que tiene una perforación crónica de la TM; (ii) contacto de la TM afectada con una dosis eficaz de HB-EGF, por ejemplo, proporcionada en forma de gotas a administrar a intervalos adecuados, en un dispositivo para liberación mantenida de HB-EGF, en una formulación de liberación mantenida, etc.; y (iii) control del individuo para determinar el cierre eficaz de la perforación.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un agente con actividad de HB-EGF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una perforación crónica de la TM, en el que el medicamento se administra a un paciente que tiene una perforación crónica de la TM durante un período de tiempo y dosis suficientes para lograr el cierre de la perforación.

20 Otro aspecto más de la presente invención proporciona un kit para el tratamiento de la perforación crónica de la TM. El kit incluye una formulación que proporciona una dosis eficaz de HB-EGF, por ejemplo, en forma de gotas, dispositivos, formulaciones y similares. El kit también puede incluir un dispositivo de suministro, por ejemplo, dosificador de gotas óticas, jeringa para el suministro de una formulación, jeringa de doble cilindro para suministrar una formulación de dos partes; y similares. El kit también puede comprender instrucciones de uso.

25 En otras realizaciones, se proporcionan métodos para la abertura temporal de la membrana timpánica, por ejemplo, para la inserción de tubos y similares. En dichas realizaciones, una TM se pone en contacto con una dosis eficaz de un inhibidor de HB-EGF, incluyendo, sin limitación, un inhibidor del ligando de EGFR shedding, durante un período de tiempo suficiente para crear una pequeña perforación en la TM. En algunas de dichas realizaciones, una pequeña perforación puede hacerse mecánicamente antes del contacto con el inhibidor.

Breve descripción de los dibujos

35 Figura 1. Imágenes representativas de TM después de perforaciones tratadas con OSU8-1 (un inhibidor del ligando de EGFR shedding) en (a) día 2 (b) día 14 (c) día 44 (d) día 90 (3 meses). La perforación está perfilada en azul.

Figura 2. Los umbrales de ABR y DPOAE se midieron 60 días después de que ambas membranas del tímpano se perforaran quirúrgicamente en 9 ratones. A un oído no se le administró inyección (control), mientras que el oído opuesto se rellenó con vehículo de suministro polimérico de quitosano, fibrinógeno y poliláctido.

40 Figura 3. ET antes (a) y después (b) de oclusión con gutapercha. El procedimiento en la rata se adaptó abriendo la ampolla etmoidal usando un dispositivo de grabado con una fresa de 0,5 mm. La abertura de la ampolla etmoidal lateralmente permite que la gutapercha se suministra a la ET con menos retracción de las vías respiratorias. Las ET se examinaron post mortem confirmando oclusión completa.

45 Figura 4. Tratamiento con GF de perforaciones crónicas en un modelo de ratones de oclusión de ET. La fila superior (a) son imágenes representativas del grupo de tratamiento que muestra perforaciones curadas. La fila inferior (b) son imágenes representativas del grupo de control (polímero solamente) que muestra perforación persistente (perfilado azul). Nota: algunas TM en la fila superior se han curado con timpanoesclerosis.

Figura 5. Suministro transtimpánico de factor de crecimiento.

50 Figura 6. Suministro transtimpánico de factor de crecimiento.

Figura 7. Suministro transtimpánico de factor de crecimiento.

Figura 8. Suministro intratimpánico de factor de crecimiento.

Figura 9. Vehículo de suministro de fármacos adyacente a la membrana timpánica.

Figura 10. Formulacion fluida de suministro de fármacos.

55 Las características y muchas otras ventajas de la invención llegarán a entenderse mejor por referencia a la siguiente descripción detallada cuando se tome junto con los dibujos adjuntos.

Descripción detallada de las realizaciones

60 Antes de describir adicionalmente la presente invención, debe entenderse que la invención no se limita a las realizaciones particulares de la invención descritas a continuación, ya que pueden hacerse variaciones de las realizaciones particulares y aún estar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. También debe entenderse que la terminología empleada es con el propósito de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante.

65 En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un/o", "una" y "el/la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

- 5 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior salvo que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, está englobado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están englobados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, también se incluyen en la invención intervalos que excluyen alguno de esos límites incluidos o ambos.
- 10 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el este documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la invención, ahora se describen métodos, dispositivos y materiales ilustrativos.
- 15 Todas las publicaciones mencionados en este documento se incorporan en este documento por referencia con el propósito de describir y divulgar los componentes objeto de la invención que se describen en las publicaciones, que son componentes que podrían usarse en relación con la invención actualmente descrita.
- 20 La presente invención se ha descrito en términos de realizaciones particulares encontradas o propuestas por el autor de la presente invención para que comprenda modos preferidos para la práctica de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que, a la luz de la presente divulgación, pueden hacerse numerosas modificaciones y cambios en las realizaciones particulares ejemplificadas sin alejarse del alcance pretendido de la invención. Por ejemplo, debido a consideraciones de equivalencia funcional biológica, pueden hacerse cambios en la estructura proteínica sin
- 25 afectar a la acción biológica en términos de tipo o cantidad. Se pretende que todas estas modificaciones estén incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

- 30 Los términos usados en esta memoria descriptiva en general tienen sus significados habituales en la técnica, dentro del contexto de esta invención y en contexto específico donde se usa cada término. Determinados términos se analizan a continuación, o en otra parte en la memoria descriptiva, para proporcionar directrices adicionales en la descripción de las composiciones y métodos de la invención y en la manera de prepararlos y usarlos.
- 35 *Sujeto*. Los individuos para el tratamiento con los métodos de la invención pueden ser de cualquier especie de mamífero o ave, incluyendo seres humanos. Los animales no humanos incluyen, sin limitación, mamíferos, animales de laboratorio tales como ratones, ratas, conejos, hámsteres, cobayas, chinchillas, etc.; animales domésticos tales como perros y gatos; y animales de granja tales como ovejas, cabras, cerdos, caballos y vacas. Un animal no humano de la presente invención puede ser un animal mamífero o no mamífero; un vertebrado o un invertebrado.
- 40 "Tratamiento" de un sujeto o "tratar" un a sujeto para una enfermedad o afección en este documento significa reducir o aliviar los síntomas clínicos de la enfermedad o afección tal como perforación crónica de la TM.
- 45 "Promover", "potenciar" o "mejorar" la membrana timpánica o la curación de heridas en general significa aumentar la velocidad por la que la herida o la perforación se cura o reducir el grado de cicatriz residual o tejido queloide o necrótico durante o después de la curación de la herida o perforación.
- Una "*herida*" es una rotura o discontinuidad en la estructura de un órgano o tejido, incluyendo el epitelio, el tejido conjuntivo y el tejido muscular. Ejemplos de heridas incluyen, aunque sin limitación, heridas de la piel, contusiones, úlceras, úlceras de decúbito, rozaduras, desgarros, cortes, punciones, heridas por psoriasis, perforaciones de la membrana timpánica, abrasiones de la córnea y perturbaciones y quemaduras.
- 50 Aplicación "*tópica*" se refiere a administración local no sistémica de un ingrediente activo a una superficie de una herida.
- 55 *Membrana timpánica*. La membrana timpánica es una membrana delgada con forma de cono, que separa el oído interno del oído medio en los seres humanos y otros mamíferos. Su función es transmitir el sonido del aire a los huesecillos dentro del oído medio y, después, a la ventana oval en la cóclea llena de líquido. Por tanto, finalmente convierte y amplifica la vibración del aire en vibración de líquido. El hueso martillo une el hueso entre la membrana del tímpano y los otros huesecillos.
- 60 Hay dos regiones generales de la membrana timpánica: la porción flácida y la porción tensa. Las porción flácida consiste en dos capas, es relativamente frágil y está asociada con disfunción de la trompa de Eustaquio y colesteatomas. La región de la porción tensa más grande consiste en tres capas: piel, tejido fibroso y mucosa. Es comparativamente robusta y es la región más habitualmente asociada con perforaciones.
- 65

La rotura o la perforación de la TM puede ser el resultado de diversos traumatismos, de infección y similares. Las perforaciones de la TM pueden provocar pérdida auditiva conductiva (CHL) que varía de insignificante a 50 dB. El área y la ubicación de las perforaciones puede variar, por ejemplo, anterior, posterior o ambas; y en área de 0,1 a aproximadamente 60 mm², en general en el intervalo de 2,5 a 10 mm² (véase Mehta et al. (2006) Otol Neurotol. 27(2): 136-143). La perforación puede ser aguda o crónica. La perforación aguda en general no se trata, ya que la TM habitualmente se cura por sí misma. Sin embargo, en algunos individuos la TM no se cura, dando lugar a una perforación crónica.

Perforación crónica de la membrana timpánica. Una perforación que no se cura en ausencia de tratamiento, o cuando se trata por métodos convencionales, por ejemplo, con tratamiento con antibióticos, puede considerarse una perforación crónica. Los expertos en la materia entienden que puede haber diferencias en la cantidad de tiempo necesario para la curación entre individuos, pero en general una perforación que no se cura después de hasta aproximadamente 3 meses, después de hasta aproximadamente 2 meses, después de hasta aproximadamente 1 mes, puede clasificarse como afección crónica.

Las heridas crónicas o que no se curan son heridas abiertas que no logran epitelizar y se cierran en una cantidad razonable de tiempo. Estas heridas son clínicamente inactivas y sin evidencias de cierre adicional. Puede considerarse que las heridas crónicas carecen de señales de "inicio" apropiadas. (Véase, por ejemplo, Lorenz y Longaker, en Wounds: Biology, Pathology, and Management, Capítulo 7, pág. 77-88).

"Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina", como se usa en este documento, se refiere a factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina de mamífero, por ejemplo, ser humano, que se produce de manera endógena, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina alélico, derivados conservativos funcionales del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, fragmentos del factor de crecimiento de unión a heparina funcionalmente activos y homólogos del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, tales como el factor de crecimiento similar al factores de crecimiento de unión a heparina. El HB-EGF también se refiere a formas variantes de HB-EGF, por ejemplo, que proporcionan actividad potenciada, estabilidad aumentada, mayor rendimiento o mejor solubilidad. Las composiciones para su uso en los métodos de la invención pueden comprender una o un cóctel de actividades de HB-EGF, por ejemplo, que comprenden una pluralidad de diferentes moléculas de HB-EGF. En general, una actividad de HB-EGF, como se usa en este documento, se refiere a la unión al receptor afín, activación del receptor, actividades biológicas que se producen como resultado de la unión al receptor y activación, y similares.

El HB-EGF es el factores de crecimiento predominante en la epitelización necesaria para la curación de heridas cutáneas. Los efectos mitógenos y migratorios de HB-EGF en los queratinocitos y los fibroblastos promueven la reparación dérmica y la angiogénesis necesaria para la curación de heridas y es un componente principal de los líquidos de las heridas. La unión en la superficie celular de HB-EGF a proteoglicanos de sulfato de heparano potencia las capacidades promotoras de mitógenos que aumentan la tasa de curación de heridas de la piel, disminuyendo los tiempos de curación de injertos de piel humana y promueve la rápida curación de úlceras, quemaduras y heridas de epidérmicas de espesor parcial.

El HB-EGF se sintetiza como una glucoproteína mitógena y quimiotáctica anclada a membrana. El HB-EGF es una glucoproteína de 87 aminoácidos que presenta expresión génica muy regulada. El ectodominio shedding produce la forma madura soluble de HB-EGF, que influye en la mitogenicidad y factores quimiotácticos para células del músculo liso y fibroblastos. La forma transmembranaria de HB-EGF es el receptor único para la toxina diftérica y funciona en la señalización yuxtacrina en células. Ambas formas de HB-EGF participan en procesos fisiológicos normales y en procesos patológicos incluyendo la progresión de los tumores y la metástasis, la hiperplasia de los órganos y enfermedad aterosclerótica. Para los propósitos de la invención, en general se usa la forma madura soluble de la proteína. La proteína o agente puede ser sustancialmente pura, por ejemplo, libre de otras proteínas, libre de material celular, etc., habitualmente al menos aproximadamente un 50 % puro, al menos aproximadamente un 75 % puro, al menos aproximadamente un 80 % puro, al menos aproximadamente un 90 % puro, al menos aproximadamente un 95 % puro, al menos aproximadamente un 99 % puro.

En una realización preferida, se usa una preparación sustancialmente pura de HB-EGF. El HB-EGF puede adquirirse en forma purificada, o producida por purificación del componente a partir de seres humanos u otros animales, o por producción recombinante en células hospedadoras, incluyendo células hospedadoras procariontes tales como *S. cerevisiae* o *E. coli*, y, más preferiblemente, células hospedadoras de mamífero tales como células CHO. El HB-EGF puede ser humano de tipo silvestre, un homólogo de mamífero o modificado/mutado. En particular, pueden usarse fragmentos del componente que retiene al menos una parte de la actividad deseada del componente de longitud completa.

En algunas realizaciones, el HB-EGF es HB-EGF humano, y comprende la secuencia de aminoácidos: del acceso a GenBank: L17032.1 GI 348175 o el acceso a GenBank: L17033.1 GI 34817 o el acceso a GenBank: L17032.1 GI 348175, incluyendo particularmente las formas maduras solubles de las proteínas descritas en los mismos.

"Variantes conservadoras de la función" son proteínas en que un residuo aminoacídico dado se ha cambiado sin

alterar la conformación y función globales de la proteína, incluyendo, aunque sin limitación, remplazo de un aminoácido con uno que tiene propiedades similares (tal como, por ejemplo, ácido, básico, hidrófobo y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos básicos hidrófilos y pueden ser intercambiables. Asimismo, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, puede remplazarse con leucina, metionina o valina. Los aminoácidos distintos de los indicados como conservados pueden diferir en una proteína o enzima de modo que puede variar el porcentaje de similitud de secuencia proteínica o aminoácídica entre dos proteínas cuales quiera de función similar y puede ser, por ejemplo, de un 70 % a un 99 %, determinada de acuerdo con un esquema de alineación tal como por el método de agrupación, en el que la similitud se basa en el algoritmo MEGALIGN. Una "variante conservadora de la función" también incluye un polipéptido o enzima que tiene al menos un 60 % de identidad aminoácídica determinada por los algoritmos 20 BLAST o FASTA, preferiblemente al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 85 %, incluso más preferiblemente al menos un 90 %, y aún más preferiblemente un 95 %, y que tiene las mismas propiedades o funciones o sustancialmente similares que la proteína o enzima natural o precursora con la que se compara.

Como se usa en este documento, el término HB-EGF puede incluir variantes, homólogos y ortólogos de las secuencias proporcionadas. Una variante puede ser sustancialmente similar a una secuencia natural, es decir, que difiere en al menos un aminoácido y puede diferir en al menos dos, pero habitualmente no más de aproximadamente diez aminoácidos (dependiendo el número de diferencias del tamaño de la secuencia natural). Los cambios de la secuencia pueden ser sustituciones, inserciones o eliminaciones. Pueden usarse mutaciones por barrido que introducen sistemáticamente alanina, u otros residuos, para determinar los aminoácidos clave a mantener en secuencias variantes. Las sustituciones conservativas de aminoácidos que pueden usarse para proporcionar una secuencia variante de la invención normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: (glicina, alanina); (valina, isoleucina, leucina); (ácido aspártico, ácido glutámico); (asparagina, glutamina); (serina, treonina); (lisina, arginina); y (fenilalanina, tirosina).

La secuencia de aminoácidos de una proteína de origen natural puede alterarse de diversas maneras conocidas en la técnica para generar cambios dirigidos en la secuencia y así proporcionar secuencias variantes de la invención. Dichas variantes normalmente serán variantes funcionalmente conservadas, que difieren, habitualmente en la secuencia, de la proteína natural o precursora correspondiente, pero que aún retienen la actividad biológica y/o función deseada o muestran actividad biológica y/o función potenciada. Pueden usarse diversos métodos conocidos en la técnica para generar cambios dirigidos, por ejemplo, presentación en fagos en combinación con mutaciones aleatorias y dirigidas, introducción de mutaciones por barrido y similares, y proporcionan una secuencia variante de la invención. Se incluyen la adición de His o marcas epitópicas para ayudar en la purificación, como se ejemplifica en este documento. Las enzimas modificadas para proporcionar una característica específica de interés pueden modificarse adicionalmente, por ejemplo, por mutagénesis, reordenamiento de exones, etc., como se sabe en la técnica, seguido de cribado o selección, para optimizar o restaurar la actividad de la enzima, por ejemplo, a niveles de tipo silvestre y así proporcionar otras secuencias variantes de la invención.

El término "HB-EGF" también incluye fragmentos biológicamente activos. Los fragmentos de interés incluyen fragmentos de al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, más habitualmente de al menos aproximadamente 50 aminoácidos contiguos y pueden comprender 100 o más aminoácidos, hasta la proteína completa, y pueden prolongarse adicionalmente para comprender secuencias adicionales.

Las modificaciones de interés en la proteína que no alteran la secuencia primaria, pero proporcionan otras proteínas variantes de la invención incluyen derivatización química de proteínas incluyendo, por ejemplo, acilación, por ejemplo, grupos laurilo, estearilo, miristilo, decilo, etc., PEGilación, esterificación o amidación. Dichas modificaciones pueden usarse para aumentar la resistencia de la enzima a la proteólisis, por ejemplo, por adhesión de cadenas laterales de PEG o grupos laurilo a lisinas superficiales. También se incluyen modificaciones de glucosilación, por ejemplo, las generadas modificando los patrones de glucosilación de una proteína durante su síntesis y procesamiento o en etapas adicionales de procesamiento; por ejemplo, exponiendo la proteína a enzimas que afectan a la glucosilación, tales como enzimas glucosilantes o desglucosilantes de mamífero. También se incluyen secuencias que tienen residuos aminoácídicos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

También son útiles en la práctica de la presente invención y se proporcionan por la presente invención proteínas que se han modificado usando técnicas de biología molecular y/o química para mejorar su resistencia a la degradación proteolítica, la oxidación, etc., y para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacer que sean más adecuadas como agente terapéutico. Por ejemplo, la cadena principal de la proteína puede ciclarse para potenciar la estabilidad (véase Friedler et al. (2000) J. Biol. Chem. 275:23783-23789). Análogos de dichas proteínas incluyen los que contienen residuos distintos de L-aminoácidos de origen natural, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no son de origen natural.

Miméticos de HB-EGF. Los agentes de HB-EGF de interés también incluyen miméticos, por ejemplo, moléculas pequeñas, proteínas, aptámeros y similares, que proporcionan la actividad biológica de HB-EGF. Dichas actividades incluyen la unión de HB-EGF a receptores de EGF y proteoglicanos de sulfato de heparina sobre la superficie celular.

El pro HB-EGF se sintetiza como una proteína precursora transmembranaria individual de tipo I que entonces experimenta procesamiento proteolítico extenso, denominada ectodominio shedding (véanse, por ejemplo, Yan et al., J Cell Biol. 2002;158(2):221-6; Asakura et al. Nat Med. 2002;8(1):35-40; Izumi et al., Embo J. 1998;17(24):7260-72; Nakagawa et al., J Biol Chem. 1996;271(48):30858-63). Esto libera la forma madura soluble de HB-EGF. Las metaloproteinasas (incluyendo ADAM 9, 10, 12, 17) responsables del ectodominio shedding de pro HB-EGF regulan predominantemente la unión de HB-EGF maduro y regulan la activación de los EGFR (véanse Cisse et al., J Biol Chem. 2005; 280(49):40624-31; Peschon et al., Science. 1998;282(5392): 1281-4; Sahin y Blobel FEBS Lett. 2007;581(1):41-4; Sahin et al., J Cell Biol. 2004; 164(5):769-79). El HB-EGF entonces actúa mediante mecanismos tanto dependientes de EGFR como independientes de EGFR. El HB-EGF contiene un dominio de tipo EGF que se cree que es necesario para que los miembros de la familia de EGF se unan a y activen EGFR (Thompson et al., J Biol Chem. 1994;269(4):2541-9).

Los miembros de la familia de EGF pueden inducir señalización yuxtacrina, autocrina, paracrina o endocrina dependiendo del entorno celular porque se escinden de la membrana por metaloproteasas para formar el factor de crecimiento soluble maduro (Singh y Harris, Cell Signal. 2005;17(10):1183-93). Hay cuatro miembros identificados de la familia de EGFR (HER1, HER2, HER3 y HER4). Son tirosina cinasas relacionadas estructuralmente con un solo dominio transmembranario y un dominio dentro del citoplasma (Plowman, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(5):1746-50; Taylor et al., Semin Cell Dev Biol. 2014). Los miembros de la familia de EGF diferente actividad de unión a la familia de EGFR. A diferencia de EGF, HB-EGF se une tanto a HER1 como a HER4, así como a betacelulina y neuregulina2. Véanse Higashiyama et al., Science. 1991;251(4996):936-9; Chang et al., Nature. 1997;387(6632):509-12; Carraway et al., Nature. 1997;387(6632):512-6; Shing et al., Science. 1993; 259(5101):1604-7. El HB-EGF también disminuye los marcadores epiteliales tales como queratinas 1, 5, 10 y 14 mientras aumentan los genes de motilidad celular tales como SNA1, ZEB1, COX-2 y MMP1 (véase Stoll et al., J Invest Dermatol. 2012;132(9):2148-57).

Una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de HB-EGF, o un agente que proporciona actividad de HB-EGF es esa dosis que, cuando se aplica durante un periodo de tiempo, potencia la curación de una perforación de la TM crónica.

La formulación, es decir, gotas líquidas, gel de liberación mantenida, etc., puede comprender HB-EGF o actividad equivalente de un agente que proporciona actividad de HB-EGF, a una concentración de al menos aproximadamente 1 ng/ml, al menos aproximadamente 10 ng/ml, al menos aproximadamente 100 ng/ml, al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 10 µg/ml, al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 200 µg/ml, al menos aproximadamente 500 µg/ml, al menos aproximadamente 750 µg/ml, al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos aproximadamente 5 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml, al menos aproximadamente 100 mg/ml, y hasta aproximadamente 10 mg/ml, hasta aproximadamente 25 mg/ml, hasta aproximadamente 50 mg/ml, hasta aproximadamente 100 mg/ml, hasta aproximadamente 500 mg/ml. Una formulación para liberación mantenida puede proporcionarse a una concentración inicial mayor que una formulación para administración repetida.

El volumen de formulación es normalmente el que se requiere para proporcionar contacto útil con la membrana timpánica, por ejemplo, hasta aproximadamente 5 µl, hasta aproximadamente 10 µl, hasta aproximadamente 25 µl, hasta aproximadamente 35 µl, hasta aproximadamente 50 µl, hasta aproximadamente 75 µl, hasta aproximadamente 100 µl, hasta aproximadamente 250 µl, hasta aproximadamente 375 µl, hasta aproximadamente 500 µl. Como alternativa, puede proporcionarse un gotero en que la dosis sea una gota, dos gotas, tres gotas, donde, como se sabe en la técnica, una gota es de aproximadamente 50 µl de volumen.

Una cantidad terapéuticamente eficaz proporciona una respuesta clínicamente significativa en un sujeto, en que, por ejemplo, se promueve la curación de la perforación de la membrana timpánica. Como alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para mejorar una condición de curación de heridas clínicamente significativa en el hospedador.

Una formulación o dispositivo de liberación mantenida o prolongada puede diseñarse para que tenga $t_{1/2}$ para la liberación del fármaco, es decir, la cantidad de tiempo para liberar la mitad del principio activo, que es apropiada para la dosis de inicio y la concentración local deseada, por ejemplo, un $t_{1/2}$ de aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 48 horas, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 10 días, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, etc.

Una formulación distinta de liberación mantenida o prolongada, por ejemplo, gotas óticas líquidas, etc., puede administrarse a intervalos apropiados para el mantenimiento de una dosis eficaz, por ejemplo, aproximadamente cada 3 horas, aproximadamente cada 4 horas, aproximadamente cada 6 horas, aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 18 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 48 horas, etc.

Como alternativa, una dosis eficaz de HB-EGF, o un agente que proporciona actividad de HB-EGF, es una cantidad que provoca una curación más rápida de una perforación o herida con respecto a la curación en ausencia del

agente. Una cantidad eficaz también podría indicar una cantidad o dosis suficiente para aumentar los niveles locales y/o sistémicos de HB-EGF, por ejemplo, hasta aproximadamente un 10 por ciento, preferiblemente en aproximadamente un 50 por ciento y más preferiblemente en aproximadamente un 100 por cien del nivel encontrado antes de la administración del principio activo o fármaco.

5 El periodo de tiempo para el contacto con HB-EGF puede ser de hasta un día, hasta 2 días, hasta 3 días, hasta 5 días, hasta 7 días, hasta 10 días, hasta 12 días, hasta 2 semanas, hasta 3 semanas o más de acuerdo con las necesidades del individuo.

10 Un "control", "valor de control" o "valor de referencia" en un ensayo es un valor usado para detectar una alteración en, por ejemplo, la curación de una membrana timpánica perforada herida de la piel, o cualquier otro ensayo descrito en este documento. Por ejemplo, cuando se estudia la curación de una perforaciones de la membrana timpánica, el efecto inhibidor/estimulador de un agente puede evaluarse comparando la curación de una herida o perforación con la de un control. El control o referencia puede ser, por ejemplo, un valor de referencia predeterminado, o puede
15 determinarse experimentalmente. Por ejemplo, en dicho ensayo, un control o referencia puede ser la curación de una herida o perforación similar en un animal no expuesto al fármaco o principio activo, o un animal tratado con el mismo fármaco o principio activo que no tiene capacidad alterada de curación de heridas.

"Inhibidor" incluye una composición o sustancia natural o sintética que evita la acción de HB-EGF, que reduce el nivel de HB-EGF o su receptor, que bloquea la señalización intracelular cuando el HB-EGF activa su receptor afín; etc. Los inhibidores incluyen ácidos nucleicos, por ejemplo, de antisentido, ARNip, ribozimas, etc.; anticuerpos
20 específicos contra HB-EGF o su receptor afín, inhibidores de molécula pequeña, etc. En algunas realizaciones, el inhibidor es OSU8-1 / KB-R7785 (véase et al. (2000) JCB 151:209-219, incorporado específicamente en este documento por referencia). Se conocen en la técnica anticuerpos específicos contra HB-EGF, y reactivos de ARNip, ARNhc y están disponibles en el mercado (por ejemplo, véase Santa Cruz Biotechnology, o Bertram et al. (2009) Mech. Ageing Dev. 130: 657-669.

Como alternativa, los anticuerpos monoclonales pueden generarse por métodos convencionales para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos
30 continuos de líneas celulares. Ejemplos incluyen la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, Nature, 256:495-497 (1975)), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., Immunology Today 4:72 (1983)), y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96 (1985)). Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de Estados Unidos n.º 4 946 778) pueden adaptarse para
35 producir anticuerpos monocatenarios contra productos polipeptídicos inmunógenos de esta invención. Además, pueden usarse ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados contra productos polipeptídicos inmunógenos de esta invención.

"Estructura", cuando se refiere al suministro de HB-EGF o inhibidores de HB-EGF incluye, aunque sin limitación,
40 cualquier armazón, polímero, construcción, confección, montaje, soporte, disco, bloque, recubrimiento, capa, pilar, refuerzo, dispositivo, espuma. También incluye el uso de tejido del propio paciente, resto o injerto para que actúen como método de suministro. La estructura puede aplicarse en su estado conformado o puede aplicarse como un líquido viscoso que entonces forma un estado sólido o permanece en forma líquida.

"Vehículo", cuando se refiere al suministro de HB-EGF o inhibidores de HB-EGF incluye, aunque sin limitación,
45 cualquier polímero, agente, vehículo, instrumento, operación, medio, aparato, dispositivo, artilugio, artefacto, herramienta, complemento, útil o utensilio. El término "vehículo" también se refiere a cualquier vehículo o excipiente soluble incluyendo, aunque sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol y combinaciones de los mismos. La formulación debe adecuarse al modo de administración. Ejemplos de
50 formulaciones adecuadas, conocidas en la técnica, pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences (última edición), Mack Publishing Company y Easton, Pa.

Como se usa en este documento, "aproximadamente" o indicará en un 50 por ciento, preferiblemente en un 20 por
55 ciento, más preferiblemente en un 5 por ciento, de un valor o intervalo dado.

Un valor que es "sustancialmente diferente" de otro valor puede indicar que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los dos valores. Puede usarse cualquier método estadístico adecuado conocido en la técnica para
evaluar si las diferencias son significativas o no.

60 Diferencia "estadísticamente significativa" significa una significación determinada a un intervalo de confianza de al menos un 90 %, más preferiblemente a un intervalo de confianza del 95 %.

De acuerdo con la presente invención, pueden emplearse técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican
65 completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Glover (DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes I y II, 1985);

Hames y Higgins (Nucleic Acid Hybridization, 1985); Hames y Higgins (Transcription And Translation, 1984); Freshney (Animal Cell Culture, 1986); Perbal (A Practical Guide To Molecular Cloning, 1984); y Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1994).

5 Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones que pueden usarse en el suministro de HB-EGF, y agente de HB-EGF, o inhibidor de HB-EGF u otras composiciones de acuerdo con la invención incluyen, aunque sin limitación, formas farmacéuticas inyectables, infusiones, gel, pastas, bálsamos, ceras, lociones, cremas para la piel y otros diversos formatos para administración tópica conocidos en la técnica. Las composiciones también pueden suministrarse de forma local en forma de un polvo o solución pulverizada sobre la herida. Como alternativa, las composiciones de la invención pueden estar presentes en apósito para heridas, almohadillas, tiritas, gasas u otros medios aplicados sobre una herida, a partir de los que se transfieren a la zona de la herida. Dichos dispositivos también incluyen dispositivos de liberación lenta, que liberan de forma continua HB-EGF o inhibidor de HB-EGF u otros componentes durante un periodo prolongado de tiempo. Con respecto a la curación de las membranas timpánicas, la administración de la composición usando un gel, pulverización o aplicación en gotas mediante el canal del oído externo, es una realización preferida. Las formas farmacéuticas inyectables o infusiones comprenden una solución de HB-EGF o inhibidor de HB-EGF en un líquido farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, solución salina isotónica, agua estéril o sistemas acuosos de tampón. El vehículo de suministro también puede incluir cualquier estructura que pase a través de la herida. En el caso de la membrana timpánica incluye, aunque sin limitación, tubos de ventilación o catéteres.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir, dependiendo de la formulación deseada, vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables atóxicos, que se definen como vehículos habitualmente usados para formular composiciones farmacéuticas para administración a animales o seres humanos. El diluyente se selecciona para que no afecte a la actividad biológica del principio activo. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, agua tamponada, solución salina fisiológica, PBS, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la composición farmacéutica o formulación puede incluir otros vehículos, adyuvantes o estabilizantes atóxicos, no terapéuticos, no inmunógenos, excipientes y similares. Las composiciones también pueden incluir sustancias adicionales para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad, agente humectante y detergentes.

La composición también puede incluir cualquiera de diversos agentes estabilizantes, tal como un antioxidante, por ejemplo. Cuando la composición farmacéutica incluye un polipéptido, el polipéptido puede formar complejos con diversos compuestos bien conocidos que potencian la estabilidad *in vivo* del polipéptido, o potencia de otro modo sus propiedades farmacológicas (por ejemplo, aumenta la semivida del polipéptido, reduce su toxicidad, potencia la solubilidad o la captación). Ejemplos de dichas modificaciones o agentes de formación de complejos incluyen sulfato, gluconato, citrato y fosfato. Los polipéptidos de una composición también pueden formar complejos con moléculas que potencian sus atributos *in vivo*. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, carbohidratos, poliaminas, aminoácidos, otros péptidos, iones (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, magnesio, manganeso) y lípidos.

Pueden encontrarse directrices adicionales con respecto a las formulaciones que son adecuadas para diversos tipos de administración en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17.^a ed. (1985). Para una breve revisión de los métodos para suministro de fármacos, véase, Langer, Science 249:1527-1533 (1990).

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse para tratamientos terapéuticos. La toxicidad y la eficacia terapéutica del ingrediente activo pueden determinarse de acuerdo con procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares y/o animales experimentales, incluyendo, por ejemplo, determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de DL₅₀/DE₅₀. Se prefieren compuestos que muestran índices terapéuticos grandes.

Los datos obtenidos de estudios de cultivo celular y/o en animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificaciones para seres humanos. La dosificación del ingrediente activo normalmente está dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con baja toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada.

Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden administrarse en diversas diferentes maneras. Ejemplos incluyen administrar una composición que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable mediante vía tópica, por ejemplo, sobre la superficie de la TM, membrana intratimpánica, membrana transtimpánica, etc.

Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones de inyección estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes.

Los componentes usados para formular las composiciones farmacéuticas son preferiblemente de alta pureza y están sustancialmente libres de contaminantes potencialmente dañinos (por ejemplo, al menos calidad de alimento nacional (NF), en general al menos calidad analítica y más normalmente al menos calidad farmacéutica). Además, las composiciones destinadas a uso *in vivo* habitualmente son estériles. En la medida en que un compuesto dado debe sintetizarse antes de su uso, el producto resultante está normalmente libre sustancialmente de cualquier agente potencialmente tóxico, particularmente cualquier endotoxina, que pueda estar presente durante el proceso de síntesis o purificación. Las composiciones para administración parental también son estériles, sustancialmente isotónicas y se preparan en condiciones GMP.

La cantidad eficaz de una composición terapéutica a dar a un paciente particular dependerá de diversos factores, que serán varios de ellos diferentes de un paciente a otro. Un médico competente será capaz de determinar una cantidad eficaz de un agente terapéutico a administrar a un paciente para promover la curación de una perforación de TM crónica. Utilizando los datos en animales de DE₅₀ y otra información disponible, un médico puede determinar la dosis segura para un individuo, dependiendo de la vía de administración. Las composiciones que se eliminan rápidamente del organismo pueden administrarse a dosis mayores, o en dosis repetidas, para mantener una concentración terapéutica. Utilizando las habilidades habituales, el médico competente será capaz de optimizar la dosificación de una composición terapéutica o de imágenes particular durante el transcurso de ensayos clínicos rutinarios. Normalmente, la dosificación será de 0,001 a 100 miligramos de agente por kilogramo de peso corporal del sujeto.

La formulación, es decir, gotas líquidas, gel de liberación mantenida, etc., puede comprender HB-EGF o actividad equivalente de un agente que proporciona actividad de HB-EGF, a una concentración de al menos aproximadamente 1 µg/ml, al menos aproximadamente 10 µg/ml, al menos aproximadamente 100 µg/ml, al menos aproximadamente 200 µg/ml, al menos aproximadamente 500 µg/ml, al menos aproximadamente 750 µg/ml, al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos aproximadamente 5 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 50 mg/ml, al menos aproximadamente 100 mg/ml, y hasta aproximadamente 10 mg/ml, hasta aproximadamente 25 mg/ml, hasta aproximadamente 50 mg/ml, hasta aproximadamente 100 mg/ml, hasta aproximadamente 500 mg/ml. Una formulación para liberación mantenida puede proporcionarse a una concentración inicial mayor que una formulación para administración repetida. La cantidad terapéuticamente activa puede variar de acuerdo con factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo. La pauta posológica puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, puede administrarse más de una dosis divididas al día o la dosis puede reducirse proporcionalmente según se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

El volumen puede proporcionarse de aproximadamente 1 a 3 gotas, o si se administra en una forma sólida o semisólida puede ser una composición preparada de volumen establecido, por ejemplo, de hasta aproximadamente 5 µ hasta aproximadamente 500 µl. de volumen. El dispositivo puede conformarse en cualquier forma o conformación que facilitará su uso en la zona diana para promover o inhibir la curación. La geometría de una forma sólida o semisólida es cualquiera que sea apropiada para el suministro a la membrana timpánica, por ejemplo, una esfera, esfera aplanada, película, parche, disco de grosor uniforme o no uniforme y similares.

La formulación puede administrarse al sujeto en una serie de más de una administración. Para composiciones terapéuticas, a veces se requerirá administración periódica regular (por ejemplo, cada 4 horas, cada 6 horas, cada 12 horas, cada 24 horas, etc.), por ejemplo, cuando la formulación se proporciona como un líquido para administración tópica.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica, transcutánea y transdérmica pueden prepararse mediante el uso de agentes de suspensión apropiados, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las formulaciones tópicas también pueden utilizarse con un medio para proporcionar administración continua, por ejemplo, incorporación en gránulos de liberación lenta o parches de liberación controlada.

El principio activo también puede formularse en un gel biocompatible, que es un gel que puede aplicarse de forma tópica o implantarse (por ejemplo, para proporcionar liberación mantenida en un sitio de tratamiento). Los geles adecuados y métodos para formular un compuesto deseado para suministro usando un gel son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5 801 033; 5 827 937; 5 700 848; y MATRIGEL™). Un ejemplo de esta realización es el suministro del HB-EGF o inhibidor de HB-EGF a través del canal del oído mediante un líquido o dispositivo biocompatible que entonces se solidifica dentro del canal del oído adyacente a la membrana timpánica y suministra el HB-EGF o el inhibidor de HB-EGF según se disuelve el vehículo a lo largo del tiempo. El vehículo puede colocarse en el canal, en la membrana timpánica o dentro del oído medio.

Las formulaciones pueden proporcionarse en una forma farmacéutica unitaria, donde la expresión "forma farmacéutica unitaria", se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de proteasa en una cantidad calculada suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas farmacéuticas unitarias de la presente invención dependen del

complejo particular empleado y el efecto a conseguir, y la farmacodinámica asociada con cada complejo en el hospedador.

Aspectos de la invención incluyen composiciones de hidrogel copolimérico reticulado que comprenden una dosis eficaz de HB-EGF absorbido, como se describe anteriormente. Las composiciones de hidrogel copolimérico reticulado de la invención de acuerdo con determinadas realizaciones incluyen un copolímero de quitosano y un poliéster y un reticulante hidrolizable. En determinadas realizaciones, los hidrogeles reticulados incluyen además fibrinógeno. En algunas de dichas realizaciones, los hidrogeles copoliméricos reticulados incluyen un copolímero de quitosano y un poliéster y un reticulante hidrolizable, por ejemplo, poliláctido. Los hidrogeles de quitosano-poliláctido reticulados pueden tener una relación de quitosano a poliláctido que varía de 1:1 a 10:1, tal como de 1:1 a 8:1, donde en determinados casos, los hidrogeles de quitosano-poliláctido reticulados tienen una relación de quitosano a poliláctido de 8:1. El porcentaje ponderal de quitosano en hidrogeles copoliméricos reticulados de interés puede variar de un 1 % a un 99 % y el porcentaje ponderal del poliéster puede variar también de un 1 % a un 99 %. En algunas realizaciones, los hidrogeles copoliméricos incluyen uno o más enlaces de éter y amida entre los componentes de quitosano y de poliéster. Los hidrogeles copoliméricos reticulados de interés también incluyen un reticulante. En algunas realizaciones, el reticulante está configurado para hidrolizarse en condiciones fisiológicas. En algunas realizaciones, el reticulante puede ser un reticulante de acrilato, tal como un reticulante de metacrilato. El reticulante hidrolizable puede estar presente en el hidrogel copolimérico reticulado en una cantidad que varía de un 0,05 % a un 10 % p/p de reticulante, tal como de un 0,1 % a un 9 % p/p, tal como de un 0,5 % a un 8 % p/p, tal como de un 0,75 % a un 7 % p/p e incluyendo de un 1 % a un 5 % p/p. Dependiendo del protocolo empleado para reticular los presentes hidrogeles, puede variar la densidad de reticulación. En determinados casos, el hidrogel se reticula por reticulación química. Por tanto, la densidad de reticulación puede variar dependiendo del tipo y concentración de agente reticulante químico empleado. Como alternativa, el hidrogel puede fotorreticularse y la densidad de reticulación puede variar dependiendo de la intensidad de radiación electromagnética en contacto con la composición de hidrogel, así como la duración de la irradiación. En algunas realizaciones de la invención, la densidad de reticulación de los presentes hidrogeles copoliméricos reticulados puede variar, tal como de 1×10^{-5} moles/cm³ a 1×10^{-3} moles/cm³. Por consiguiente, dependiendo de la cantidad de reticulación, la relación de hinchamiento de los presentes hidrogeles puede variar, variando tal como de 1 a 35. Asimismo, el módulo de compresión de los hidrogeles puede variar, variando tal como de 1 kPa a 35 kPa. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional en trámite con la presente PCT/US2014/033512, incorporada específicamente en este documento por referencia.

Una formulación de hidrogel incluye opcionalmente fibrinógeno. El fibrinógeno puede incorporarse en la composición de hidrogel antes o después de haber reticulado el hidrogel. Por ejemplo, en algunos casos, se añade fibrinógeno a la composición de precursor de hidrogel. El fibrinógeno puede estar presente en el hidrogel copolimérico reticulado en una cantidad que varía de un 0,05 % a un 50 % p/p de fibrinógeno, tal como de un 0,1 % a un 45 % p/p, tal como de un 0,5 % a un 40 % p/p, tal como de un 0,75 % a un 35 % p/p, tal como de un 1 % a un 30 %, tal como de un 2 % a un 20 %, tal como de un 5 % a un 15 % e incluyendo un 10 % p/p.

Los hidrogeles pueden sintetizarse para conseguir un determinado perfil de liberación. En algunas realizaciones, los hidrogeles copoliméricos reticulados proporcionados por la invención se configuran para liberar HB-EGF o un agente de HB-EGF en condiciones fisiológicas a una tasa de liberación sustancialmente de orden cero. En otras realizaciones, los presentes hidrogeles copoliméricos reticulados se configuran para liberar HB-EGF o un agente de HB-EGF en condiciones fisiológicas a una tasa de liberación sustancialmente de primer orden. En otras realizaciones más, los presentes hidrogeles copoliméricos reticulados se configuran para liberar HB-EGF o un agente de HB-EGF en condiciones fisiológicas a una tasa de liberación sustancialmente de segundo orden. En determinadas realizaciones, los presentes hidrogeles copoliméricos reticulados se configuran para que tengan un perfil de liberación que incluye: 1) un primer periodo donde HB-EGF o un agente de HB-EGF se libera del hidrogel a una primera tasa predeterminada; y 2) un segundo periodo donde HB-EGF o un agente de HB-EGF se libera del hidrogel a una segunda tasa predeterminada.

En algunas realizaciones de la invención, la relación de quitosano al poliéster en el hidrogel puede variar, variando en algunas entre 10:1 y 9,5:1; 9,5:1 y 9:1; 9:1 y 8,5:1; 8,5:1 y 8:1; 8:1 y 7,5:1; 7,5:1 y 7:1; 7:1 y 6,5:1; 6,5:1 y 6:1; 6:1 y 5,5:1; 5,5:1 y 5:1; 5:1 y 4,5:1; 4,5:1 y 4:1; 4:1 y 3,5:1; 3,5:1 y 3:1; 3:1 y 2,5:1; 2,5:1 y 2:1; 2:1 y 1,5:1; 1,5:1 y 1:1 o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la relación en masa del componente de quitosano al componente de poliéster puede variar entre 10:1 y 1:1, tal como 8:1 y 1:1, tal como 5:1 y 1:1, tal como 4:1 y 1:1 e incluyendo entre 2:1 y 1:1. En determinados casos, la relación de quitosano al poliéster es 1:1. En otras realizaciones, la relación de quitosano al poliéster puede variar, variando en algunas realizaciones entre 1:1 y 1:1,5; 1:1,5 y 1:2; 1:2 y 1:2,5; 1:2,5 y 1:3; 1:3 y 1:3,5; 1:3,5 y 1:4; 1:4 y 1:4,5; 1:4,5 y 1:5; 1:5 y 1:5,5; 1:5,5 y 1:6; 1:6 y 1:6,5; 1:6,5 y 1:7; 1:7 y 1:7,5; 1:7,5 y 1:8; 1:8 y 1:8,5; 1:8,5 y 1:9; 1:9 y 1:9,5; 1:9,5 y 1:10 o un intervalo de los mismos. Por ejemplo, la relación de quitosano al poliéster puede variar entre 1:1 y 1:10, tal como 1:1 y 1:8, tal como 1:1 y 1:5, tal como 1:1 y 1:4 e incluyendo entre 1:1 y 1:2.

Los hidrogeles copoliméricos reticulados pueden ser de 1 kDa o más, tal como de 2 kDa o más, tal como de 3 kDa o más, tal como de 5 kDa o más, tal como de 10 kDa o más, tal como de 15 kDa o más, tal como de 20 kDa o más, tal como de 25 kDa o más, tal como de 30 kDa o más, tal como de 40 kDa o más, tal como de 50 kDa o más, tal como

de 60 kDa o más e incluyendo de 75 kDa o más.

Después de haber preparado las composiciones farmacéuticas, pueden colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Para la administración de una composición de la invención, dicho etiquetado incluiría la cantidad, frecuencia y método de administración.

Formulaciones de combinación

Las formulaciones de la invención pueden comprender una dosis eficaz de HB-EGF en combinación con un segundo principio activo, particularmente otros agentes antimicrobianos. Por ejemplo, otros agentes de interés incluyen una amplia diversidad de antibióticos, como se sabe en la técnica. Las clases de antibióticos incluyen penicilinas, por ejemplo, penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, *etc.*; penicilinas en combinación con inhibidores de β -lactamasa, cefalosporinas, por ejemplo, cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactama, *etc.*; carbapenems; monobactams; aminoglucósidos; tetraciclinas; macrólidos; lincomicina; polimixinas; sulfonamidas; quinolonas; cloranfenicol; metronidazol; espectinomicina; trimetoprim; vancomicina; *etc.* Pueden incluirse agentes antivíricos, por ejemplo, aciclovir, ganciclovir, *etc.*

Las citocinas y factores de crecimiento también encuentran uso en combinación con HB-EGF, por ejemplo, factores de crecimiento, tal como el factor de crecimiento transformante (TGF)- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), VEGF, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), endotelina-1, factor de crecimiento de queratinocitos y similares. Véase, por ejemplo, Steed, D. et al., J. Am. Coll. Surg. 183:61-64 (1996); Richard, J. et al., Diabetes Care 18: 64--69 (1995); Steed, D., J. Vasc. Surg. 21:71-78 (1995); Kelley, S. et al., Proc. Soc. Exp. Biol. 194:320-326 (1990).

Métodos de uso

De acuerdo con la invención, la curación de heridas de una perforación crónica de la membrana timpánica se mejora proporcionando o potenciando los niveles de HB-EGF. Esto puede conseguirse de varias maneras diferentes. Por ejemplo, un paciente puede tratarse con una cantidad eficaz de un principio activo tal como, por ejemplo, un fármaco, hormona, citocina, anticuerpo u otro compuesto que regule por aumento la expresión de HB-EGF; reduzca la degradación de HB-EGF; o aumente los niveles locales o sistémicos de HB-EGF o un homólogo o derivado de HB-EGF. También pueden administrarse ácidos nucleicos que codifican HB-EGF con fines terapéuticos.

Normalmente, una formulación que comprende una proteína de HB-EGF, por ejemplo, la forma soluble de HB-EGF humano, se administra por vía tópica a un individuo que padece una perforación de la TM crónica mediante el canal del oído externo, durante un periodo de tiempo suficiente para cerrar sustancialmente la perforación. El sujeto humano o no humano puede padecer o no una afección que altera o ralentiza la curación de la perforación de la membrana timpánica.

La invención proporciona composiciones de HB-EGF o de inhibidor de HB-EGF, que, cuando se administran en una cantidad eficaz, provocan un nivel aumentado o disminuido de HB-EGF en la zona de la herida de un sujeto. Por ejemplo, para la aceleración de la curación de la membrana timpánica, puede aplicarse una composición que comprende HB-EGF a la zona que rodea una perforación de la membrana timpánica. También puede aplicarse un inhibidor de HB-EGF para inhibir la curación de heridas normal o excesiva. En el caso de composiciones de HB-EGF, para la aceleración de la curación de la membrana timpánica, puede aplicarse una composición a la zona adyacente o local en una perforación de la membrana timpánica. Pueden aplicarse mediante cualquier fuente o estructura biodegradable o no biodegradable.

En otra realización, el método de la invención se aplica para inhibir la curación de una membrana timpánica perforada en un sujeto. El sujeto humano o no humano puede padecer o no una afección que altera o ralentiza la curación de la perforación de la membrana timpánica. Por ejemplo, dichos métodos pueden aplicarse como remplazo de miringotomía e inserción de tubos de timpanostomía, que se prescriben habitualmente para otitis media crónica, malformación de la membrana del tímpano o la trompa de Eustaquio, síndrome de Down, paladar hendido y barotraumatismo (lesión del oído medio causada por una reducción de la presión del aire), *etc.* Convencionalmente, se inserta un tubo de timpanostomía en la TM y se mantiene durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, hasta un mes, hasta 2 meses, hasta 3 meses, hasta 4 meses, hasta 6 meses o más.

Los métodos también encuentran uso en la generación de un modelo animal que proporcione un modelo clínicamente relevante para afecciones de la membrana del tímpano perforada humana. En dichos modelos, el animal puede ser cualquier animal convencional de laboratorio, por ejemplo roedores, lagomorfos, *etc.*, e incluyendo sin limitación ratones, ratas, cobayas, conejos, gatos, perros, primates no humanos; y similares.

En dichas realizaciones, se administra una dosis eficaz de un inhibidor del ligando de EGFR shedding, habitualmente por contacto tópico con la membrana timpánica, para crear una perforación de la TM. En algunas de dichas realizaciones, inicialmente puede hacerse una pequeña perforación, por ejemplo, un área de aproximadamente 0,1 a 10 mm², de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 mm², de aproximadamente 0,1 a

2,5 mm², de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 mm². Después de la perforación inicial, la herida se pone en contacto con una dosis eficaz de un inhibidor de HB-EGF, en una formulación y durante un periodo de tiempo como se proporciona en este documento. Una dosis activa del inhibidor puede mantenerse durante la cantidad de tiempo que se desee la perforación.

Kits

Otro aspecto de la invención proporciona un kit para el tratamiento de la perforación crónica de la TM. El kit incluye una formulación que proporciona una dosis eficaz de HB-EGF, por ejemplo, en forma de gotas, dispositivos, formulaciones y similares. El kit también puede incluir un dispositivo de suministro, por ejemplo, dosificador de gotas óticas, jeringa para el suministro de una formulación, jeringa de doble cilindro para suministrar una formulación de dos partes; y similares. El kit también puede comprender instrucciones de uso.

Como alternativa, puede proporcionarse un kit para generar una perforación crónica de la TM. El kit incluye una formulación que proporciona una dosis eficaz de un inhibidor de HB-EGF, por ejemplo, en forma de gotas, dispositivos, formulaciones y similares. El kit también puede incluir un dispositivo de suministro, por ejemplo, dosificador de gotas óticas, jeringa para el suministro de una formulación, jeringa de doble cilindro para suministrar una formulación de dos partes; y similares. El kit también puede comprender instrucciones de uso. El kit puede comprender además una aguja estéril o lanceta para generar una perforación inicial en la TM.

Ejemplo 1

Inhibición de HB-EGF

El HB-EGF es crucial para la curación de heridas epidérmicas en un modelo de membrana timpánica. La intensidad de la señal normalizada de factor de crecimiento de tipo HB-EGF después de la perforación de la membrana timpánica en ratas muestra una regulación por aumento de 8,5 veces del factor de crecimiento de tipo HB-EGF. En este documento se muestra que la inhibición experimental de la actividad de HB-EGF evita que una perforación de la membrana timpánica se cure.

El ligando de EGFR shedding puede inhibirse para crear un modelo de perforación de membrana timpánica crónica. Se crearon perforaciones subtotales en la porción tensa de las TM en 20 ratones usando una aguja curvada. OSU8.1 (10 mM), un inhibidor selectivo de HB-EGF (véase Tokumaru et al., (2000) J. Cell Biol.), se inyectó en espuma de gel (colocado a través de y sobre la perforación) durante siete días. Los ratones se sacrificaron en puntos temporales (día 2, 7, 14, 30, 44, 60 y 90) para observar los efectos sobre la migración de queratinocitos. El oído contralateral se usó como control con solución salina colocada en espuma de gel. Todas estas se cerraron en 2 semanas. Cinco de siete (71 %) de los oídos de tratamiento estaban abiertos a los tres meses. Se muestran imágenes representativas de perforación de la TM crónica en la figura 5. El tamaño de la perforación era estable durante tres meses (usando ImageJ para calcular el área de perforación como un porcentaje del área de la porción tensa). Se emprendió una cohorte más grande con un 87,9 % (n=58) que tenía perforaciones crónicas a los 3 meses. Nuestro estudio preliminar ha sugerido por primera vez un modelo animal de TM crónica basada en factor de crecimiento reproducible, establecido.

La tabla 1 muestra los resultados de aplicar inhibidor de HB-EGF (OSU8-1) a perforaciones timpánicas agudas en ratones. El 100 % de las perforaciones tratadas con inhibidor de HB-EGF estaban presentes a los dos meses en comparación con un 5 % de los controles y un 71 % estaban presentes a los tres meses en comparación con un 5 % de los controles

TABLA 1

Cohorte	Perforaciones abiertas a los 2 meses	Perforaciones abiertas a los 3 meses
Control	5 % (n=21)	5 % (n=19)
Inhibidor de HB-EGF	100 % (n=9)	71 % (n=7)

Creación de un modelo de animal para otitis media suppurante crónica. Después de crear el modelo de perforación crónica con oclusión de ET, se inocularon dos tipos de bacterias en el oído medio a través de las perforaciones crónicas existentes. A las 2 semanas, se recogió líquido del oído y se envió para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para ensayar la presencia de bacterias. Las bacterias elegidas eran dos de las más habitualmente implicadas en enfermedad crónica del oído, *Streptococcus pneumoniae* de tipo 3 (dosis de 6x10⁶ unidades formadoras de colonias por ml) y *Pseudomonas aeruginosa* (dosis de 6x10⁹ unidades formadoras de colonias por ml).

Ejemplo 2

Tratamiento de perforación de la membrana timpánica crónica

Se demuestra la eficacia del tratamiento con HB-EGF para perforaciones de la TM crónicas.

Un polímero inyectable absorbible biocompatible para el suministro del factor de crecimiento en el canal del oído.

Para tratar la perforación de la TM crónica, es deseable tener un líquido que pueda gotear dentro del oído, que después se endurezca y se reabsorba lentamente durante el tramo de tiempo indicado mientras eluye la medicación. La tasa de degradación del polímero y la tasa de elución del fármaco se pueden ajustar fácilmente de acuerdo con la diana de interés.

Se desarrolló un hidrogel basado en quitosano biodegradable para el suministro de factores de crecimiento para proporcionar un polímero inyectable, biorreabsorbible y biocompatible que pueda aportar un fármaco de elección y después pueda instilarse en el canal del oído. El gel tiene dos componentes líquidos y puede solidificar en unos pocos minutos después de mezclar los dos componentes. Este puede administrarse fácilmente mediante una jeringa de doble orificio. Como alternativa, las soluciones pueden mezclarse con un agente reticulante antes del suministro, e instilarse con una jeringa de un solo orificio.

El hidrogel basado en quitosano recién desarrollado comprende moléculas estructurales de quitosano hidrófilas y cadenas laterales de poliláctido hidrófobas. Puede incorporarse fibrinógeno en las redes copoliméricas para mejorar la afinidad de unión, potenciar la adhesión celular y proporcionar sitios proteolíticamente degradables. La liberación del fármaco desde el hidrogel polimérico varía de acuerdo con las características, tales como afinidad hidrófila, comportamiento de hinchamiento, capacidad de degradación y densidad de reticulación del polímero. Los perfiles de liberación del fármaco de rhBMP-2 desde los hidrogeles basados en quitosano se midieron y el comportamiento de degradación del hidrogel polimérico en diversas condiciones.

La relación específica de quitosano a poliláctido para el gel usado en los presentes ejemplos es 8:1. Además, se incorpora un 10 % p/p de fibrinógeno en la solución propolimérica. La formulación de hidrogel puede solidificar en unos pocos minutos después de mezclarla con un catalizador para la reticulación química. Esta puede administrarse fácilmente mediante una jeringa de doble orificio o con una jeringa de un solo orificio.

Los hidrogeles no son ototóxicos. Los hidrogeles se inyectaron en membranas del tímpano de ratones después de las perforaciones. Un oído se llenó con el polímero, mientras que al oído opuesto no se le administró inyección (control). Los umbrales de respuesta del tronco encefálico auditivo (ABR) y de otoemisión acústica resultante de distorsión (DPOAE) se midieron 60 días después de que ambas membranas del tímpano se perforaran quirúrgicamente en 9 ratones. En el momento en que las membranas del tímpano se curaron espontáneamente, no hubo diferencias en los umbrales auditivos entre los dos lados (figura 2). Los datos muestran que los hidrogeles no son ototóxicos.

El HB-EGF cura las perforaciones crónicas de membrana timpánica. Cuando se trataba una cohorte de perforaciones crónicas en oídos de ratón con 40 µl de un gel que contenía HB-EGF recombinante a una concentración de 5 µg/ml (dosis de liberación mantenida mediante un polímero basado en quitosano bioabsorbible) un 92 % (22 de 24) se curaban, en comparación con un 38 % (10 de 26) de los controles (polímero únicamente) en 4 semanas ($p < 0,01$). La capacidad de superar esta etapa crucial en la curación de heridas crónicas de la TM usando GF para activar el ligando de ectodominio de GFR shedding demuestra su idoneidad para intervención usando un agente bioterapéutico. Este es el primer tratamiento con factor de crecimiento ensayado en un modelo animal de perforación crónica que ha mostrado beneficios significativos sobre el control.

El HB-EGF cura perforaciones crónicas de membrana timpánica con oclusión de las trompas de Eustaquio. Se creó un modelo animal de perforación de la TM crónica y oclusión de ET, como se muestra en la figura 3. Se adaptó un modelo de rata existente de oclusión de ET (véase Herda et al., (2002) Laryngoscope 112:1657-62) al ratón y se ha realizado desde entonces en 80 ratones vivos con éxito. La oclusión de ET se realizó con el modelo de perforación crónica descrito anteriormente. Esto creó una perforación de descarga estéril húmeda a los 3 meses. Este modelo imita la afección humana de perforación crónica combinada con disfunción de ET.

Cuando se trataba una cohorte de ratones con este modelo (perforaciones crónicas y oclusión de ET) con HB-EGF recombinante, 40 µl a una concentración de 5 µg/ml (dosis de liberación mantenida mediante un polímero de quitosano bioabsorbible) un 94 % (18 de 19) se curaban en comparación con un 9 % (2 de 23) de los controles (polímero únicamente) a las 6 semanas ($p < 0,01$). Se muestran imágenes representativas de perforaciones de la TM crónicas curadas o que no se curan en la figura 4. Histológicamente, las perforaciones se cierran con una capa gruesa de queratinocitos, en comparación con los controles con una ausencia de capa de queratinocitos incluso en aquellos pocos casos en que se producía cierre. La capacidad de superar esta etapa crucial en la curación de heridas crónicas de la TM usando HB-EGF para activar el ligando de ectodominio de EGFR shedding en presencia de efusiones del oído medio y oclusión de ET es útil en el tratamiento de pacientes con perforación crónica de la membrana timpánica.

Ensayo en un modelo animal para otitis media supurante crónica. Después de crear el modelo de perforación crónica con oclusión de ET, se inoculó *Pseudomonas aeruginosa* (dosis de 6×10^9 unidades formadoras de colonias por ml) en el oído medio a través de las perforaciones crónicas existentes. A las 2 semanas, se recogió el líquido del oído y

se envió para reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar la presencia de bacterias. Esta PCR positiva validó el modelo de CSOM.

Los ratones entonces se dividieron en dos cohortes. Una recibió polímero únicamente. La otra recibió polímero y HB-EGF a 5 µg/ml (misma dosis usada en los modelos anteriores). El 100 % del grupo de HB-EGF se curó (16 de 16) en comparación con un 41 % (7/17) en el grupo de control ($p < 0,01$). En el grupo de control, la curación también fue diferente cuando se produjo. La TM a menudo está muy delgada y es translúcida en comparación con una TM normal ligeramente opaca. La curación en el grupo de HB-EGF parecía normal. La capacidad de superar todavía esta etapa crucial en la curación de heridas crónicas de la TM usando HB-EGF para activar el ligando del ectodominio de EGFR en el modelo más cercano a CSOM en seres humanos valida el método de tratamiento.

Ejemplo 3

Un método transtimpánico de suministro (figuras 5, 6 y 7). El vehículo para HB-EGF o suministro de HB-EGF se coloca contra o a través de la membrana timpánica insertado a través del canal o mediante la trompa de Eustaquio. Puede retirarse después de un periodo de tiempo, o puede ser biodegradable. El vehículo puede contener un diseño para contenerlo dentro de la membrana timpánica. Este puede ser una collar, abrazadera, brida, ranura o cualquier cambio de anchura o altura. Puede tener más de uno de estos para mantenerlo en su sitio. El vehículo puede estar perforado o tener una luz de cualquier dimensión adecuada. Puede haber numerosas bridas o cualquier anchura y dimensiones que se consideren suficientes o excesivas de las requeridas para que el vehículo se retenga en la membrana timpánica.

En la figura 5 se representa el canal del oído 100; el oído externo 110; y la membrana timpánica 120. También se representa un dispositivo de suministro de fármacos transmembranario 125, que tiene una anchura 130 y una longitud 140.

En la figura 6 se representa una realización alternativa de un dispositivo de suministro transtimpánico 126. El dispositivo tiene una anchura 131 y una longitud 141. El dispositivo 126 comprende uno de un límite externo 150 y un límite interno 155 o ambos, donde el límite tiene una anchura 160.

En las figuras 7A-7B se representa otra realización de un dispositivo de suministro transtimpánico 127. La figura 7A es una vista superior que muestra el canal del oído 100 y la membrana timpánica 120. El dispositivo de suministro 127 tiene una anchura 132 y una longitud 142. El dispositivo comprende una pluralidad de bridas, 170, dispuestas longitudinalmente a lo largo del dispositivo, teniendo las bridas una longitud 171 y una anchura 172. La figura 7B representa una sección transversal del dispositivo.

Ejemplo 4

Dispositivo de suministro intratimpánico

El dispositivo de suministro del factor de crecimiento puede colocarse entre las capas de la membrana timpánica. Si es un vehículo sólido, puede colocarse elevando una o más capas como una lengüeta, después volviendo a colocar la lengüeta tras la colocación. Si es líquido puede inyectarse.

En la figura 8 se representa un dispositivo de suministro intratimpánico 128 a la membrana. El dispositivo se inserta en la membrana timpánica, 120. El dispositivo tiene una anchura 133 y una longitud 143.

Ejemplo 5

Colocación del vehículo como un objeto sólido adyacente a la membrana timpánica (figura 9). El vehículo puede colocarse contra la membrana timpánica y proporcionar una fuente local de HB-EGF o inhibidor de HB-EGF. El vehículo puede colocarse de forma medial o lateral con parte o la totalidad a través de la membrana timpánica. La parte a través de la membrana timpánica puede ser más pequeña, más grande o del mismo tamaño que la perforación si está presente.

En la figura 9 se representa un dispositivo de suministro de factor de crecimiento 128 adyacente a la membrana timpánica 120. El dispositivo tiene una anchura 134 y una longitud 144.

Ejemplo 6

Se muestra un método inyectable de aplicación de factor de crecimiento en la figura 10. La formulación que comprende factor de crecimiento 200 puede suministrarse en el canal del oído 100 para hacer contacto con la membrana timpánica 120 en su superficie lateral y/o media, y puede fluir además en la región de una perforación de la membrana timpánica 121. La formulación puede dosificarse desde una jeringa 210, a través de un tubo de suministro 220. La formulación puede proporcionarse como una sola solución, o como dos soluciones que se mezclan en el momento del suministro.

En la técnica se conocen jeringas de doble cámara y están fácilmente disponibles, por ejemplo, véanse entre otros: jeringa de doble cámara Lyo-Ject®; o una cualquiera de patente de Estados Unidos n.º 5 971 953; solicitudes de patente de Estados Unidos US20030040701; US20140012196; US 20130060232; solicitud internacional WO1999017820A1; etc.

Dichas formulaciones incluyen composiciones que, tras la mezcla, cambian a un estado más viscoso o sólido. Los agentes viscosogénicos incluyen, sin limitación, gelano, N-isopropil acrilamida con acrilato de sodio y n-N-alquilacrilamida, poli(ácido acrílico) con polietilenglicol, poli(ácido metacrílico) con polietilenglicol, CARBOPOL® con hidroxipropil-metilcelulosa, látex de acetato-hidrogenoftalato de celulosa, alginato de sodio o un gel termoendurecible inverso tal como un poloxámero o una poloxamina.

Dichas formulaciones pueden suministrarse a la superficie epidérmica, externa de la membrana timpánica en un estado de tipo líquido, es decir, una forma fluida. Después de la administración, sin embargo, la composición se transforma en un estado de tipo sólido de modo que la composición permanezca en contacto con la membrana timpánica. Como resultado, la composición permanece ubicada contra la membrana timpánica y el agente farmacológico puede transferirse a la membrana timpánica. La composición viscosa o sólida puede ser biodegradable o no biodegradable.

REIVINDICACIONES

1. Un agente que proporciona actividad de factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF) para su uso en el tratamiento de una perforación crónica de la membrana timpánica en un individuo.
2. El agente para el uso de la reivindicación 1, en el que el agente es la proteína HB-EGF.
3. El agente para el uso de la reivindicación 2, en el que el HB-EGF es HB-EGF humano.
4. El agente para el uso de la reivindicación 3, en el que la proteína HB-EGF es una forma soluble de la proteína HB-EGF.
5. El agente para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el tratamiento comprende: poner en contacto un sitio de perforación crónica de la membrana timpánica con una formulación farmacéutica que comprende una dosis eficaz del agente durante un periodo de tiempo suficiente para cerrar sustancialmente la perforación.
6. El agente para el uso de la reivindicación 5, en donde la formulación se pone en contacto con la membrana timpánica afectada durante un periodo de al menos 7 días.
7. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde la formulación se pone en contacto con la membrana timpánica afectada durante un periodo de al menos 2 semanas.
8. El agente para el uso de las reivindicaciones 4 o 5, en donde la formulación se administra al menos diariamente.
9. El agente para el uso de la reivindicación 5, en donde la formulación proporciona liberación mantenida del agente.
10. El agente para el uso de la reivindicación 5, en el que la formulación se proporciona como una solución acuosa, un gel, una loción, un bálsamo, pasta u otro vehículo.
11. El agente para el uso de la reivindicación 5, en donde la formulación se administra mediante una pulverización.
12. El agente para el uso de la reivindicación 5, en donde la formulación se administra como un líquido que después se solidifica para permanecer adyacente a la membrana timpánica.
13. El agente para el uso de la reivindicación 1, en el que la formulación es un gel de liberación mantenida que comprende un copolímero reticulado de quitosano y poliláctido.
14. El agente para el uso de la reivindicación 1, en el que el gel de liberación mantenida comprende además fibrinógeno.
15. El agente para el uso de la reivindicación 1, en donde la formulación se suministra mediante un dispositivo que proporciona liberación mantenida del agente.
16. El agente para el uso de la reivindicación 1, en el que la formulación comprende además al menos un principio activo adicional.
17. Una formulación farmacéutica para su uso en el tratamiento de una perforación crónica de la membrana timpánica, que comprende una dosis eficaz de un agente que proporciona actividad de factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF).
18. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en la que el agente es la proteína HB-EGF.
19. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 18, en la que la proteína HB-EGF es la proteína HB-EGF humana.
20. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 19, en la que la proteína HB-EGF es una forma soluble de la proteína HB-EGF.
21. La formulación farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en donde la formulación se pone en contacto con un sitio de perforación crónica de la membrana timpánica durante un periodo de tiempo suficiente para cerrar sustancialmente la perforación.
22. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 21, en donde la formulación se pone en contacto con el sitio de perforación crónica de la membrana timpánica durante un periodo de la menos 7 días.

23. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 21, en donde la formulación se pone en contacto con el sitio de perforación crónica de la membrana timpánica durante un periodo de la menos 2 semanas.
- 5 24. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 21, en donde la formulación se administra al menos diariamente.
25. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 21, en donde la formulación proporciona liberación mantenida del agente.
- 10 26. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde la formulación se proporciona como una solución acuosa, un gel, una loción, un bálsamo, pasta u otro vehículo.
- 15 27. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde la formulación se administra mediante una pulverización.
28. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde la formulación se administra como un líquido que después se solidifica para permanecer adyacente a la membrana timpánica.
- 20 29. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde la formulación se proporciona como un gel de liberación mantenida que comprende un copolímero reticulado de quitosano y poliláctido.
30. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 29, en donde el gel de liberación mantenida comprende además fibrinógeno.
- 25 31. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde la formulación se suministra mediante un dispositivo que proporciona liberación mantenida del agente.
32. La formulación farmacéutica para el uso de la reivindicación 17, en donde la formulación comprende además al menos un principio activo adicional.

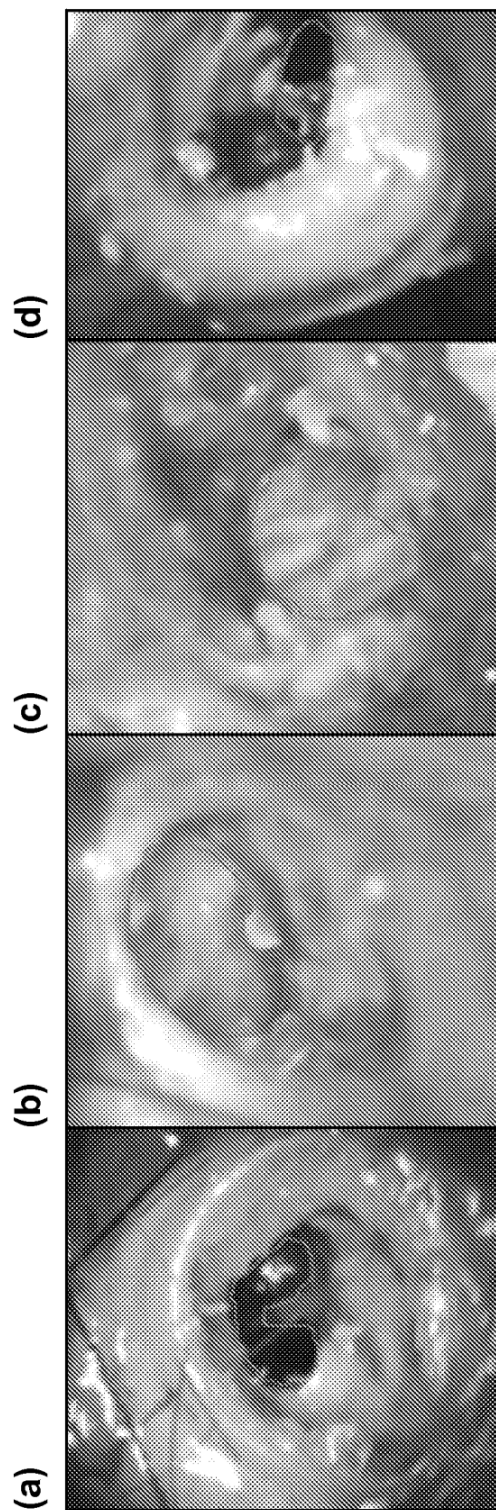


FIG. 1

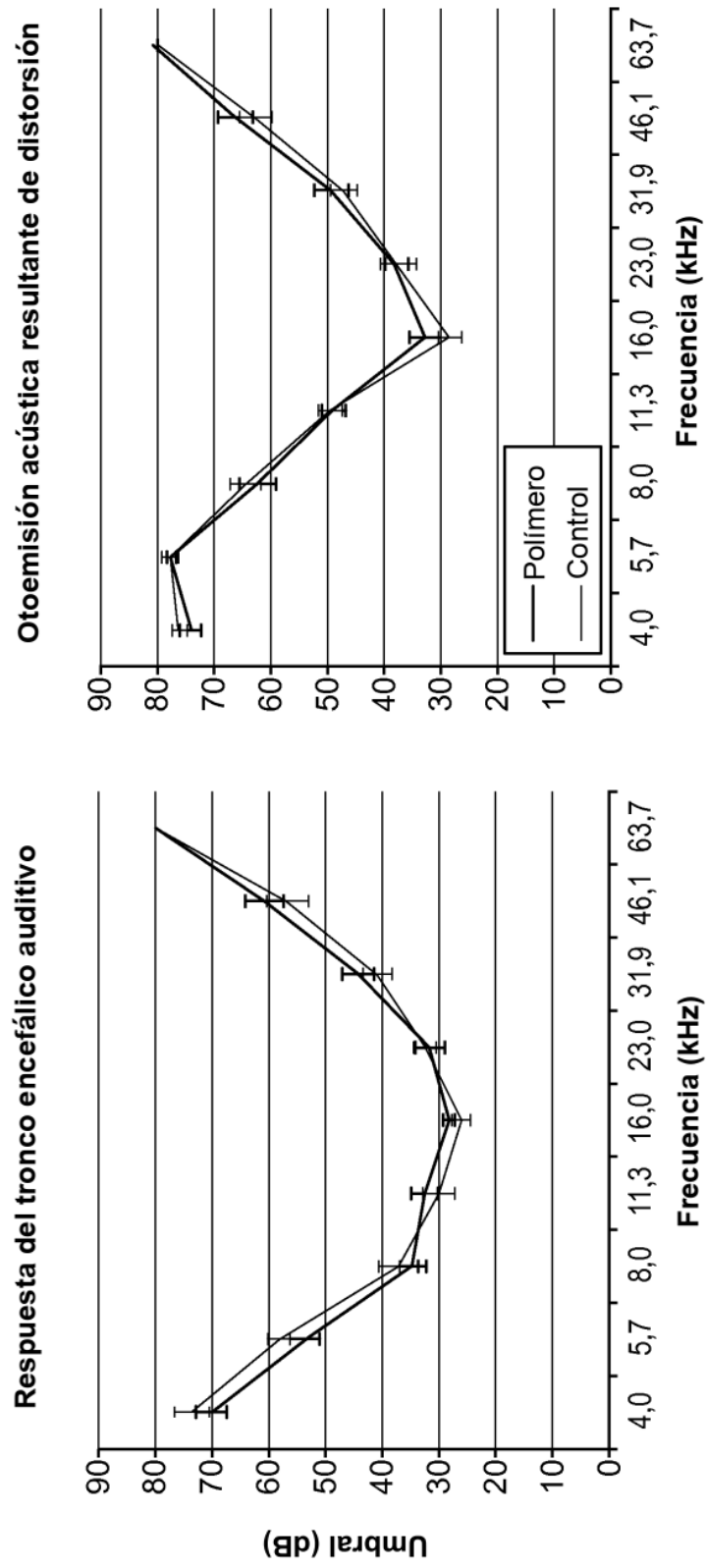


FIG. 2

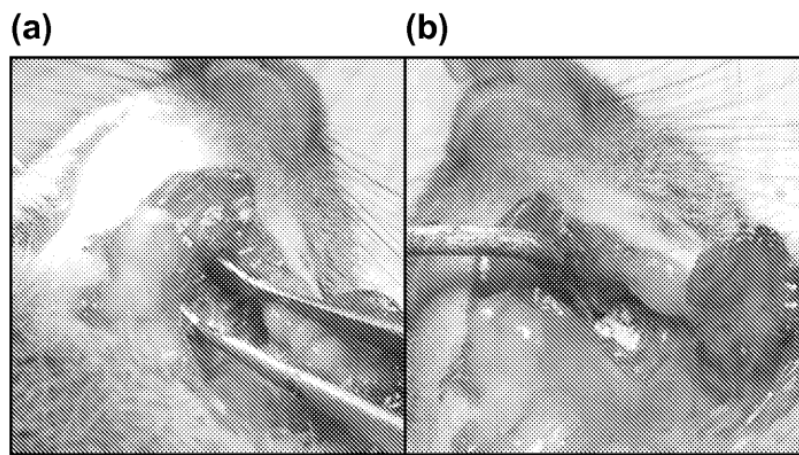


FIG. 3

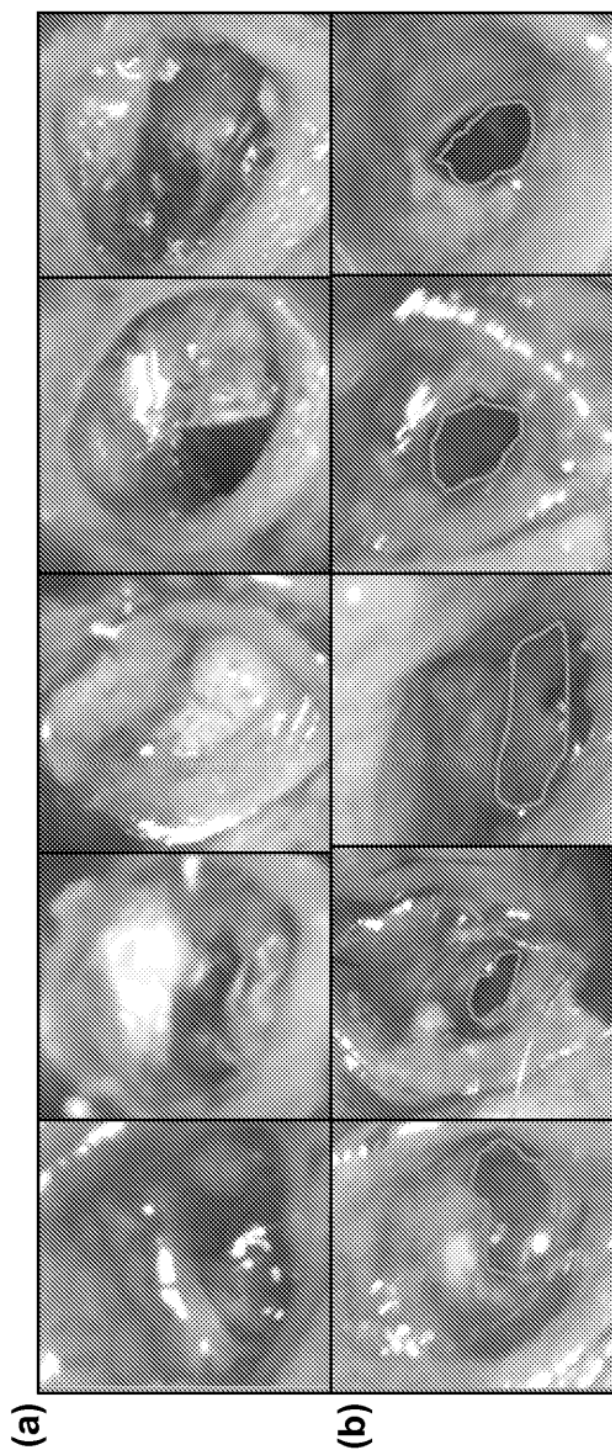


FIG. 4

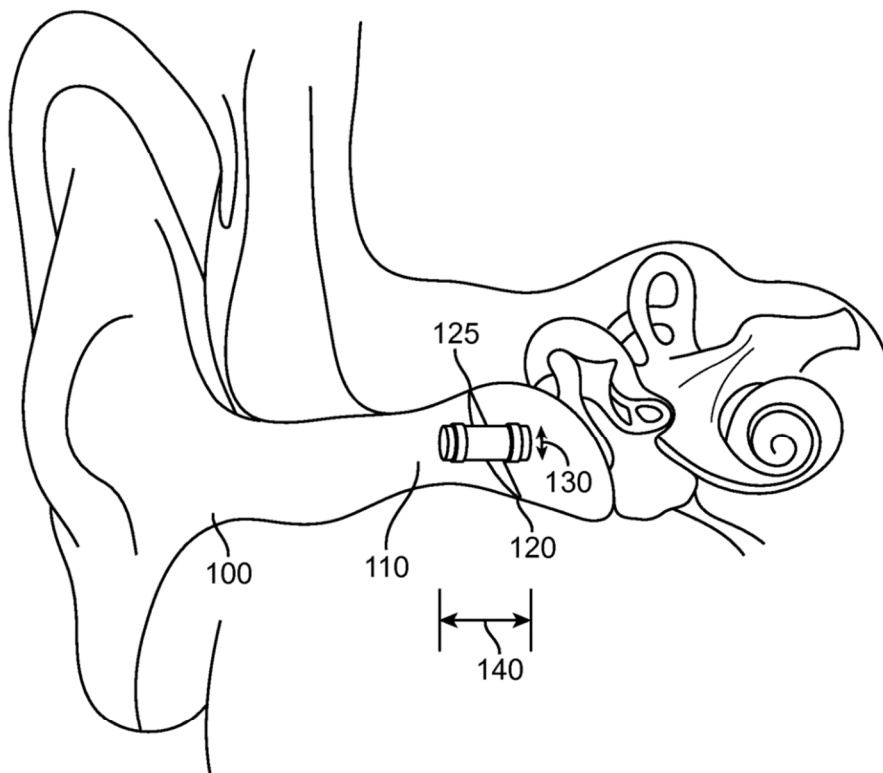


FIG. 5

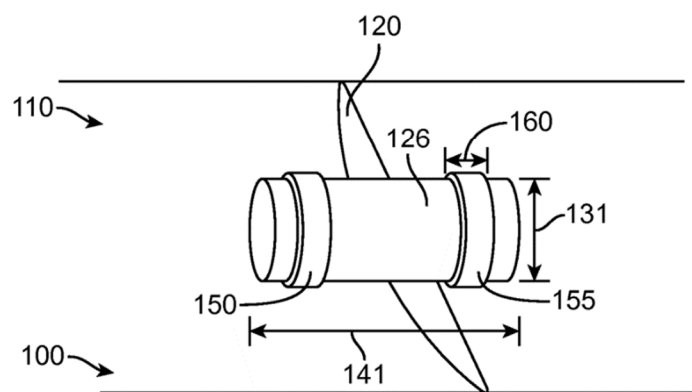


FIG. 6

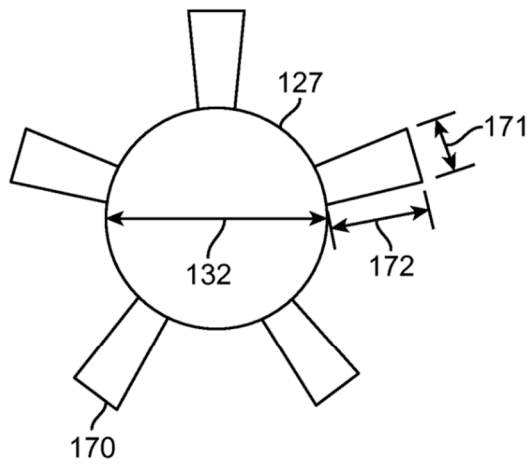
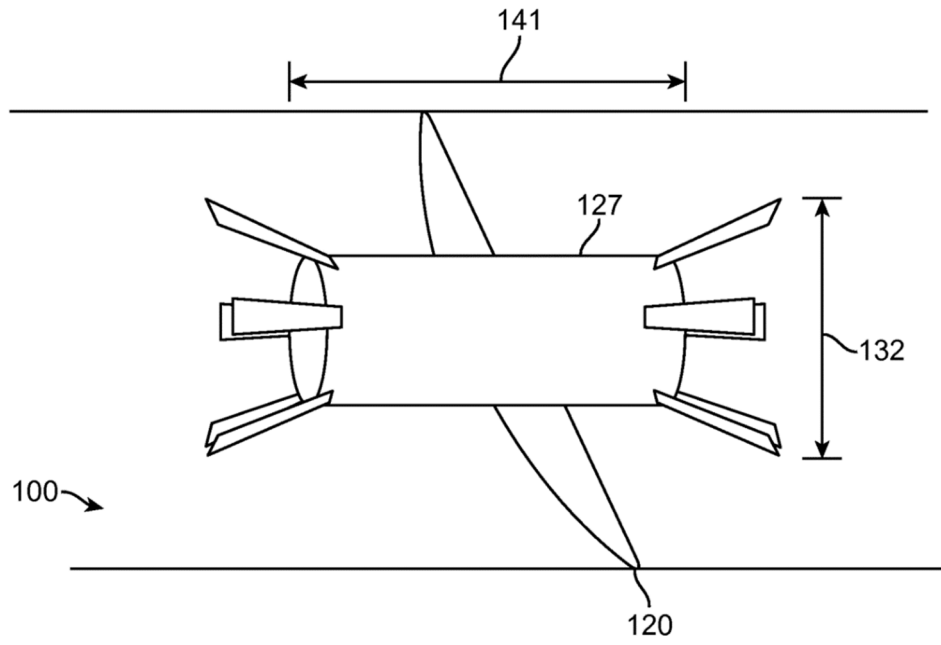


FIG. 7

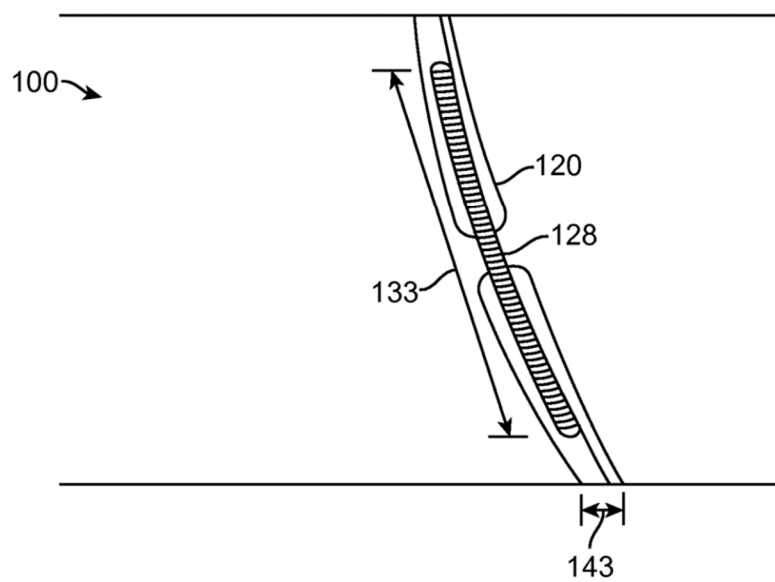


FIG. 8

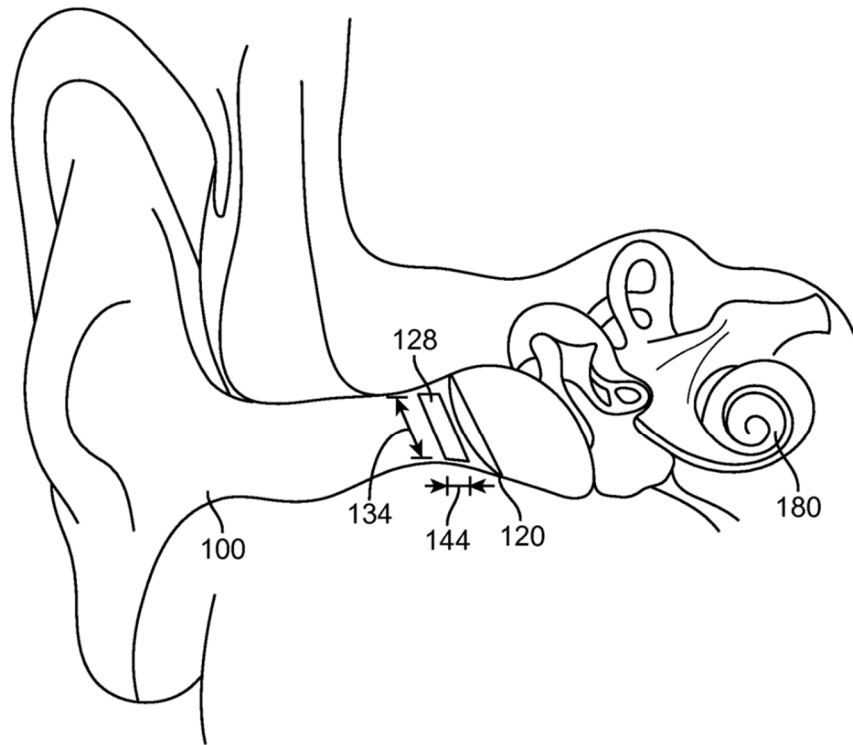


FIG. 9

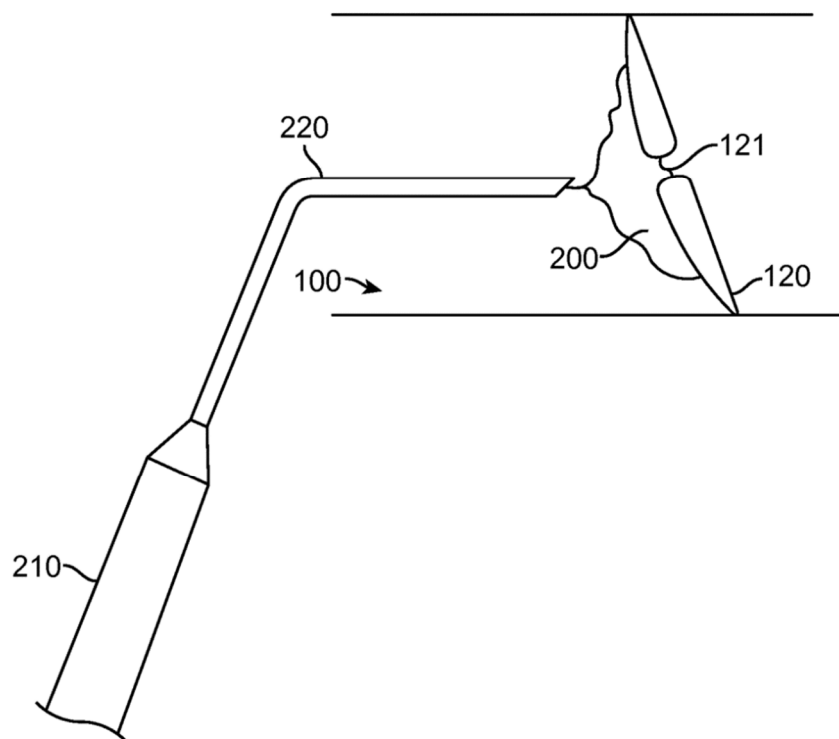


FIG. 10