

VESICULAS QUE COMPRENDEN FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO Y COMPOSICIONES QUE LAS CONTIENEN

Campo de la técnica

La presente invención se enmarca en los campos de la medicina humana y veterinaria, la cosmética y la ingeniería tisular, en particular en el campo de los sistemas de liberación de tipo vesiculares que comprenden en su composición el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). Las vesículas de la invención presentan una efectividad terapéutica mejorada en relación al EGF libre.

Estado de la técnica anterior

Los sistemas de liberación de medicamentos basados en sistemas vesiculares, generalmente liposomas, compuestos por moléculas anfifílicas que incorporan una sustancia terapéuticamente activa, constituyen uno de los sistemas más utilizados en el sector farmacéutico, debido a que pueden proporcionar una mayor estabilidad del principio activo, aumentar su permeabilidad a través de membranas biológicas, y permitir una liberación lenta del activo sin la necesidad de administraciones repetidas.

El EGF es uno de los principales factores de crecimiento que estimula la proliferación celular y la motilidad durante la regeneración tisular. También ayuda a mantener la hemostasis tisular, mediante la regulación de la proliferación de las células epiteliales y su migración. Además, el EGF induce angiogénesis, la cual proporciona el soporte nutricional para los tejidos (*Hudson y McCawley, J., Microsc. Res. Tech. 1998, 43: 444-455; Koivisto y col., Exp. Cell Res. 2006, 312: 2791-2805; Liang y col., Wound Repair Regen. 2008, 16: 691-698*). Este factor de crecimiento tiene múltiples aplicaciones en el campo farmacéutico (*Wong y col., Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 2001, 18: 51-71; Girdler y col., Am. J. Clin. Oncol. 1995, 18: 403-406; Haedo y col., Rev. Esp. Enferm. Dig. 1996, 88: 409-413; Majima, Ophthalmologica 1998, 212: 250-256*); en la cosmética (*Hasegawa y Yamamoto, Mech. Ageing Dev. 1992, 66: 107-114; patente No. US 5.618.544*) y en la ingeniería tisular (*Christopher y col., Biomacromolecules 2011, 12: 3139-3146*).

Se han desarrollado formulaciones de EGF empleando distintos sistemas liposomales. Como ejemplos tenemos la inclusión del EGF en liposomas unilamelares que comprenden fosfatidil glicerol (PG), fosfatidil colina (PC), y colesterol (*Brown y col., Ann. Surg. 1988, 208: 788-794*). También se reporta la inclusión del EGF en liposomas multilamelares que comprenden PC, colesterol y

ácido hialurónico (Yerushalmi y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, 313: 267-273); o que comprenden colesterol y dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC) (Alemdaroğlu y col., *J. Biomed. Mater. Res. A* 2008, 85A: 271-283; Değim y col., *Int. Wound. J.* 2011, 8: 343-354). Otra clase de liposomas reportados han sido los multivesiculares, que comprenden dioleoil fosfatidil colina (DOPC), dimiristoil fosfatidil glicerol (DMPG), colesterol y trioleína (Li y col., *Arch. Pharm. Res.* 2005, 28: 988-994).

Por otra parte, se han reportado liposomas que comprenden lípidos catiónicos conjugados a EGF (Kikuchi y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 227: 666-671); liposomas recubiertos con polietilen glicol (PEG), que además comprenden colesterol y dioleoil fosfatidil etanolamina (DOPE) en combinación con PC o con DPPC (Li y col., *Int. J. Pharm.* 2003, 258: 11-19). También han sido reportados los liposomas que comprenden DPPC y lisofosfatidil colina (LPC) (Saddi y col., *The Angle Orthodontist* 2008, 78: 604-609; Alves y col., *Life Sci.* 2009, 85: 693-699).

Las formulaciones de EGF empleando sistemas liposomales también han sido protegidas por patentes, como la que revela la composición de gel EGF/liposomas y métodos que comprende el atrapamiento del EGF en liposomas que contienen fosfolípidos neutros y negativamente cargados (Patente No. US 4944948); la composición de gel de liposomas y métodos que emplean liposomas negativamente cargados y EGF, e incluyen lípidos negativamente cargados como PG, PC y colesterol (Solicitud Internacional de Patente No. WO 9009782). Otra solicitud de patente refiere el uso tópico del EGF en liposomas para prevenir la amputación del pie diabético, y se emplean liposomas que comprenden PC y desoxicolato de sodio. La misma se restringe al uso de cualquier tipo de liposomas/niosomas de EGF para el tratamiento de lesiones isquémicas crónicas grados IV y V de pie diabético, por vía tópica (Solicitud Internacional de Patente No. WO 2007/073704). No se ha encontrado en el estado de la técnica la integración de EGF en sistemas vesiculares constituidos por colesterol y surfactantes catiónicos.

Los métodos tradicionales de obtención de liposomas, tales como: evaporación de filmes-finos (Agrawal y col., *J. Liposome Res.* 2005, 15: 141-155), deshidratación-rehidratación (Kirby y Gregoriadis, *Nat. Biotechnol.* 1984, 2: 979-984), congelación-descongelación (Ristori y col., *Biophys. J.* 2005, 88: 535-547) y extrusión (MacDonald y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1061: 297-303) presentan ciertos

inconvenientes. Algunos de estos inconvenientes están asociados con el uso de grandes cantidades de disolventes que luego son difíciles de eliminar, o con las altas temperaturas requeridas por algunos de estos métodos, las que limitan su uso a sustancias térmicamente estables. Por otra parte, el tamaño y la nanoestructuración del material resultan difíciles de controlar, y son métodos con baja reproducibilidad durante el escalado (procesos multietapa). Otro inconveniente de las preparaciones liposomales ha sido su pobre estabilidad.

El procesamiento de materiales con fluidos comprimidos (FCs), o gases densos, tanto en estado líquido como supercrítico, como medios disolventes, ha despertado grandes expectativas, a nivel académico e industrial, para preparar materiales micro- o nanoestructurados, como son los materiales particulados, sistemas vesiculares, partículas compuestas, superficies estructuradas, etc., con mayor homogeneidad estructural que la que se alcanza con el procesamiento convencional (*Holmes y col., Chem. Eur. J.* 2003, 9: 2144-2150; *Cooper, Adv. Mater.* 2001, 13: 1111-1114; *Cooper, Adv. Mater.* 2003, 15: 1049-1059, *Woods y col., J. Mater. Chem.* 2004, 14: 1663-1678). Un FC o gas denso es una sustancia que se encuentra cerca o por encima de su temperatura y presión críticas y que en condiciones normales es un gas. En la región supercrítica, o cerca de las condiciones supercríticas, el FC existe como una fase única, con propiedades intermedias entre las del gas y las del líquido. El FC más utilizado es el dióxido de carbono (CO₂), clasificado como disolvente verde, ya que no es tóxico, no es inflamable, es fácil de eliminar, no deja residuos en las partículas, es barato y es fácil de recuperar. Desde principios de los años 90, se han desarrollado toda una serie de metodologías que utilizan los FCs para la preparación de materiales finamente divididos, con tamaño de partícula micro-, sub-micro y nanoscópico (*Jung y Perrut, J. Supercrit. Fluid*, 2001, 20:179-219). El poder solvatante de los FCs puede modificarse por cambios de temperatura y composición, como en el caso de los disolventes líquidos convencionales, y además mediante cambios de presión, que se transmiten mucho más rápidamente en el seno de las disoluciones. Así pues, estos métodos de precipitación tienen en común el poder alcanzar grados de supersaturación muy elevados en intervalos de tiempo muy cortos, lo cual favorece la nucleación frente al crecimiento cristalino, y por ello la obtención de micro- o nano-partículas con distribuciones de tamaño muy estrechas, estructura interna y organización supramolecular controlada.

Uno de los procesos para la obtención de materiales micro- o nanoestructurados con FCs es el método denominado DELOS-SUSP "Depressurization of an Expanded Liquid Organic Solution-SUSPension" (*Solicitud Internacional de Patente No. WO 2006/079889; Patente No. EP 1843836; Cano-Sarabia et al., Langmuir 2008, 24: 2433-2437*) el cual se basa en la despresurización de una solución orgánica previamente expandida por un FC, generando en dicha despresurización un sistema micro- o nanodisperso. En este proceso el FC actúa como co-solvente siendo completamente miscible, a determinadas condiciones de presión y temperatura, con la disolución orgánica del soluto a estabilizar como sistema micro- o nanodisperso. Dicha estabilización se obtiene con la presencia de aditivos en el medio, generalmente acuoso, sobre el cual se realiza la despresurización de la disolución expandida, pudiendo ser dichos aditivos emulsificantes, detergentes iónicos y no iónicos, agentes de superficie, estabilizadores de coloides y protectores. Mediante este método, se pueden obtener sistemas micro- y/o nanodispersos, como liposomas, emulsiones o suspensiones. Los liposomas o vesículas son constituidos por colesterol y otros agentes de membrana, como fosfolípidos y surfactantes, y para su preparación se requiere la disolución del colesterol y/o otros lípidos en la disolución orgánica expandida, y su despresurización en una disolución acuosa del surfactante.

Para la posible incorporación de activos en vesículas o liposomas mediante DELOS-SUSP, y para generar las correspondientes vesículas, se requiere la disolución del activo en la disolución orgánica expandida inicial, o bien en la disolución acuosa donde se realiza la despresurización de dicha disolución expandida, y en ambos casos debe hacerse dicha disolución en presencia de lípidos, detergentes o agentes de superficie.

Dentro de los surfactantes catiónicos, los de tipo amonio cuaternario (QUATs) han sido ampliamente utilizados en el campo farmacéutico y en la cosmética. En el campo farmacéutico han sido utilizados por vía tópica, oftálmica, oral, bucal y nasal. Previamente, se ha reportado la preparación de nanovesículas de colesterol: bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), empleando la tecnología DELOS-SUSP. Un ejemplo de incorporación de compuestos hidrosolubles, por esta tecnología, es el que se describe en la referencia "Liposomes and other vesicular Systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine", *Progress in*

molecular biology and translational science, Elsevier, 2011, vol. 104, pp.1-52, donde las vesículas de colesterol:CTAB son utilizadas como vehículo para la encapsulación y administración del antibiótico gentamicina. Cabe destacar que las encapsulaciones de gentamicina que se divulgan son muy bajas (<2%). Este tipo de vehículo nunca se ha empleado para incorporar proteínas. Es conocido que los detergentes iónicos son agentes que provocan la desnaturalización de las proteínas (Akin y col., *Anal. Biochem.* 1985, 145: 170-176; Andersen y col., *J. Mol. Biol.* 2009, 391: 207-226). La desnaturalización de la albúmina sérica humana después de la adición del CTAB ha sido demostrada recientemente por espectroscopía Raman (Vlasova y Saletsky, *Laser Phys.* 2011, 21: 239-244). La desnaturalización, como regla, está acompañada de la pérdida de las propiedades funcionales de la proteína. Por todo lo expresado anteriormente, sigue siendo de interés lograr nuevos sistemas de liberación de EGF, fácilmente estandarizables, con elevada homogeneidad a nivel estructural y en sus propiedades físico-químicas, que mejoren las propiedades farmacéuticas, farmacológicas y/o incrementen la actividad terapéutica del EGF.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a vesículas, como sistema de liberación de medicamentos, que comprenden el EGF, un surfactante catiónico, y colesterol o uno de sus derivados, y que presentan una efectividad terapéutica superior a las descritas previamente.

La presente invención también se refiere a un proceso para la preparación de dichas vesículas que comprenden el EGF, un surfactante catiónico, y colesterol o sus derivados; que se caracteriza porque comprende: a) la preparación de una disolución acuosa del EGF y un surfactante catiónico, b) la disolución de colesterol o uno de sus derivados en un disolvente orgánico expandido con un FC, c) la síntesis de las vesículas mediante la despresurización de la disolución resultante de la etapa b) sobre la disolución resultante de la etapa a).

Es también objeto de la invención, una composición farmacéutica que se caracteriza porque comprende las vesículas que comprenden el EGF, un surfactante catiónico, y colesterol o sus derivados; y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro de los objetos de la invención es el uso de dichas vesículas para la fabricación de medicamentos y de productos cosméticos.

Las composiciones farmacéuticas producto de esta invención, que contienen las vesículas de EGF junto a otros componentes, tienen utilidad como medicamento para acelerar los procesos de cicatrización de úlceras de pie diabético y otras heridas complejas, como úlceras venosa, úlceras de decúbito, quemaduras, entre otras; la reparación de las estructuras de la cámara anterior de ojos dañados, en mucositis sistémicas, y en todas las enfermedades del tracto gastrointestinal que involucren la necesidad de regenerar mucosa y submucosa. En particular, se ha encontrado que en la cicatrización de las úlceras de pie de diabético y de las úlceras de origen venoso, estas vesículas presentan efectividad terapéutica significativamente superior, con relación a los antecedentes de la invención.

La invención también se refiere a un producto cosmético que se caracteriza porque comprende las vesículas del EGF, un surfactante catiónico, y colesterol o sus derivados.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación esquemática de un aparato para la obtención de vesículas que comprenden EGF, un surfactante catiónico y colesterol o un derivado de colesterol donde: C: Colector; H: Intercambiador de calor; P: Bomba; R: Reactor; V: Válvula; RD: Disco de ruptura; ST: Agitador; FL: Filtro; TI: Indicador de temperatura; PI: Indicador de presión; PIC: Indicador controlador de presión; F: Medidor de flujo.

Figura 2. Distribución del tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica (DLS) de las vesículas manteniendo constante la relación CTAB:colesterol 1M:1M y variando la relación EGF:colesterol (0 μ M:1M (— $\diamond$ —), 5 μ M:1M (— $\blacktriangledown$ —), 15 μ M:1M (— $\diamond$ —), 25 μ M:1M (— $\blacktriangle$ —) y 40 μ M:1M (— $\ast$ —) (A); y manteniendo constante la relación bromuro de tetradeciltrimetilamonio (cetrimida):colesterol 1M:1M y variando la relación EGF:colesterol (0 μ M:1M (— $\blacktriangledown$ —), 5 μ M:1M (— $\diamond$ —), 15 μ M:1M (— $\ast$ —), 25 μ M:1M (— $\blacktriangle$ —) y 40 μ M:1M (— $\diamond$ —) (B).

Figura 3. Imágenes de crio-microscopía electrónica de transmisión (Cryo-TEM) de las vesículas de EGF con composición colesterol:CTAB:EGF (A), colesterol:cetrimida:EGF (B), colesterol:cloruro de benzalconio (BKC):EGF (C) y β -

Sitosterol:CTAB:EGF (D) con una relación QUAT:colesterol ó β -Sitosterol 1M:1M y relación EGF:colesterol ó β -Sitosterol 5 μ M:1M.

Figura 4. Actividad biológica específica de diferentes preparaciones de EGF en un ensayo de proliferación celular donde se comparan el EGF libre, los liposomas de DPPC:colesterol (con relación DPPC:colesterol 1M:1M y EGF:colesterol 25 μ M:1M) y las vesículas de CTAB:colesterol (A) y cetrimida:colesterol (B), manteniendo constante la relación QUAT:colesterol 1M:1M y variando la relación EGF:colesterol (5 μ M:1M, 15 μ M:1M y 25 μ M:1M).

Figura 5. Perfil de degradación proteolítica, después de la exposición a tripsina a 37 °C, por diferentes intervalos de tiempo, del EGF libre y de diferentes preparaciones de vesículas manteniendo constante la relación CTAB:colesterol (A) y cetrimida:colesterol (B) 1M:1M, y variando la relación EGF:colesterol (5 μ M:1M, 15 μ M:1M y 25 μ M:1M).

Figura 6. Fotografías de evolución de la cicatrización de la úlcera del pie diabético correspondientes al paciente JLG al inicio (A), y después de 4 semanas (B) y 8 semanas (C) de tratamiento, con una formulación tópica en forma de atomizador que contiene vesículas con relación CTAB:colesterol 1M:1M y EGF:colesterol 5 μ M:1M con una concentración equivalente de EGF de 15 μ g/mL.

Figura 7. Fotografías de evolución de la cicatrización de la úlcera del pie diabético correspondientes al paciente ZEM al inicio (A) y después de 4 semanas (B) y 8 semanas (C) de tratamiento. Las primeras 4 semanas fue tratado por vía infiltrativa con una formulación parenteral que contenía vesículas con relación BKC:colesterol 1M:1M y EGF:colesterol 5 μ M:1M, con una concentración equivalente de EGF de 75 μ g/mL. Las otras 4 semanas, hasta completar 8 semanas, fue tratado con una formulación tópica en forma de atomizador que contiene vesículas con relación CTAB:colesterol 1M:1M y EGF:colesterol 5 μ M:1M, con una concentración equivalente de EGF de 15 μ g/mL.

Descripción detallada de la invención

La presente invención provee vesículas que se caracterizan porque comprenden el factor de crecimiento epidérmico (EGF), un surfactante catiónico, y colesterol o sus derivados. En una realización de la invención el surfactante catiónico es de tipo amonio cuaternario.

En el contexto de esta invención el término “EGF” se refiere a cualquiera de las variantes de moléculas de EGF que mantengan su actividad biológica; por ejemplo moléculas truncadas por el extremo C-terminal (*Calnan y col., Gut* 2000, 47: 622-627); o truncadas por el extremo N-terminal (*Svodoca y col., Biochim. Biophys. Acta* 1994, 1206: 35-41; *Shin y col., Peptides* 1995, 16: 205-210). El EGF puede ser obtenido mediante tecnología del ADN recombinante empleando levaduras, como *Saccharomyces* (*Valdés y col., Biotecnol. Apl.* 2009, 26: 1-9) o *Pichia pastoris* (*Research Journal of International Studies* 2009, 10: 36-46); empleando bacterias como *Escherichia coli* (*Yoon y col., Biotechnol. Bioprocess Eng.* 1997, 2: 86-89; *Abdull Razis y col., Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008, 144: 249-261); o por métodos de síntesis química (*Shin y col., Peptides* 1995, 16: 205-210). El EGF objeto de la invención también comprende cualquiera de las variantes obtenidas mediante los métodos descritos anteriormente, después de ser modificada a través de cualquier procedimiento del estado de la técnica, tales como: sustitución de aminoácidos (*Shiah y col., J. Biol. Chem.* 1992, 267: 24034-24040; *Lahti y col., FEBS Lett.* 2011, 585: 1135-1139; *Solicitud Internacional de Patente No. WO 2007/065464*), y conjugación a polietilen glicol (*Thomas y col., Bioconjugate Chem.* 2001, 12: 529-37; *Lee y col., Pharm. Res.* 2003, 20:818-25), u otro método de modificación química o genética.

El término “surfactante catiónico” se refiere a aquellos surfactantes con al menos una carga eléctrica positiva en la molécula, e incluye también a la combinación de uno o más surfactantes catiónicos. Por ejemplo, pueden ser utilizados, de acuerdo a la presente invención, los surfactantes catiónicos de tipo sal de amina ternaria, sal de amonio cuaternario y alquil amonios en heterociclos insaturados y saturados.

En la invención, el término “surfactante catiónico de tipo amonio cuaternario (QUATs)” se refiere a sales de amonio cuaternario en las que por lo menos uno de los sustituyentes del nitrógeno es de cadena larga. Dentro de los QUATs se agrupan compuestos tales como el CTAB, la cetrimida y el BKC o una mezcla de ellos. En una realización preferida de la presente invención, el surfactante catiónico es un surfactante aceptable en farmacia. Tanto los QUATs como los demás surfactantes catiónicos pueden obtenerse comercialmente con calidades farmacéutica y cosmética.

En la presente invención el término “vesículas” se refiere a micropartículas y nanopartículas coloidales, que tienen entre 25 nm y 5 μ m, y están formadas por una o más bicapas de moléculas anfifílicas que encierran una fase acuosa.

En una materialización de la invención, las vesículas tienen una proporción molar entre el surfactante catiónico y el colesterol (o sus derivados) que se encuentra en el rango de 10M:1M a 1M:5M; y una proporción molar entre el EGF y el colesterol (o sus derivados) que se encuentra en el rango de 0,5 μ M:1M a 100 μ M:1M.

El término “derivados” del colesterol, en la presente invención, se refiere a moléculas de la familia de los esteroides, generalmente obtenidas a partir de la molécula precursora de colesterol y con carácter lipofílico.

En una realización de la invención, las vesículas que comprenden EGF se caracterizan porque presentan estructura unilamelar, y tamaño medio aproximado entre 25 y 500 nm, preferentemente entre 50 y 300 nm. En una realización particular, la invención se refiere a vesículas donde el EGF está incorporado a la bicapa vesicular. El tamaño aproximado y la morfología de las vesículas se evalúan por Cryo-TEM, y la distribución de tamaño de las vesículas se caracteriza por DLS.

Sorprendentemente, las vesículas de la invención muestran un incremento significativo de la potencia biológica del EGF (medida *in vitro*) en comparación con el EGF libre y con EGF en liposomas de colesterol:DPPC. Además, estas vesículas son capaces de proteger al EGF frente al ataque de proteasas, una característica muy importante para lograr una adecuada biodisponibilidad del EGF en el sitio de acción y por consiguiente aumentar su efectividad terapéutica.

En la presente invención se han sintetizado por primera vez vesículas de EGF que mejoran algunas de las propiedades farmacéuticas y farmacológicas de este factor de crecimiento, como son su potencia y estabilidad. Se ha comprobado que el grado de incorporación del EGF en la estructura de las vesículas se mantiene estable durante al menos un año. Adicionalmente, permiten incrementar la permeabilidad a través de membranas biológicas.

Las vesículas de la invención tienen como ventaja adicional un efecto antimicrobiano y antifúngico, el cual es deseable en las composiciones que se emplean en el tratamiento de heridas complejas y otras lesiones susceptibles de ser tratadas con el EGF.

En una materialización de la invención, las vesículas que comprenden el EGF se obtienen por tecnología de FCs. En una realización particular, la tecnología de FCs que se emplea para la obtención de las vesículas incluye un proceso que comprende a) la preparación de una disolución acuosa de EGF y un surfactante catiónico, b) la disolución de colesterol o sus derivados en un disolvente orgánico expandido con un FC, y c) la síntesis de las vesículas mediante la despresurización de la disolución resultante de la etapa b) sobre la disolución resultante de la etapa a). En una realización preferida, el surfactante catiónico que se emplea en la etapa a) es de tipo amonio cuaternario.

La invención también provee un proceso para la preparación de vesículas que comprenden el EGF, un surfactante catiónico, y colesterol o sus derivados, que se caracteriza porque comprende a) la preparación de una disolución acuosa de EGF y un surfactante catiónico, b) la disolución de colesterol o sus derivados en un disolvente orgánico expandido con un FC, y c) la síntesis de las vesículas mediante la despresurización de la disolución resultante de la etapa b) sobre la disolución resultante de la etapa a). En una realización de la invención, el proceso antes descrito incluye un surfactante catiónico de tipo amonio cuaternario.

En una materialización de la invención, el disolvente orgánico de la etapa b) del proceso antes descrito es un disolvente que se selecciona del grupo compuesto por los alcoholes monohídricos, como el etanol, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol y trifluoroetanol; los alcoholes polihídricos, como el propilen glicol, PEG 400, y el 1,3-propanediol; las cetonas, como la acetona, cetona etil metílica, y cetona isobutílica metílica; la etilendiamina, el acetonitrilo, el acetato de etilo y mezclas de ellos. En cualquier caso, sea cual sea la naturaleza del disolvente orgánico, el componente lipídico ha de ser soluble en él, y además dicho disolvente ha de ser necesariamente miscible con el FC y el agua. Además, el disolvente orgánico seleccionado debe tener una toxicidad relativamente baja.

La concentración relativa de EGF y surfactante en la disolución tampón inicial; y la concentración de colesterol en el disolvente orgánico vendrán dadas por el cociente deseado de colesterol:surfactante catiónico:EGF en la vesícula final. En general, la relación colesterol:surfactante catiónico:EGF puede influir en las características físico-química y biológicas de las diferentes vesículas obtenidas.

En otra materialización de la invención, el FC que se emplea en el proceso antes descrito es un compuesto que se selecciona entre el CO₂, el etano, el propano, los

hidroclorofluorocarbonos (por ejemplo, CFC-22), y los hidrofluorocarbonos (por ejemplo, HFC-134A). Preferiblemente, el FC en la etapa b) es el CO_2 , considerado como un disolvente ecológico, ya que no es tóxico, no es inflamable, no es corrosivo, no es dañino para el medio ambiente, y además es muy abundante en la naturaleza.

En una materialización de la invención, el proceso para la preparación de vesículas de EGF se lleva a cabo en un montaje como el representado en la Figura 1. El montaje consta de un reactor de alta presión (R) al que se adiciona una disolución de colesterol en etanol a concentración (C1), a presión atmosférica y a la temperatura de trabajo ($T = T_w$). En un segundo paso se adiciona CO_2 comprimido hasta la presión de trabajo ($P = P_w$), produciendo la expansión volumétrica de la disolución a una fracción molar X_{CO_2} . La adición se realiza utilizando la bomba P1 a través de la válvula V-1, manteniendo el resto de las válvulas cerradas. El sistema se mantiene a una presión P_w y temperatura T_w , durante un tiempo determinado para garantizar la total homogeneización y el equilibrio térmico. Transcurrido este tiempo se abre V-4 con el objetivo de conectar el reactor R con el filtro FL, que ha sido previamente presurizado con N_2 hasta P_w , manteniendo el resto de las válvulas cerradas. La apertura de V-6 permite la despresurización de la disolución volumétricamente expandida sobre una disolución acuosa de EGF a concentración (C2) y el surfactante a concentración (C3) bombeada a través de P2. En este paso final, una corriente de N_2 adicionada a través de V-2 a P_w es utilizada como émbolo para empujar la disolución expandida, y para mantener constante la presión dentro del reactor durante el paso de despresurización. La presencia del filtro FL permite coleccionar cualquier precipitado que se haya podido formar durante el proceso. Las vesículas formadas son colectadas en el recipiente C, y posteriormente son almacenadas en botellas de vidrio a 4 °C. Una vez finalizada la despresurización, se cierran V-6 y V-2 y se procede a la despresurización del equipo abriendo nuevamente V-6.

En una realización de la invención la relación entre la cantidad de FC y de disolvente orgánico corresponde a una fracción molar en FC aproximada de 0,3 a 0,95; preferentemente de 0,5 a 0,8. En una realización particular, la disolución del colesterol (o sus derivados) en un FC se realiza en un reactor a una presión P_w aproximada de 1 a 30 MPa, y una temperatura T_w aproximada de 10 a 70 °C. Preferiblemente, la temperatura aproximada del reactor está entre 10 y 50 °C.

En el proceso objeto de la invención, el EGF se disuelve en una solución acuosa que contiene un surfactante catiónico cuya concentración se encuentra por encima de su concentración micelar crítica.

Sorprendentemente, las vesículas de colesterol:QUAT:EGF sintetizadas empleando el proceso antes descrito presentan rendimientos de incorporación del EGF en la vesícula muy cercanos al 100%, los que son significativamente más elevados que los esperados para la incorporación de cualquier molécula hidrosoluble, teniendo en cuenta los resultados antes reportados para la gentamicina. Estos rendimientos en vesículas colesterol-QUATs-EGF son también notablemente más elevados que los que se obtienen en la incorporación de otras proteínas con propiedades estructurales similares a EGF, como la proteína hidrosoluble albúmina de suero bovina (BSA). Esto ocurre, incluso, cuando se utiliza el procedimiento DELOS-SUSP antes descrito para dicha incorporación de BSA, ya que sólo se obtiene un rendimiento de incorporación del 42%.

Por otro lado, y también de forma sorprendente, estos rendimientos de incorporación del EGF en las vesículas colesterol:QUATs son claramente superiores a los obtenidos en vesículas colesterol:DPPC:EGF, incluso en el caso de que se utilice el proceso DELOS-SUSP para su preparación.

Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende las vesículas de EGF, un surfactante catiónico, y colesterol o sus derivados, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente o excipientes aceptables en farmacia, que forman parte de la composición farmacéutica de la presente invención, pueden mejorar la actividad de las vesículas. Alternativamente, pueden ayudar a la manipulación y procesamiento de la composición de la presente invención. Las vesículas de EGF de la presente invención se pueden formular en varias formas farmacéuticas, como son: inyectables, líquidos atomizadores o "spray", geles, soluciones viscosas, cremas, ungüentos, parches transdérmicos, depósitos, formulaciones inhaladas, y otras conocidas por los versados en esta rama de la técnica.

Diversos excipientes pueden mezclarse durante o después de la síntesis de las vesículas de esta invención con el objetivo de formar un material conveniente para las formas de dosificación antes mencionadas. Generalmente, los excipientes tales como los solubilizadores o disolventes, surfactantes, modificadores de pH, antioxidantes, diluyentes, sistemas matrices, agentes formadores de complejos,

viscosantes, dispersantes, humectantes, colorantes, aromatizantes, conservantes, incrementadores de la permeabilidad y otros, se pueden utilizar para los propósitos acostumbrados, y en cantidades típicas, sin afectar las características de las composiciones de la presente invención, tal como es conocido por los versados en este campo de la técnica (*Remington's Pharmaceutical Sciences* (1995)). Otros ejemplos adicionales de excipientes a utilizar en formulaciones farmacéuticas de las vesículas de EGF pueden encontrarse en el *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (6th edition).

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica es una forma de liberación controlada o sostenida. Las formas de liberación controlada o sostenida incluyen habitualmente sistemas matriz, resinas de intercambio iónico, o barreras particulares que controlan la difusión de las vesículas de EGF.

En una materialización de la invención, para la preparación de las composiciones farmacéuticas, las vesículas de EGF son acondicionadas mediante un proceso de concentración-diafiltración, empleando aparatos conocidos en esta rama de la técnica. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas por diferentes vías, entre ellas la sistémica, la intralesional, la mucosal, la tópica, la transdérmica, la oftálmica, o como formulación inhalada.

En otro aspecto, la presente invención comprende el uso de las vesículas de EGF, un surfactante catiónico, y colesterol o sus derivados en la fabricación de un medicamento. En una materialización de la invención, dicho medicamento está destinado al tratamiento de enfermedades donde se requiera auxiliar los procesos de cicatrización y regeneración tisular en cualquier especie de mamífero; donde los surfactantes catiónicos, el colesterol y el EGF que componen dichas vesículas son aceptables en farmacia. En una realización preferente, el mamífero es una persona humana.

El uso antedicho como medicamento comprende la administración de una cantidad eficaz de dichas vesículas para tratar una enfermedad que requiera la administración exógena de EGF, para regular los procesos de proliferación, crecimiento y migración de las células epiteliales o inducir la angiogénesis.

En general, se contempla que una concentración eficaz en la administración de las vesículas de EGF de la presente invención (o de la composición que las comprende) sería de 1,0 a 200 µg/mL equivalentes de EGF, preferiblemente de 5,0 a 100 µg/mL equivalentes de EGF por administración. El volumen y la frecuencia de

administración dependerá del tipo de lesión, su tamaño y el dispositivo de administración empleado, tal y como es bien sabido por los expertos en la materia. Puede ser también apropiado administrar la dosis requerida en dos, tres, cuatro o más subdosis en los intervalos apropiados durante el día.

La dosificación y la frecuencia exactas de la administración dependen de la condición particular a tratar y de su severidad, de la edad, peso, sexo, de la extensión de la enfermedad, y de la condición física general del paciente, así como de cualquier otra medicación concomitante administrada al individuo, tal y como es bien sabido por los expertos en la materia. Además, es evidente que la cantidad eficaz diaria antedicha se puede disminuir o aumentar, dependiendo de como reacciona el paciente a dicha medicación, y/o dependiendo de la evaluación realizada por el médico que prescribe el medicamento de la presente invención. Así, las cantidades eficaces diarias mencionadas más arriba se tienen que considerar como pautas o recomendaciones.

En una realización de la invención, el medicamento que se fabrica con las vesículas de la invención se utiliza para el tratamiento de heridas complejas de todas las partes blandas periféricas. En una realización particular, la herida compleja es una úlcera de pie diabético. En otra realización particular, el medicamento se utiliza para el tratamiento de úlceras venosas, úlceras de decúbito o quemaduras.

En otra materialización de la invención, el medicamento se utiliza para el tratamiento de una enfermedad tal como el distrés respiratorio del adulto. El medicamento que se fabrica con las vesículas de la invención también es útil para el tratamiento de lesiones del tubo digestivo, como la colitis ulcerativa, las úlceras duodenales, y la colitis distal. En otra materialización, el medicamento se utiliza para el tratamiento de lesiones oculares.

Es también parte de la presente invención un producto cosmético que se caracteriza porque comprende las vesículas de EGF, surfactante catiónico, y colesterol o sus derivados, y al menos un excipiente aceptable en cosmética o dermofarmacia. En este aspecto de la invención, los surfactantes catiónicos, el colesterol (o sus derivados) y el EGF son aceptables en farmacia y cosmética.

Las vesículas de EGF de la presente invención se pueden formular en varias formas cosméticas o dermofarmacéuticas, tanto sólidas, como líquidas y semisólidas, como son y sin sentido limitativo: inyecciones, líquidos atomizadores "spray", geles, cremas y emulsiones múltiples, dispersiones acuosas, leches, bálsamos, lociones,

espumas, sueros, ungüentos, parches transdérmicos, toallitas, depósitos, pomadas, polvos, barras, formulaciones inhaladas y similares, en todos los casos incluyendo las formulaciones de permanencia y las de enjuagado.

Generalmente, la composición cosmética o dermofarmacéutica de la invención puede contener excipientes tales como, y sin sentido limitativo, los solubilizadores o disolventes, surfactantes, modificadores de pH, antioxidantes, diluyentes, sistemas matrices, agentes formadores de complejos, viscosantes, dispersantes, humectantes, polímeros gelificantes, espesantes, suavizantes, agentes estabilizantes, absorbentes del olor, agentes quelantes, extractos vegetales, aceites esenciales, extractos marinos, agentes provenientes de un procedimiento de biofermentación, sales minerales, extractos celulares y filtros solares (agentes fotoprotectores de naturaleza orgánica (o mineral) activos contra los rayos ultravioleta A y/o B), pigmentos o colorantes, aromatizantes, conservantes, incrementadores de la permeabilidad y otros, así como sus mezclas siempre que sean física- y químicamente compatibles con el resto de componentes de la composición de la presente invención. Estos excipientes se pueden utilizar para los propósitos acostumbrados y en cantidades típicas, sin afectar las características de las composiciones de la presente invención, tal como es conocido por los versados en este campo de la técnica (Ejemplos adicionales pueden encontrarse descritos en *CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Twelfth Edition (2008)*). La naturaleza de dichos adyuvantes adicionales puede ser sintética o de origen natural, como por ejemplo extractos vegetales, o provenir de un procedimiento de biofermentación.

Por tanto, es también un objeto de la presente invención el uso de las vesículas de EGF antes descritas para la fabricación de un producto cosmético. En una realización de la invención, el producto cosmético es un producto para prevenir la senescencia y el envejecimiento de la piel.

Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos de realización

Los siguientes ejemplos son mostrados con propósito ilustrativo, y no deben ser considerados como limitantes de la invención.

Ejemplo 1. Síntesis de vesículas de colesterol:DPPC:EGF mediante la tecnología de fluidos comprimidos

Primeramente una disolución de 12 mg de colesterol y 24 mg de DPPC en 1,2 mL de etanol se introduce en un reactor de alta presión, de 6 mL de volumen, a presión

atmosférica y temperatura de trabajo ($T_w = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se adiciona CO_2 comprimido, produciendo la expansión volumétrica de la disolución hasta alcanzar una fracción molar $X_{\text{CO}_2} = 0,7$ y una presión de trabajo $P_w = 10\text{ MPa}$. Para lograr la total homogenización y el equilibrio térmico, el sistema se deja durante aproximadamente 60 minutos a 10 MPa y 35 °C. Finalmente, se despresuriza la disolución orgánica expandida desde la presión de trabajo hasta la presión atmosférica, sobre 24 mL de una disolución acuosa de EGF a la concentración deseada (entre 15 μM y 40 μM). En este último paso, una corriente de N_2 a 10 MPa es utilizada como émbolo para empujar la solución de colesterol y DPPC en etanol expandido con CO_2 , con el objetivo de mantener constante la presión de trabajo dentro del reactor durante la despresurización. A continuación, las vesículas son transferidas a un recipiente que, herméticamente cerrado, es almacenado hasta su uso a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Como resultado, se obtuvieron vesículas de DPPC:colesterol (1:1) con EGF incorporado a una concentración entre 15 μM y 40 μM . Los resultados de apariencia física, tamaño medio y potencial-Z se muestran en la Tabla 1. El tamaño medio, la distribución de tamaño de partículas y el potencial-Z fueron determinados por DLS. Se puede observar que las diferentes preparaciones de vesículas no presentan problemas de estabilidad a corto plazo, y que presentan tamaño medio e índice de polidispersión (IPD) relativamente pequeños, lo cual las hace atractivas desde el punto de vista farmacéutico. Sin embargo, el potencial-Z absoluto es muy pequeño ($< +10\text{ mV}$), encontrándose muy por debajo de los valores que se considera que permiten la estabilidad coloidal de sistemas dispersos, que son normalmente valores absolutos por encima de 30 mV (Carrion y col., *J. Colloid. Interface Sci.* 1994, 164: 78-87). Esta característica indica que la estabilidad a largo plazo de este sistema de vesículas puede estar comprometida.

Tabla 1. Apariencia física, tamaño medio de partículas y potencial-Z de las diferentes variantes de vesículas colesterol:DPPC:EGF para diferentes composiciones.

Composición (EGF:colesterol)	Apariencia física	Tamaño medio (nm) (IPD)*	Potencial-Z (mV) ($\pm\text{SD}$)*
0 μM :1 M	Solución opalescente dispersa	143,2 (0,180)	+4,8 ($\pm 2,43$)
15 μM :1 M	Solución opalescente dispersa	188,3 (0,180)	+3,92 ($\pm 2,43$)

25 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	226,4 (0,297)	+5,12 ($\pm$ 3,99)
40 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	227,3 (0,243)	+1,78 ($\pm$ 0,82)

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

Ejemplo 2. Síntesis de vesículas de colesterol:CTAB:EGF mediante la tecnología de fluidos comprimidos

Primeramente, una disolución de 76 mg de colesterol en 2,88 mL de etanol se introduce en un reactor de alta presión de 6 mL de volumen a presión atmosférica y temperatura de trabajo ($T_w = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se adiciona CO_2 comprimido produciendo la expansión volumétrica de la disolución hasta alcanzar una fracción molar $X_{\text{CO}_2} = 0,7$ y una presión de trabajo $P_w = 10\text{ MPa}$. Para lograr la total homogenización y el equilibrio térmico, el sistema se deja durante aproximadamente 60 minutos a 10 MPa y $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se despresuriza la disolución acuosa expandida desde la presión de trabajo hasta la presión atmosférica sobre 24 mL de una disolución de CTAB en agua mQ ($C = 2,83\text{ mg/mL}$) que contiene EGF a la concentración deseada (entre 1 y $40\text{ }\mu\text{M}$). En este último paso, una corriente de N_2 a 10 MPa es utilizada como émbolo para empujar la solución de colesterol en etanol con el objetivo de mantener constante la presión de trabajo dentro del reactor durante la despresurización. A continuación, las vesículas son transferidas a un recipiente que, herméticamente cerrado, es almacenado hasta su uso a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La morfología de las vesículas fue evaluada mediante cryo-TEM, según una técnica que ha sido descrita previamente (*Progress in Molecular Biology and Translational Science, Elsevier, 2011, vol. 104, pp.1-52*).

Se obtuvieron vesículas de CTAB:colesterol (1:1) con EGF incorporado a una concentración entre $1\text{ }\mu\text{M}$ y $40\text{ }\mu\text{M}$. Los resultados de apariencia física, tamaño medio y potencial-Z se muestran en la Tabla 2; la distribución de tamaño de partículas en la Figura 2A y el tamaño y la morfología por cryo-TEM en la Figura 3A. Como se observa en la Tabla 2, las diferentes preparaciones variando la proporción EGF:colesterol fueron estables. El potencial-Z de todas las preparaciones es positivo, y muy superior a $+30\text{ mV}$, lo cual predice una elevada estabilidad a largo plazo. También se puede notar un incremento en el tamaño medio y el IPD con el incremento de la proporción EGF:colesterol. En la Figura 2A se observan distribuciones de tamaños de las partículas que son altamente homogéneas, cuyo

diámetro medio no sobrepasa los 200 nm. En la Figura 3A se observa que, en relación con la morfología de las vesículas estudiada por cryo-TEM, predominan las formas esferoidales con estructura unilamelar. Las características enunciadas de las diferentes preparaciones vesiculares las hacen muy atractivas desde el punto de vista farmacéutico.

Tabla 2. Apariencia física, tamaño medio de partículas y potencial-Z de las diferentes variantes de vesículas colesterol:CTAB:EGF para diferentes composiciones.

Composición (EGF:colesterol)	Apariencia física	Tamaño medio (nm) (IPD)*	Potencial-Z (mV) ($\pm$ SD)*
0 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	117,7 (0,244)	+73,1 ($\pm$ 11,0)
1 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	113,6 (0,299)	+75,3 ($\pm$ 10,6)
2 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	113,7 (0,274)	+72,1 ($\pm$ 5,2)
5 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	96,6 (0,257)	+70,9 ($\pm$ 9,6)
15 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	128,4 (0,379)	+74,2 ($\pm$ 10,3)
25 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	145,4 (0,391)	+74,8 ($\pm$ 6,3)
40 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	180,6 (0,450)	+68,40 ($\pm$ 5,8)

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

Ejemplo 3. Síntesis de vesículas de colesterol:cetrimida:EGF mediante la tecnología de fluidos comprimidos

Estas vesículas se sintetizaron de igual forma a la utilizada en el Ejemplo 2, pero en este caso se utilizó una disolución acuosa de cetrimida con una concentración de 2,61 mg/mL. Se obtuvieron vesículas de cetrimida:colesterol (1:1) con EGF incorporado a una concentración entre 1 μ M y 40 μ M. Los resultados de apariencia física, tamaño medio y potencial-Z se muestran en la Tabla 3; la distribución de tamaño de partículas en la Figura 2B y el tamaño y la morfología por cryo-TEM en la Figura 3B. Como se observa en la Tabla 3, todas las preparaciones fueron estables y presentan pequeños valores de tamaño medio e IPD. El tamaño medio, la distribución de tamaño de partículas y el potencial-Z fueron determinados por DLS. El potencial-Z de todas las preparaciones es positivo, y muy superior a + 30 mV, lo cual les predice una elevada estabilidad a largo plazo. En la Figura 2B se observa

que las distribuciones de tamaños de las partículas son altamente homogéneas, y que el diámetro medio de las mismas no sobrepasa los 200 nm. En la Figura 3B se observa que predominan las formas esféricas con estructura unilamellar, según la cryo-TEM. Las diferentes preparaciones vesiculares también presentan características que las hacen muy atractivas desde el punto de vista farmacéutico.

Tabla 3. Apariencia física, tamaño medio de partículas y potencial-Z de las diferentes variantes de vesículas colesterol:cetrimida:EGF para diferentes composiciones.

Composición (EGF:colesterol)	Apariencia física	Tamaño medio (nm) (IPD)*	Potencial-Z (mV) ($\pm$ SD)*
0 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	118,6 (0,392)	+78,1 ($\pm$ 16,1)
1 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	123,8 (0,381)	+75,4 ($\pm$ 12,6)
2 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	127,3 (0,376)	+77,3 ($\pm$ 9,3)
5 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	140,8 (0,375)	+79,1 ($\pm$ 13,1)
15 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	124,0 (0,388)	+71,1 ($\pm$ 11,6)
25 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	125,1 (0,436)	+70,4 ($\pm$ 10,8)
40 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	152,1 (0,44)	+72,7 ($\pm$ 11,2)

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

Ejemplo 4. Síntesis de vesículas de colesterol:BKC:EGF mediante la tecnología de fluidos comprimidos

Se sintetizaron de igual forma a la utilizada en el Ejemplo 2, pero en este ejemplo se utilizó por una parte una disolución de 81,46 mg de colesterol en 2,88 mL de etanol; y por otra parte, una disolución acuosa de BKC a 3,0 mg/mL y EGF a la concentración deseada. Se obtuvieron vesículas de BKC:colesterol (1:1) con EGF incorporado a una concentración de 5 μ M. Los resultados de apariencia física, tamaño medio y potencial-Z se muestran en la Tabla 4. Se observa que la preparación de vesículas es estable y presentan tamaño medio e IPD relativamente pequeño. El tamaño medio, la distribución de tamaño de partículas y el potencial-Z fueron determinados por DLS. Además, de manera similar a las preparaciones de vesículas antes mencionadas, que comprenden en su composición un surfactante catiónico de tipo amonio cuaternario, presentan valores de potencial-Z positivo y

muy superior a + 30 mV, lo cual les predice una elevada estabilidad a largo plazo. En la Figura 3C se observa que predominan las formas esferoidales con estructura unilamelar, según el estudio de morfología de las vesículas realizado por cryo-TEM. Estas vesículas también presentan características que las hacen muy atractivas desde el punto de vista farmacéutico.

Tabla 4. Apariencia física, tamaño medio de partículas y potencial-Z de las vesículas colesterol:BKC:EGF a la composición trabajada.

Composición (EGF:colesterol)	Apariencia física	Tamaño medio (nm) (IPD)*	Potencial-Z (mV) ($\pm$ SD)*
5 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	199,9 (0,335)	+74,4 ($\pm$ 10,0)

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

Ejemplo 5. Síntesis de vesículas de colesterol:CTAB:BSA mediante la tecnología de fluidos comprimidos

Las vesículas se sintetizaron de igual forma a la utilizada en el Ejemplo 2, pero en este ejemplo se utilizó la proteína BSA en disolución acuosa. Se obtuvieron vesículas de CTAB:colesterol (1:1) con BSA incorporada a una concentración de 0,37 μ M, correspondiente a 25 μ g/mL. Los resultados de apariencia física, tamaño medio y potencial-Z se muestran en la Tabla 5. Se observa que la preparación de vesículas es estable y presentan tamaño medio e IPD relativamente pequeño. El tamaño medio, la distribución de tamaño de partículas y el potencial-Z fueron determinados por DLS. También presentan valores de potencial-Z positivo, y muy superior a + 30 mV, lo cual les predice una elevada estabilidad a largo plazo.

Tabla 5. Apariencia física, tamaño medio de partícula y potencial-Z de las vesículas de colesterol:CTAB:BSA a la composición trabajada.

Composición (BSA:colesterol)	Apariencia física	Tamaño medio (nm) (IPD)*	Potencial-Z (mV) ($\pm$ SD)*
0 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	124,2 (0,283)	+70,1 ($\pm$ 11,0)
0.37 μ M:1M	Solución opalescente dispersa	119,9 (0,378)	+76,5 ($\pm$ 10,6)

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

Ejemplo 6. Determinación de la eficiencia de incorporación de las proteínas en las vesículas.

Para determinar la eficiencia de incorporación del EGF en las vesículas se empleó el método de ultracentrifugación, para la separación del EGF libre de las vesículas. Se tomó 1,0 mL de las suspensiones de las diferentes vesículas a evaluar, se colocaron en viales y se centrifugaron a alta velocidad ($100\,000 \times g$), durante 60 min a 4°C. A continuación, el contenido de proteínas en el sobrenadante (EGF libre) fue determinado por un ensayo inmuno-enzimático en fase sólida (ELISA) (Vázquez y col., *Biotechnol. Apl.* 1990, 7: 42-49). La eficiencia de incorporación del EGF en las vesículas fue determinada por la siguiente expresión:

$$\text{Eficiencia de incorporación (\%)} = \frac{[\text{Masa de EGF de partida} - \text{Masa de EGF en el sobrenadante}] * 100}{\text{Masa de EGF de partida}}$$

Los resultados se muestran en la Tabla 6. Se presentan resultados de eficiencia de incorporación del EGF en vesículas con composiciones DPPC:colesterol (obtenidas en el Ejemplo 1), CTAB:colesterol (obtenidas en el Ejemplo 2) y cetrimida:colesterol (obtenidas en el Ejemplo 3). También se evaluó la influencia de la carga de EGF (relación EGF:colesterol). Se pueden observar valores elevados de eficiencia de incorporación (cercaos al 100%) del EGF en los sistemas QUATs:colesterol, para un amplio rango de cargas de EGF (relaciones EGF:colesterol). Sin embargo, los resultados de eficiencia de incorporación del EGF en el sistema DPPC:colesterol fueron muy bajos, la máxima eficiencia de incorporación no sobrepasó el 10% para la mayor carga de EGF.

Tabla 6. Eficiencia de incorporación del EGF a las vesículas de diferentes composiciones.

Composición (EGF:colesterol)	Eficiencia de incorporación (%) (Media $\pm$ STDEV, n=2)		
	DPPC-colesterol	CTAB-colesterol	cetrimida-colesterol
1 μ M:1 M	ND	99,8 $\pm$ 1,3	99,9 $\pm$ 0,5
2 μ M:1 M	ND	99,7 $\pm$ 0,9	99,3 $\pm$ 0,7
5 μ M:1 M	ND	99,7 $\pm$ 0,7	99,0 $\pm$ 0,3
15 μ M:1 M	1,0 $\pm$ 0,2	99,9 $\pm$ 0,5	98,5 $\pm$ 2,6
25 μ M:1 M	2,7 $\pm$ 0,3	99,7 $\pm$ 0,2	98,0 $\pm$ 0,5
40 μ M:1 M	8,7 $\pm$ 0,6	99,9 $\pm$ 0,4	97,9 $\pm$ 1,8

ND-No determinado

En el caso particular de las vesículas que comprenden la BSA, se siguió el mismo procedimiento descrito para el EGF, excepto que la cuantificación de esta proteína se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (micro-BCA) (*Smith y col., Anal. Biochem. 1985, 150: 76-85*). La eficiencia de incorporación de la BSA en las vesículas de CTAB:colesterol preparadas como se describe en el Ejemplo 5 fue de solo el $42 \pm 5\%$. Al comparar la eficiencia de incorporación de la BSA con la del EGF (que se muestra en la Tabla 6), en vesículas de la misma composición CTAB:colesterol, se puede apreciar una incorporación significativamente mayor para el EGF en comparación con la BSA.

Ejemplo 7. Reproducibilidad de la síntesis de vesículas de colesterol:CTAB:EGF mediante la tecnología de fluidos comprimidos

Con el objetivo de comprobar la robustez y reproducibilidad de la metodología utilizada para la síntesis de vesículas de EGF, se midieron el tamaño medio de partícula, el IPD, el potencial Z y la eficiencia de incorporación del EGF en varios lotes de composición 5 μM :1 M y 15 μM :1 M de EGF:colesterol, preparados en fechas diferentes. En las Tablas 7 y 8 se recogen los resultados obtenidos. El tamaño medio de partículas, el IPD y el potencial-Z fueron determinados por DLS. La eficiencia de incorporación del EGF fue determinada según se describe en el Ejemplo 6.

Tabla 7. Características de las vesículas CTAB:colesterol (1:1) con EGF incorporado a una concentración de 5 μM , después de preparadas por DELOS-SUSP.

Código (Fecha)	Diámetro de Partícula (nm)*	IPD	Potencial-Z (mV)*	Incorporación EGF (%)
Lote 1 (26/10/2010)	103,3	0,363	69,5	98,1
Lote 2 (29/10/2010)	96,75	0,376	79,7	97,3
Lote 4 (10/02/2011)	101,4	0,311	77	97,2
Lote 8 (18/11/2011)	92,82	0,351	76	96,6

Lote 10 (10/02/2012)	113,6	0,281	75,9	95,8
Lote 11 (10/02/2012)	111,3	0,335	70,1	98,6

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

Tabla 8. Características de las vesículas CTAB:colesterol (1:1) con EGF incorporado a una concentración de 15 μ M, después de preparadas por DELOS-SUSP.

Código (Fecha)	Diámetro de Partícula (nm)*	IPD	Potencial Z (mV)*	Incorporación EGF (%)
Lote 3 (29/10/10)	141,7	0,419	80,4	99,4
Lote 5 (24/02/11)	139,5	0,278	74	98,1
Lote 6 (28/02/11)	142,2	0,275	72,9	99,7
Lote 7 (29/06/11)	139	0,353	77	99,1
Lote 9 (30/06/11)	140,9	0,357	77,5	98,6
Lote 8 12/07/11	141,4	0,319	76,0	99,5

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

De los valores reportados en las Tablas 7 y 8, puede concluirse que las vesículas presentan características similares, independientemente de su fecha de preparación, lo que permite afirmar que la metodología DELOS-SUP es reproducible y robusta en la preparación de las vesículas de EGF.

Ejemplo 8. Escalado de la síntesis de vesículas de colesterol:CTAB:EGF mediante la tecnología de fluidos comprimidos

Las vesículas se sintetizaron como en el Ejemplo 2, pero a una escala 50 veces superior. Primeramente, una disolución de 3,8 g de colesterol en 144 mL de etanol se introduce en el reactor de alta presión de 300 mL de volumen, a presión

atmosférica y temperatura de trabajo ($T_w = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se adiciona CO_2 comprimido produciendo la expansión volumétrica de la disolución hasta alcanzar una fracción molar $X_{\text{CO}_2} = 0,7$ y una presión de trabajo $P_w = 10\text{ MPa}$. Para alcanzar la total homogenización y el equilibrio térmico, el sistema se deja durante aproximadamente 60 minutos a 10 MPa y $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se despresuriza la disolución líquida expandida desde la presión de trabajo hasta la presión atmosférica, sobre 1200 mL de una disolución de CTAB en agua mQ ($C = 2,83\text{ mg/mL}$) que contiene EGF a la concentración deseada (5 y $12\text{ }\mu\text{M}$). En este último paso, una corriente de N_2 a 10 MPa es utilizada como émbolo para empujar la solución de colesterol en etanol con el objetivo de mantener constante la presión de trabajo dentro del reactor, durante la despresurización. A continuación las vesículas son transferidas a un recipiente que, herméticamente cerrado, es almacenado hasta su uso a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se obtuvieron vesículas de CTAB:colesterol (1:1) con EGF incorporado a una concentración de $5\text{ }\mu\text{M}$ y de $12\text{ }\mu\text{M}$. Los resultados de apariencia física, tamaño medio, IPD y potencial-Z se muestran en la Tabla 9. El tamaño medio de partículas, el IPD y el potencial-Z se determinaron por DLS.

Tabla 9. Apariencia física, tamaño medio de partículas, IPD y potencial-Z de las variantes de vesículas colesterol:CTAB:EGF, para diferentes composiciones, después de preparadas por DELOS-SUSP, a escala piloto.

Composición (EGF:Colesterol)	Apariencia física	Tamaño medio (nm) (IPD)*	Potencial-Z (mV) ($\pm\text{SD}$)*
0 μM :1 M	Solución opalescente dispersa	132,7 (0,224)	+63,1 ($\pm 2,0$)
5 μM :1 M	Solución opalescente dispersa	127 (0,211)	+61,3 ($\pm 2,2$)
12 μM :1 M	Solución opalescente dispersa	160,7 (0,234)	+60,1 ($\pm 2,6$)

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

En la Tabla 9 se puede observar que las vesículas EGF:CTAB:colesterol son estables para las proporciones de $5\text{ }\mu\text{M}$:1 M y $12\text{ }\mu\text{M}$:1 M. Se observa que en el proceso de escalado se obtienen partículas con características físico-químicas comparables a las alcanzadas a la escala de 6 mL (Ejemplo 2). En ambos casos se obtienen tamaños medios de partícula por debajo de 200 nm.

Ejemplo 9. Actividad biológica de las vesículas, evaluada mediante ensayo de proliferación celular en fibroblastos murinos A31 3T3

La actividad biológica de las vesículas de EGF, preparadas como se describe en los Ejemplos del 1 al 3, se determinó mediante un ensayo de proliferación celular (*Mire-Sluis y Page, J. Immunol. Methods* 1995, 187: 191-199). En este caso, se evaluó la capacidad del EGF libre, de los liposomas de EGF y de las diferentes vesículas que comprenden EGF para incrementar la proliferación celular de la línea A31 3T3 de fibroblastos murinos. La actividad biológica de las diferentes suspensiones vesiculares se evaluó aplicando una dilución apropiada de la suspensión directamente sobre las células del ensayo, de modo que las absorbancias de las muestras cayeran dentro del rango de la curva del material de referencia de trabajo, que fue previamente calibrado contra el material de referencia internacional de EGF 91/550, suministrado por el Instituto Nacional para Control y Estándares Biológicos (NIBSC, Reino Unido).

Con el objetivo de comparar la potencia de las diferentes preparaciones vesiculares de EGF con la del EGF libre, fue calculada la actividad específica de las diferentes preparaciones, a partir de los resultados de actividad biológica mediante la siguiente expresión:

$$\text{Actividad específica EGF (UI/mg)} = \frac{\text{Actividad biológica EGF (UI/mL)}}{\text{Concentración de EGF (mg/mL)}}$$

La actividad biológica es medida por el ensayo descrito, y la concentración de proteínas dada por el valor nominal (en mg/mL) de la concentración equivalente de EGF en las diferentes preparaciones vesiculares.

Como control en el ensayo de proliferación celular se utilizaron vesículas blancas (sin la adición de EGF), en correspondencia con las diferentes variantes ensayadas. En estas muestras, a diluciones menores que las utilizadas para las vesículas con EGF, no se detectó ningún efecto citotóxico ni de incremento de la proliferación.

En la Figura 4A se observa que las vesículas de EGF con composición CTAB:colesterol presentan una actividad específica incrementada, en comparación con el EGF libre, y con las vesículas de EGF con composición DPPC:colesterol. En la Figura 4B, también se observa un resultado similar al anterior, cuando se empleó cetrimida en lugar del CTAB en la composición de vesículas preparadas por el mismo procedimiento. El propósito de esta evaluación fue determinar si la

funcionalidad biológica del EGF se afectó por los componentes o por el proceso de síntesis de dichas vesículas. Sin embargo, para las vesículas con composición QUATs:colesterol se encontró un incremento inesperado en la actividad biológica específica del EGF.

Ejemplo 10. Resistencia a las proteasas del EGF integrado a vesículas de QUATs:colesterol

Se emplearon vesículas de EGF con composiciones QUATs:colesterol (1:1), preparadas según los Ejemplos 2 y 3 de la presente invención. Este experimento se realizó para evaluar la capacidad de las vesículas de QUATs:colesterol para preservar la estabilidad del EGF integrado frente a las proteasas. Es conocido que las heridas crónicas, como las úlceras del pie de diabético, presentan un ambiente proteolítico que puede afectar la biodisponibilidad de los medicamentos utilizados para su tratamiento (*Bennett y Schultz, Am. J. Surg. 1993, 166: 74-81*).

Para realizar esta evaluación se utilizó la tripsina como proteasa modelo. La reacción enzimática fue preparada en tampón Tris-HCl pH 8,5 y concentración de 20 mM, conteniendo una concentración final de tripsina de 0,5 µg/mL. La concentración final de EGF libre o el equivalente de EGF en las diferentes preparaciones vesiculares fue de 125 µg/mL. La incubación de las muestras se realizó por períodos de 4, 8, 16 o 24 horas a 37 °C. Para detener la reacción enzimática se utilizó ácido trifluoroacético (TFA), a una concentración final de 0,1% (v/v).

Después de detener la reacción, las muestras se diluyeron en metanol absoluto, hasta una concentración final del 80% (v/v) de metanol, se agitaron y se centrifugaron en centrifuga de mesa a 10 000 rpm, durante 5 minutos. Finalmente, los sobrenadante de centrifugación se filtraron a través de filtros de polycarbonato con 0,2 µm de tamaño de poro; y a continuación se aplicaron a un sistema HPLC (Merck, Alemania). Las muestras del patrón de EGF y de las vesículas fueron analizadas empleando una columna de fase inversa C18 (Vydac, Hesperia, CA, Estados Unidos) y detectadas a 226 nm. Para ello, se empleó un gradiente lineal del 20% al 40% de B, durante 28 minutos. La fase móvil A consiste de 0,1% de TFA/agua, y la fase móvil B consiste de una solución al 0,05% TFA/Acetonitrilo. El volumen de inyección analizado fue de 5,0 mL, correspondiente a aproximadamente

20 µg de EGF. La velocidad de flujo utilizada fue de 1,0 mL/minuto. La concentración de EGF en las muestras se cuantificó, por interpolación con una curva de calibración del área bajo el pico principal de EGF, y la concentración de EGF de muestras conocidas, a partir de los cromatogramas obtenidos a 226 nm. El porcentaje remanente de EGF en cada muestra, después de la incubación con tripsina, fue calculado a partir de la siguiente expresión:

$$\text{EGF Remanente (\%)} = \frac{\text{Conc. EGF después de incubado con tripsina (\mu\text{g/mL}) * 100}{\text{Conc. EGF antes de incubación con tripsina (\mu\text{g /mL})}$$

En la Figura 5A se observa que las vesículas de EGF con composición CTAB:colesterol presentan una estabilidad incrementada frente a tripsina, con respecto al EGF libre, durante un período de 24 horas. De forma similar, en la Figura 5B, se observa que las vesículas de EGF con composición cetrimida:colesterol presentan un comportamiento similar al anteriormente descrito. Entre las diferentes cargas de EGF evaluadas (relación EGF:colesterol) no se encontraron diferencias significativas.

Los resultados obtenidos para la estabilidad frente a proteasas del EGF incorporado a las vesículas de QUATs:colesterol mostraron que, de forma sostenida, las vesículas de EGF presentan una estabilidad mucho mayor que la del EGF libre.

Ejemplo 11. Demostración de la actividad antimicrobiana de las vesículas de QUATs:colesterol

Suspensiones de vesículas que comprenden QUATs:colesterol fueron evaluadas para determinar si presentaban actividad antimicrobiana. Esta actividad fue determinada mediante el método de difusión en agar (*Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. Washington, DC: ASM; 1995). La efectividad de las diferentes suspensiones a evaluar fue ensayada contra bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*); Gram negativas (*E. coli*, *Proteus mirabilis*); y contra hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*); mediante la técnica de los pocillos en placas de agar nutriente. Estos microorganismos fueron identificados y suministrados por la colección de microorganismos BCCM/LMG (Bélgica). Las bacterias fueron cultivadas toda la noche a 37 °C en Caldo de Triptona Soya (Oxoid), y los hongos se incubaron durante 72 horas a 28 °C, en Caldo de

Sabouraud Dextrosa (Oxoid). Estas suspensiones se utilizaron como inóculos. Un inóculo final, utilizando 100 μ l de una suspensión que contiene 10^8 unidades formadoras de colonia/ml de bacterias, o 10^4 esporas/ml de hongo, fue esparcido en las placas de Agar Triptona Soya y de Agar Sabouraud Dextrosa (Oxoid), respectivamente. El disco (6 mm de diámetro) fue impregnado con cada una de las diferentes suspensiones de vesículas a ensayar. Ciprofloxacina y Fluconazol (100 μ g/ml) fueron utilizados como controles positivos para bacterias y hongos, respectivamente. Las placas de ensayo fueron incubadas a 37 °C por 24 horas para bacterias, y a 28 °C por 72 horas para hongos, dependiendo del tiempo de incubación requerido para un crecimiento visible.

En la Tabla 10 se observa que las diferentes suspensiones de vesículas mostraron un efecto antimicrobiano frente a las bacterias Gram positivas y a los hongos. En general, los microorganismos fueron más sensibles a las suspensiones vesiculares con composición cetrimida:colesterol que a las de CTAB:colesterol. Frente a ciertos microorganismos, algunas suspensiones vesiculares mostraron actividades antibacteriana y antifúngica comparable con la ciprofloxacina y el fluconazol, respectivamente.

Tabla 10. Actividad antimicrobiana y fungicida de diferentes suspensiones de vesículas de QUATs:colesterol frente a bacterias y hongos.

Suspensiones vesiculares	Actividad antimicrobiana (Zona de inhibición en mm)				Actividad fungicida (Zona de inhibición en mm)	
	<i>B.</i>	<i>S.</i>	<i>E.</i>	<i>P.</i>	<i>A.</i>	<i>C.</i>
	<i>subtilis</i>	<i>aureus</i>	<i>coli</i>	<i>mirabilis</i>	<i>niger</i>	<i>albicans</i>
CTAB:colesterol (1:1)	22	18	R	10	16	16
CTAB:colesterol (1:1) con EGF incorporado a 5 μ M	12	6	R	4	6	6
Cetrimida:colesterol (1:1)	26	16	4	14	18	18
Cetrimida:colesterol (1:1) con EGF incorporado a 5 μ M	24	18	4	10	18	18
Control	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacina	22	20	18	18	-	-
Fluconazol	-	-	-	-	21	22
R-Resistente						

Ejemplo 12. Manufactura de una formulación líquida en forma de atomizador “spray” que contiene las vesículas de EGF.

Una suspensión de vesículas de CTAB:colesterol (1:1) con composición EGF:colesterol 5 μ M:1 M, obtenidas según el Ejemplo 2, con concentración equivalente de EGF de 25 μ g/mL, se diluyó hasta la concentración equivalente de 15 μ g/mL, en solución tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7,2. Esta solución final también contiene 17% (v/v) de glicerol, 10% (v/v) de etanol, 0,02% (w/v) de butilhidroxitolueno (BHT), 0,18% (w/v) de metilparabeno y 0,02% (w/v) de propilparabeno. La dispersión resultante se filtró, a través de filtros esterilizantes de 0,2 μ m de acetato de celulosa, y dispensó en bulbos de vidrio bajo atmósfera de nitrógeno.

Ejemplo 13. Manufactura de una formulación en gel que contiene las vesículas de EGF.

Una suspensión de vesículas de cetrimida:colesterol (1:1) con composición EGF:colesterol 5 μ M:1 M, obtenidas según el Ejemplo 3, con concentración equivalente de EGF de 25 μ g/mL, se diluyó hasta la concentración equivalente de 15 μ g/mL. Esta formulación contiene tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,2; y Carbomer (Carbopol 940), a una concentración final de 1,25% (w/v); glicerol al 3% (w/v); y 20 mM de L-metionina. Además, la formulación contiene 0,02% (w/v) de BHT, y como preservante antimicrobiano 0,18% (w/v) de metilparabeno y 0,02% (w/v) de propilparabeno.

Ejemplo 14. Manufactura de una formulación parenteral que contiene las vesículas de EGF.

Una suspensión de vesículas de BKC:colesterol (1:1), con composición EGF:colesterol 5 μ M:1 M, obtenidas según el Ejemplo 4 con concentración equivalente de EGF de 25 μ g/mL, fue introducida en la celda del dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial Sartocon Slice 200. Para la ultrafiltración de las vesículas, se utilizaron cassettes con membrana Hydrosart®, con tamaño de poro de 30 kDa. El proceso de concentración-diafiltración se realizó a temperatura de 25 ± 3 °C, y la caída de presión máxima a la entrada del cassette se mantuvo por debajo de 4 bar. En el proceso, la suspensión se concentró 5 veces (concentración

final equivalente de EGF de 125 µg/mL). Después de concentradas, las vesículas se diluyeron en tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7,2; hasta una concentración equivalente de 75 µg/mL de EGF. Esta formulación contiene, además, 20 mM de L-metionina y 0,02% (w/v) de BHT. La suspensión resultante se filtró a través de filtros esterilizantes 0,2 µm y dispensó en bulbos de vidrio bajo atmósfera de nitrógeno.

Ejemplo 15. Comparación del efecto farmacodinámico de liposomas y vesículas que comprenden EGF en modelos animales de cicatrización

Metodología experimental:

Para evaluar la eficacia farmacológica de las formulaciones que se mencionan a continuación, se desarrolló un modelo experimental de úlcera crónica de grosor total en la espalda de las ratas. Se emplearon ratas Sprague Dawley de 250-270 gramos de peso, las cuales fueron aleatoriamente asignadas para constituir 7 grupos experimentales, con 10 animales cada uno. Las ratas fueron anestesiadas con la combinación de ketamina/xylazina, por vía intraperitoneal, para depilar su región dorsal extensamente. Se realizaron dos úlceras simétricas, bilaterales y retroescapulares, de 8 mm de diámetro, y de grosor total hasta la fascia superior que fue respetada. De inmediato, se comenzó a aplicar acetónido de triamcinolona, en forma de compresa, una vez al día durante los tres primeros días, para arrestar la cicatrización e inducir los cambios propios de la cronificación. Transcurridos 7 días, se constató el arresto del proceso de cicatrización y la cronificación de las úlceras, por la ausencia de tejido de granulación y la hipertrofia de los bordes epiteliales. A partir de este momento se comenzó a realizar la aplicación de los tratamientos a estudiar, como se describe a continuación:

Grupo 1: libre de tratamiento (salina). Se realizó bajo las mismas condiciones de manejo y manipulación que el resto de los grupos, y se aplicó, de forma nebulizada, solución salina fisiológica estéril.

Grupo 2: liposomas vacíos de DPPC-colesterol.

Grupo 3: vesículas vacías de CTAB-colesterol.

Grupo 4: vesículas vacías de cetrimida-colesterol.

Grupo 5: liposomas de DPPC-colesterol cargados con EGF, a una concentración de 25 µg/ml.

Grupo 6. vesículas de CTAB-colesterol cargadas con EGF a 25 µg/ml.

Grupo 7. vesículas de cetrimida-colesterol cargadas con EGF a 25 µg/ml.

Las heridas se higienizaron diariamente. Luego de la higienización de las mismas, a cada grupo se aplicó la suspensión que se indica en cada caso. La aplicación de las suspensiones se realizó dos veces al día, durante 14 días. Los sistemas experimentales fueron tratados mediante la aplicación tópica de las suspensiones de vesículas o liposomas mediante nebulización.

Todos los animales fueron sometidos a autopsia y toma de muestras, transcurridos 14 días después de haber comenzado el tratamiento asignado para cada grupo. Las muestras se fijaron en formalina neutra al 10%, y 72 horas más tarde se hemiseccionaron uniformemente, para su posterior inclusión en parafina. Las coloraciones empleadas fueron las siguientes: Hematoxilina-Eosina, reacción tricrómica de Mallory, Verhoeff y Reticulo de Gomori. Las muestras fueron analizadas a ciegas por dos investigadores independientes.

Resultados:

No resultó necesario excluir úlceras contaminadas, de tal manera se emplearon 20 lesiones en total para cada uno de los 6 grupos experimentales. Resumidamente, se pudo constatar que todas las formas de presentación farmacéutica de las vesículas de EGF estimularon significativamente el proceso de curación total, al compararse con grupos de vesículas sin EGF (blanco), los liposomas cargados con EGF a 25 µg/ml, y el grupo control experimental tratado con salina. Los datos registrados refieren el promedio de dos estudios independientes y hechos en diferentes momentos. Se utilizaron la U- de Mann Whitney y la prueba *t*-de student para efectuar las comparaciones. Todos los parámetros cumplieron con el criterio de distribución normal. Los parámetros estudiados y los resultados se muestran a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11. Efecto farmacodinámico de las suspensiones evaluadas en un modelo de herida crónica en ratas.

Grupo experimental	Infiltrado inflamatorio (grados de 1-5)	Respuesta fibroangiogénica (de 1-5 puntos)	Migración epitelial (en micras)	% de contracción de bordes
Grupo 1: salina	4,61 ±1,03	2,87±0,65	3,0±1,1x10 ³	23,6±5,11
Grupo 2: liposomas vacíos de DPPC –	4,27 ± 0,02	3,2±0,96	2,5±0,7x10 ³	18,55±3,21

colesterol				
Grupo 3: vesículas vacías de CTAB-colesterol	3,8 ±1,00	2,56±0,93	2,97±1,6x10 ³	21,9±4,63
Grupo 4: vesículas vacías de cetrimida-colesterol	4,51 ±0,95	2,64±0,55	2,8±1,5x10 ³	31,02±1,81
Grupo 5: liposomas de DPPC-colesterol cargados con EGF	2,9 ±0,88*	3,81±0,87*	4,6±1,04x10 ³ *	63,7±6,75*
Grupo 6: Vesículas de CTAB-colesterol cargadas con EGF	1,18 ±0,04**	4,2±0,18**	6,27±0,27x10 ³ **	88,7±6,26**
Grupo 7: Vesículas de cetrimida-colesterol cargadas con EGF	1,12 ±0,07**	4,17±0,25**	7,02±0,53x10 ³ **	85,3±7,01**

* Significa un valor de $p \leq 0,05$; ** Significa un valor de $p \leq 0,01$.

El experimento evidencia que las vesículas de CTAB-colesterol y de cetrimida-colesterol cargadas con EGF tuvieron un potente efecto cicatrizante. Es notorio el efecto anti-inflamatorio constatado para los grupos 6 y 7, en comparación con el resto de los tratamientos. Es posible que el efecto de promoción fibroangiogénica y de contracción se relacione con la reducción del balance de células inmuno-inflamatorias infiltradas en la neodermis. Similarmente, se constató un marcado efecto promotor de la migración epitelial, evidenciándose al microscopio la presencia de una epidermis estratificada. La respuesta obtenida para el grupo tratado con los liposomas cargados con EGF fue menor que la detectada en los grupos 6 y 7. La superioridad de los tratamientos que incluyeron las suspensiones de vesículas cargadas con EGF, aplicados sobre los grupos 6 y 7, se puso también de manifiesto en otro experimento semejante, donde se indujo la cronicidad de las heridas mediante la aplicación tópica de metilglioxal.

Ejemplo 16. Tratamientos basados en la aplicación tópica de las vesículas que comprenden EGF a pacientes con úlceras de pie diabético

Para los casos clínicos; la mayoría de las lesiones tratadas superaban el 90% de probabilidad de amputación, de acuerdo a la escala establecida por la Universidad de Texas. Los tratamientos fueron administrados por vía tópica.

Características generales de los pacientes tratados:

Diabetes mellitus tipo I y II de larga evolución, medicados con insulina, sulfonilureas o biguanidas como hipoglicemiantes orales. Tenían antecedentes personales de mala cicatrización, en tanto que algunos de ellos ya habían experimentado una amputación contralateral previa. Todas las lesiones de los miembros inferiores abordadas con los tratamientos correspondieron a pie diabético isquémico o neuropático. Las lesiones, en su conjunto, fueron clasificadas como crónicas, complejas y recalcitrantes. El período evolutivo de la lesión medió entre menos de un mes y 7 años. La talla de las lesiones tratadas se encontraba comprendida entre los 20 y 80 centímetros cuadrados. La profundidad en algunas lesiones llegó a comprometer el periostio. Desde el punto de vista anatómico las lesiones tratadas se encontraban en la región lateral, calcáneo y/o metatarsiana. Todos los pacientes recibieron los primeros tratamientos bajo régimen de ingreso intrahospitalario, en tanto que fue necesario realizar procedimientos exceréticos bajo anestesia, así como antibióticoterapia por vía parenteral. Ante la cicatrización o granulación total de la herida con evidencias de migración epitelial; los pacientes fueron sometidos a régimen ambulatorio y seguimiento en días alternos para su cura y medicación. Luego de la epitelización total, cada paciente fue seguido hasta 12 meses de cicatrizado. Con este propósito se realizó la evaluación de la ocurrencia de recidivas, registro de reacciones adversas y evaluación del estado general del paciente.

En la Tabla 12 se muestran las características demográficas y epidemiológicas de la cohorte de pacientes que recibieron los tratamientos por vía tópica.

Tabla 12. Características demográficas y epidemiológicas de la cohorte de pacientes que recibió tratamiento tópico.

Identif.	Edad	Sexo	Tipo de DM*	Tiempo de Evolución de la DM	Clasificación de la lesión	Evolución de la lesión	Tipo de lesión
JLG	56a**	M	II	15 a	Neuropático con componente isquémico	2 años	Frontal extensa residual después de amputación transmetatarsiana
OFS	65 a	F	II	17 a	Neuropático con patrón calcificado proximal.	21 días	Wagner III. Cara anterolateral del pie. Extremidad inferior derecha
AVL	52 a	M	II	9 a	Neuropático puro	7 años	Plantar, granulada por 7 años sin evidencias de contracción/epitelización
PAT	47 a	M	II	12 a	Isquémico con Índice tobillo-brazo (ITB) de 0,5	32 días	Wagner IV. Base residual de amputación transmetatarsiana
GMA	69 a	M	II	10 a	Neuropático puro	6 meses	Frontal residual después de amputación transmetatarsiana

* DM: Diabetes mellitus, ** a: años

A continuación se describe la conducta terapéutica seguida con cada uno de los pacientes.

Paciente JLG. Masculino de 56 años, controlado con insulina y sin otras complicaciones clínicamente manifestadas de diabetes. Presenta lesión extensa frontal con componente isquémico, que persiste después de dos años de amputación transmetatarsiana. Sin resultados en los procesos de granulación y epitelización después de la institución de terapias antimicrobiana y con ozono durante dos años. Después de realizada la limpieza quirúrgica y la reanimación de los bordes se procedió al tratamiento, en días alternos, con la formulación tópica en forma de atomizador "spray" que se describe en el Ejemplo 12, que contiene vesículas de EGF:CTAB:Colesterol. En ocho semanas de tratamiento se logró la total epitelización de la lesión. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Paciente OFS. Femenina, fumadora, obesa y con antecedentes de hipertensión arterial. Controlada con hipoglicemiantes orales. A punto de partida de una picadura local, se presenta necrosis galopante de partes blandas y tendones. Se procede a la cirugía excrética del material necrótico. Se instituye terapia antimicrobiana y la lesión es curada en días alternos. Debido a que transcurridos 14 días de la intervención el proceso de granulación es torpido y lento se comienza a aplicar el tratamiento, en días alternos, con la formulación tópica en forma de atomizador "spray" que se describe en el Ejemplo 12 que contiene vesículas de EGF:CTAB:Colesterol. En ocho semanas de tratamiento se logró la total epitelización de la lesión.

Paciente AVL. Masculino de 52 años, controlado con glibenclamida, pie de Charcot neuropático es una lesión plantar que ha granulado desde hace 7 años, pero sin evidencias de contracción / epitelización. Luego de realizada la limpieza quirúrgica y la reanimación de los bordes se procedió al tratamiento, en días alternos, con la formulación tópica en forma de gel que se describe en el Ejemplo 13, que contiene vesículas de EGF:Cetrimida:Colesterol. En ocho semanas de tratamiento se logró la total epitelización de la lesión.

Paciente PAT. Masculino de 47 años, sin otras comorbilidades o complicaciones clínicamente manifestadas de la diabetes, aún cuando se detectó una enfermedad arterial periférica. Como consecuencia de un trauma local, desarrolla un absceso transmetatarsiano que le conduce a necrosis licuefactiva de casi todo el antepié con marcados signos flogísticos. Se practica una amputación transmetatarsiana y se comienza con antibióticoterapia. Como consecuencia de que la base residual de

amputación no evolucionó satisfactoriamente luego de 30 días, teniendo que practicarse extensas debridaciones por la presencia de microplacas isquémicas; se decide intervenir al paciente con la formulación tópica en forma de gel que se describe en el Ejemplo 13, que contiene vesículas de EGF:Cetrimida:Colesterol. La formulación se aplicó en los bordes y superficie de la herida. Los tratamientos se practicaron en días alternos y se extendieron por 4 semanas. Desde la primera administración se eliminó la presencia de las placas isquémicas y se comenzó a desarrollar un tejido de granulación productivo y sangrante, que posteriormente facilitó la aplicación de un injerto de grosor parcial libre de piel.

Paciente GMA. Masculino de 69 años, controlado con insulina y sin otras complicaciones clínicamente manifestadas de diabetes. Presenta lesión frontal residual que persiste después de 6 meses de amputación transmetatarsiana. Sin resultados en los procesos de granulación y epitelización después de la institución de terapias antimicrobiana y con ozono durante 3 meses. Después de realizada la limpieza quirúrgica se procedió al tratamiento, en días alternos, con la formulación tópica en forma de atomizador "spray" que se describe en el Ejemplo 12, que contiene vesículas de EGF:CTAB:Colesterol. En seis semanas de tratamiento se logró la total epitelización de la lesión.

Ejemplo 17. Tratamientos basados en la infiltración de vesículas de EGF a pacientes con úlceras de pie diabético

Para los casos clínicos; la mayoría de las lesiones tratadas superaban el 90% de probabilidad de amputación de acuerdo a la escala establecida por la Universidad de Texas. Los tratamientos fueron administrados por la vía infiltrativa. Las características generales de los pacientes tratados coinciden con las descritas en el Ejemplo 16.

Para el tratamiento infiltrativo se utilizó la formulación parenteral referida en el Ejemplo 14, que utiliza vesículas de EGF:BKC:colesterol. Este tratamiento tiene su esencia en la inyección intra- y perilesional interna en bordes y fondos de la lesión de forma equidistante en cada punto. El material se deposita dirigiendo la aguja en un ángulo de 15-45 grados hacia la base de la úlcera o hacia lo profundo de la cuña, incluyendo siempre la unión dermo-epidérmica para estimular la contracción de los bordes. En cada punto se depositaron entre 100 y 1000 µL, en dependencia del

aspecto clínico del tejido y de sus características. Se realiza de dos a tres veces por semana. Las lesiones tratadas y las características demográficas de la población tratada se describen en la Tabla 13. En todos los casos tratados se previno la práctica de amputación menor o mayor.

Tabla 13. Características demográficas y epidemiológicas de la cohorte de pacientes que recibió tratamiento infiltrativo.

Identif.	Edad	Sexo	Tipo de DM*	Tiempo de Evolución de la DM	Clasificación de la lesión	Evolución de la lesión	Tipo de lesión
HCJQ	65a**	F	II	13 a	Isquémico. No pulsos distales. ITB de 0,5	33 días	Wagner IV. Base residual de amputación del 5to dedo
OFW	53 a	M	II	21 a	Neuropático con macroangiopatía calcificada e índice de ITB de 1,2	81 días	Wagner IV. Base residual de amputación transmetatarsiana
JIFM	61 a	F	II	16 a	Isquémico con ausencia de pulsos e índice ITB de 0,5	21 días	Wagner V. Fascitis necrotizante de zona del metatarso y plantar de la extremidad inferior izquierda

* DM: Diabetes mellitus, ** a: años

A continuación se describe la conducta terapéutica seguida con cada uno de los pacientes.

Paciente HCJQ. Isquémico, sin pulso distal y ocluido desde el sector poplíteo. La lesión consiste en una base residual de amputación lateral del quinto dedo, que muestra cápsulas y tendones expuestos en franca necrosis isquémica. La lesión fue

clasificada como grado IV de la escala de Wagner. Talla de 10 x 4 centímetros. El tratamiento se instituye cuando, al sexto día de la amputación, la base residual de amputación se apreciaba clínicamente atónica y cianótica, progresando de esta forma por 5 días, a pesar de todas las acciones farmacológicas sistémicas y locales. Se inician las infiltraciones luego de desbridación quirúrgica del material necrótico; con la expectativa de mejorar el microambiente local y favorecer la aparición del tejido de granulación. Este se comenzó a observar a partir de la quinta sesión de infiltración. La paciente recibió un total de 12 sesiones de infiltración. El tratamiento favoreció la presencia de un tejido de granulación productivo y sangrante. Se observó intensa migración epitelial centripeta, aunque no marcada contracción de los bordes. Transcurridos 38 días de iniciado el tratamiento la lesión había epitelizado totalmente sin necesidad de injerto. No se observaron reacciones adversas agudas o tardías. A los 12 meses la lesión se encontraba libre de recurrencias locales.

Paciente OFW. Neuropático de 81 días de evolución con una base residual de amputación trans-metatarsiana clasificable como Wagner IV al momento de ingreso en el servicio. La talla de la lesión es de 14 x 7 centímetros cuadrados. Se perciben los pulsos distales con un ITB de 0,9, aunque con signos de disestesia. El tratamiento se instituye cuando, por espacio de 42 días de curas locales y aplicación de compresas de solución salina fisiológica, la lesión evidencia muy pobre respuesta granulativa. Se comienzan las infiltraciones y se realizan con frecuencia diaria durante la primera semana de tratamiento para rescatar las células locales. Posteriormente, se continúa a un régimen de dos veces a la semana, por tres semanas. Con este esquema se logró granulación productiva y sangrante total. El tejido fue cubierto con un injerto de grosor parcial de piel obtenida de la región anterior del muslo contralateral. De forma similar a la paciente anteriormente descrita, el tratamiento fue bien tolerado y al año la lesión se mantuvo epitelizada.

Paciente JIFM. Femenino, exfumador de 61 años de edad. ITB de 0,4 en la extremidad inferior izquierda que muestra una fascitis necrotizante en la zona del metatarso y la planta del pie. La lesión se clasifica como grado V de la escala de Wagner. La paciente es tratada quirúrgicamente, practicándose la exéresis de todo el tejido necrótico y/o contaminado blando y óseo. Se establece un régimen de antibióticoterapia polivalente por vía sistémica. Transcurridas 48 horas de la intervención quirúrgica se practica la primera inspección de la lesión, se realiza su

higienización local y se comienza el tratamiento infiltrativo con las vesículas. Se instauró durante los primeros 10 días un régimen de tratamiento en dosis de ataque con las vesículas de EGF, que posteriormente permitió reducirse a dos sesiones de infiltración por 5 semanas. El tratamiento permitió salvar un pie sin alternativa terapéutica. La paciente tiene marcha normal y un dominio motor satisfactorio de la porción distal de la extremidad.

Ejemplo 18. Tratamientos basados en la aplicación combinada infiltrable y tópica empleando vesículas de EGF a pacientes con úlceras de pie diabético

Para los casos clínicos; la mayoría de las lesiones tratadas superaban el 90% de probabilidad de amputación, de acuerdo a la escala establecida por la Universidad de Texas. Los tratamientos fueron administrados combinando las vías infiltrativa y tópica. Las características generales de los pacientes tratados coinciden con las descritas en el Ejemplo 16.

Para el tratamiento combinado se utilizó primeramente la vía infiltrativa, empleando la formulación parenteral que comprende vesículas de EGF (referida en el Ejemplo 14). Después, para la vía tópica, se utilizaron alternativamente la formulación en forma de atomizador descrita en el Ejemplo 12 y la formulación en gel descrita en el Ejemplo 13.

Las características demográficas de la población tratada, y de las lesiones, y se describen en la Tabla 14. En todos los casos tratados se previno la práctica de amputación menor o mayor.

Tabla 14. Características demográficas y epidemiológicas de la cohorte de pacientes que recibió tratamiento combinado por vía infiltrativa y tópico.

Identif.	Edad	Sexo	Tipo de DM*	Tiempo de Evolución de la DM	Clasificación de la lesión	Evolución de la lesión	Tipo de lesión
AFG	74a**	M	II	22 a	Isquémico. Patrón oclusivo poplíteo. ITB de 0,5	20 días	Wagner grado V. Necrosis de partes blandas de calcáneo y toma ósea

LATR	61 a	F	II	18 a	Isquémico – aórtico bifemoral con macroangiopa- tia y ITB de 0,4	50 días	Base residual de amputación supracondilea con placa isquémica. Wagner grado IV.
ZEM	57a	F	II	22a	Neuropático puro	7 años	Plantar extensa, granulada por 7 años sin evidencias de contracción / epitelización
JLHB	63 a	M	II	18a	Neuro- isquemico	7 años	Absceso de partes blandas de la planta del pie y región lateral interna- media de la extremidad inferior derecha. Wagner grado IV.

* DM: Diabetes mellitus, ** a: años

A continuación se describe la conducta terapéutica seguida con cada uno de los pacientes.

Paciente AFG. Masculino con diabetes de larga data e historia de mala adherencia a los tratamientos. Manifiesta patrón de oclusión poplítea con ausencia de pulsos distales. La lesión debuta en forma de una flictena que se contamina y galopa rápidamente hasta necrosar todas las partes blandas de la región del calcáneo. En una primera cura quirúrgica se eliminan las partes blandas. Cinco días más tarde se hace necesaria otra intervención quirúrgica que conduce a la devastación del material óseo. Se establece una intensa terapia polivalente con antibióticos y al

término de 20 días de la primera intervención quirúrgica se comienza el tratamiento con las vesículas de EGF en forma infiltrativa. Se establece una sesión de tratamiento y cura local diaria en las dos primeras semanas. A continuación se procede mediante curas y tratamientos en días alternos con la formulación tópica en forma de gel que se describe en el Ejemplo 13, que contiene vesículas de EGF:cetrimida:colesterol preparados según el ejemplo 3 en los bordes y superficie de la herida, durante las 8 semanas posteriores. Transcurridas 10 semanas de tratamiento la lesión había epitelizado totalmente.

Paciente LATR. Isquémico carente de pulsos distales y enfermedad macrovascular de ambos miembros inferiores. Existencia de un ITB de 0,6; sin posibilidades de cirugía revascularizadora por las calcificaciones. Amputación contralateral previa tres años atrás. Presenta trombosis de las arterias finas del cuarto y quinto dedo realizándose amputación de estos con cuña lateral extensa y profunda. Transcurridas dos semanas de la cirugía, la base residual de amputación evidenciaba signos de atonía y refractario a la granulación. De tal modo, a la tercera semana se inicia el tratamiento con las vesículas, empleándose inicialmente el tratamiento infiltrativo con una dosis entre 25 y 125 µg de EGF por punto de inyección, siendo depositado en los bordes y fondos de la zona quirúrgica. Esta modalidad de tratamiento se empleó hasta lograr cubrir todas las cavidades y túneles con tejido de granulación, lo cual aconteció aproximadamente a las tres semanas. Posteriormente se decidió continuar empleando el tratamiento por la vía tópica, en forma de gel, con la composición que se describe en el Ejemplo 13, y que contiene vesículas de EGF:cetrimida:colesterol. El tratamiento se realiza en los bordes y superficie de la herida, haciendo énfasis especialmente en el borde dermo-epitelial de las heridas para estimular la re-epitelización. El tratamiento se realizó en días alternos y hasta epitelización total en 5 semanas.

Paciente ZEM. Femenino de 57 años, con lesión grado III de Wagner y evidencias de neuropatía, lesión plantar que ha granulado desde hace 7 años, pero sin evidencias de contracción / epitelización. Luego de realizada la limpieza quirúrgica y la reanimación de los bordes se procedió al tratamiento infiltrativo con una dosis de 75 µg equivalentes de EGF por punto de inyección, con la formulación que se describe en el Ejemplo 14, que contiene vesículas de EGF:BKC:colesterol, siendo depositada en los bordes de la zona quirúrgica. Esta modalidad de tratamiento se aplicó durante las cuatro primeras semanas en días alternos. Posteriormente, se

decidió continuar empleando el tratamiento, en días alternos, con la formulación tópica en forma de atomizador "spray" que se describe en el Ejemplo 12, que contiene vesículas de EGF:CTAB:colesterol. Para el tratamiento se atomizan las vesículas de EGF en los bordes y superficie de la lesión; haciendo énfasis especialmente en el borde dermo-epitelial de las heridas para estimular la re-epitelización, el tratamiento se realizó en días alternos y hasta epitelización total en 8 semanas. La evolución del proceso de cicatrización se muestra en la Figura 7.

Paciente JLHB. Neuropático que desarrolla una lesión infecciosa extensa a punto de partida de una quemadura seca en el pie de la extremidad inferior derecha. Finalmente, desemboca en una amputación transmetatarsiana, a la que se le añade una cuña lateral de 10 centímetros de longitud. Se instaura tratamiento con antibióticos por vía endovenosa y cura local sistemática cada 48 horas. La lesión mostró tendencia a granular muy lentamente y a la atonía de los bordes, transcurridos 20 días de la intervención. Se instituye el tratamiento infiltrativo de las vesículas con una carga de 75 µg de EGF en días alternos, en la base residual, así como en la cuña. A la tercera semana de tratamiento se inicia la aplicación, en días alternos, con la formulación tópica en forma de atomizador "spray" que se describe en el Ejemplo 12, que contiene vesículas de EGF:CTAB:colesterol, hasta llegar a la zona profunda de la cuña lateral. La combinación de los tratamientos aceleró la granulación total, así como la epitelización espontánea de un área de más de 60 centímetros cuadrados.

Ejemplo 19. Demostración de la eficacia terapéutica del uso de las vesículas de EGF en un modelo letal de lesión pulmonar aguda (LPA) o síndrome de distress respiratorio de adulto (SDRA) en ratas.

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos, con peso corporal entre 250 y 280 gramos. La lesión pulmonar fue inducida bajo anestesia general (ketamina/xilazina), mediante instilación endotraqueal de una combinación basada en lipopolisacárido (LPS)-zymosan. Inmediatamente después, los animales fueron aleatorizados y asignados a tres grupos experimentales de 12 animales cada uno.

Grupo A: tratado con solución salina fisiológica.

Grupo B: tratado con aerosol de EGF en suero fisiológico, concentración de 25 µg/ml/kg.

Grupo C: tratado con las vesículas de colesterol:BKC:EGF descritas en el Ejemplo 4, con concentración equivalente de 25 µg/mL de EGF, y administradas como en el Grupo B.

Los animales se dejaron evolucionar sin tratamiento alguno hasta la instauración de los primeros síntomas. Seis horas después de la aplicación del LPS/zymosan, las ratas mostraron taquipnea asociada a espiración forzada. A este punto los animales mostraban un patrón de saturación de PO₂ arterial de 65% y franca acidosis respiratoria.

Los tratamientos comenzaron, por tanto, aproximadamente a las 8 horas de instilarse las toxinas. El experimento estuvo encaminado a evaluar el efecto del tratamiento con las dos formulaciones de EGF exclusivamente sobre la fase aguda del SDRA. Los tratamientos se realizaron mediante una mascarilla oro-facial adaptada de una máquina de anestesia volátil. Los tratamientos se realizaron dos veces al día. De forma coadyuvante los animales fueron tratados también con acetato de hidrocortisona (10 mg/kg) una vez al día.

Transcurridas 72 horas de iniciados los tratamientos el estudio fue detenido. Los animales sobrevivientes fueron anestesiados y sometidos a lavado bronco-alveolar profundo, en 5 ml de salina estéril, para estudio citológico y bioquímico, así como a extracción de sangre arterial, para la determinación de los parámetros gasométricos. Seguidamente los pulmones fueron insuflados con 10 ml de formalina neutra al 10% y procesados para estudio histológico.

La Tabla 15 muestra los resultados de la mortalidad diaria por grupo. Como puede observarse, el tratamiento con la nebulización de EGF controló la progresión del daño pulmonar agudo. Notoriamente, el mejor efecto en términos de sobrevida corresponde al grupo que recibió el EGF incorporado a vesículas. Ello sugiere que la ocupación prolongada de múltiples receptores del EGF ejerce un efecto farmacológico más consistente que el EGF en forma de partículas de aerosol líquido simple vehiculizado en suero fisiológico.

Tabla 15. Mortalidad en cada grupo

Grupo	24 horas	48 horas	72 horas	Total muertes
A	3	6	1	10 (83,3%)
B	-	5	-	5 (41,6%)
C	2	-	-	2 (16,6%)

Los resultados del lavado bronco-alveolar confirman la protección ejercida por el EGF a la pared alveolar y al endotelio del capilar septal. Se observa, además, que la protección conferida por el tratamiento del EGF incorporado a las vesículas incluye una mejoría a la capacidad ventilatoria expresada en mayor índice de PO₂ arterial, y en la conservación de un pH arterial muy cercano al normal. Estos datos se exponen en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultados del lavado bronco-alveolar y función pulmonar.

Grupo	Células inflamatorias por ml	Hematíes por ml	Fosfolípidos		Saturación arterial	pH arterial
			totales de	por g tejido pulmonar		
A	$3,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	188,6 µg		51,8±2,2	6,58±0,4
B	$2,2 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	241,0 µg		76±8,3	7,12±0,1
C	$0,5 \times 10^3$	--	1,32 mg		91,7±5,6	7,33±0,2

El análisis histológico de los pulmones de cada grupo demostró que el tratamiento con EGF, particularmente en el grupo que recibió la formulación de las vesículas, protegió el parénquima pulmonar. Ello se demuestra por la presencia de conservación de la relación alveolo/septum, reducción del edema de permeabilidad de la pared septal, así como de la presencia de focos hemorrágicos y de material eosinofílico en el lumen alveolar. Se demostró menor reacción inflamatoria en los animales tratados con la formulación de EGF incorporado a las vesículas, en comparación con aquellos que recibieron solución salina fisiológica. El experimento nos permite inferir que la intervención con las vesículas de colesterol:BKC:EGF, descritas en el Ejemplo 4, ejerce un efecto farmacológico más intenso / prolongado sobre el parénquima pulmonar expuesto a conocidos inductores de LPA. La protección conferida no solo cubre la mejoría de la integridad estructural del pulmón, sino que también cursa con sustancial corrección de parámetros funcionales.

Ejemplo 20. Tratamiento compasivo con las vesículas de EGF a un paciente crítico con Síndrome de Distress Respiratorio del Adulto (SDRA)

Descripción del caso clínico: Paciente AGJ, masculino de 57 años, sin antecedentes patológicos, que sufre un trauma abdominal que evoluciona hacia un shock séptico. Como complicación evolutiva se instaura un SDRA que le lleva a dificultad

ventilatoria con disnea y cianosis refractaria a oxigenoterapia; baja saturación (11 mm Hg) y alteraciones del pH sanguíneo. A la imagen radiológica aparecen manchas algodinosas en el parénquima de ambos pulmones. Se decide iniciar el tratamiento con presión positiva a la expiración final y otros farmacológicos de rutina. Con vistas a proteger el parénquima pulmonar en la fase aguda exudativa, se administran las vesículas de colesterol:BKC:EGF descritas en el Ejemplo 4, a la dosis de 200 µg equivalentes de EGF por litro de oxígeno medicinal, dos veces al día. Las medidas permitieron una evolución favorable y progresiva del paciente a la normalidad, previniendo la llegada a la fase de alveolitis fibrosante. Al tercer día de tratamiento se pudo suspender la ventilación a presión positiva, y al quinto día la imagen algodinosas había sido aclarada totalmente.

Ejemplo 21. Demostración de la eficacia terapéutica del uso de vesículas de EGF en pacientes con colitis ulcerativa distal izquierda

Se trata de una cohorte de 8 pacientes con diagnóstico de colitis ulcerativa distal, a punto de partida de varias colonoscopías y biopsias realizadas. Los pacientes recibían una dieta médica especializada, así como el tratamiento farmacológico con azulfidina o sulfasalacina. Conforme a que esta cohorte se había mantenido clínicamente activa por más de 12 meses, y refractaria a toda intervención farmacológica, incluyendo corticoides; se decide evaluar compasivamente el efecto del tratamiento con las vesículas de colesterol:cetrimida:EGF descritas en el Ejemplo 3, mediante administración por un enema bajo. Para ello, las vesículas de colesterol:cetrimida:EGF se administraron en solución salina fisiológica, a una concentración equivalente de EGF de 50 µg/ml, para un volumen de 20 ml. Los enemas se aplicaron en decúbito lateral izquierdo, cada noche antes del horario de sueño. A los 7 días de iniciados los enemas asociados al resto de las medidas médicas previas, las melenas, el dolor, y la toma sistémica general fueron erradicados. Transcurridos 10 días de tratamiento, se practica una colonoscopia, detectándose una sustancial desinflamación de la mucosa, cicatrización de la mayoría de las lesiones y una significativa reducción del índice de St. Mark. El tratamiento se suspendió a los 21 días de iniciado, término al cual se repiten las colonoscopias; confirmándose el efecto de cicatrización y desinflamación causados por el tratamiento con los enemas que contienen las vesículas de

colesterol:cetrimida:EGF. Las biopsias tomadas de los 8 pacientes, a los 21 días de comenzado el tratamiento, evidenciaron la desaparición de la criptitis.

Ejemplo 22. Utilización compasiva de las vesículas de EGF para revertir las lesiones mucosales provocadas por la quimioterapia oncológica

Paciente QED, masculino de 32 años, que desarrolla mucositis hemorrágica de vejiga y partes bajas del tracto urinario, a punto de partida del tratamiento con ciclofosfamida y busulfan, tras un trasplante medular. Transcurridas 72 horas con hematuria y abundante proteinuria (400 mg/24 horas), conjuntamente con las medidas de apoyo médico general, el paciente recibe una cistoclisis por la que se pasa una infusión de solución salina fisiológica, conteniendo las vesículas de colesterol:CTAB:EGF, preparadas según el Ejemplo 2, a una concentración equivalente de 150 µg/mL de EGF. Al término de las primeras 24 horas, solo se detectaron trazas de hematíes en la orina y una proteinuria de 170 mg/24 horas.

Paciente IRT, femenino, de 27 años que desarrolla mucositis de partes altas del tubo gastrointestinal, en el curso de poliquimioterapia para tratamiento de un linfoma no Hodgkin. Se instaura un cuadro clínico florido, que incluye desde manifestaciones aftosas, sialorrea, hasta hematemesis, distensión abdominal, toma sistémica, fiebre y otros síntomas. El proceso comienza a ser manejado con medidas farmacológicas de apoyo, que incluyeron inhibidores de bomba de protones, mucoprotectores, restitución de volemia y analgésicos opiáceos parenterales. Transcurridas 24 horas de implantado el cuadro, la paciente recibe aplicaciones orales de una solución salina conteniendo las vesículas de colesterol:cetrimida:EGF, preparadas según el Ejemplo 3, a una concentración equivalente de EGF de 50 µg/mL. Mediante la sonda nasogástrica se instila, cada cuatro horas, un volumen de 250 ml de dicha solución. La hematemesis cedió a las 24 horas de iniciar las irrigaciones gástricas, así como el cuadro de distensión y paresis aguda. Igualmente, se redujo progresivamente la necesidad de apoyo en volumen y otras medidas de manejo.

Ejemplo 23. Síntesis de vesículas de β -Sitosterol:CTAB:EGF mediante la tecnología de fluidos comprimidos

Se sintetizaron de igual forma a la utilizada en el Ejemplo 2, pero en este caso se utilizó por una parte una disolución de 77,71 mg de β -Sitosterol en 2,88 mL of etanol, y por otra parte una disolución acuosa de 2,83 mg/mL de CTAB y EGF a la concentración deseada. Se obtuvieron vesículas de CTAB: β -Sitosterol (1:1) con EGF incorporado a una concentración de 5 μ M. Los resultados de apariencia física, tamaño medio y potencial-Z se muestran en la Tabla 17. Se observa que la preparación de vesículas es estable y presentan tamaño medio e IPD relativamente pequeño. El tamaño medio, la distribución de tamaño de partículas y el potencial-Z fueron determinados por DLS. Además, de manera similar a las preparaciones de vesículas mencionadas en ejemplos anteriores, que comprenden en su composición un surfactante catiónico de tipo amonio cuaternario, presentan valores de potencial-Z positivo y muy superior a + 30 mV, lo cual les predice una elevada estabilidad a largo plazo. En la Figura 3D se observa que predominan las formas esferoidales con estructura unilamelar, según el estudio de morfología de las vesículas realizado por cryo-TEM. Estas vesículas también presentan características que las hacen muy atractivas desde el punto de vista farmacéutico.

Table 17. Apariencia física, tamaño medio de partículas y potencial-Z de las vesículas β -Sitosterol:CTAB:EGF a una composición dada.

Composición (EGF: β-Sitosterol)	Apariencia física	Tamaño medio (nm) (IPD)*	Potencial-Z (mV) ($\pm$SD)*
5 μ M:1 M	Solución opalescente dispersa	218,8 (0,277)	+78,6 ($\pm$ 12,0)

*Nano-ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), IPD-índice de polidispersión.

REIVINDICACIONES

VESICULAS QUE COMPRENDEN FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO Y COMPOSICIONES QUE LAS CONTIENEN

1. Vesículas que se caracterizan porque comprenden el factor de crecimiento epidérmico (EGF), un surfactante catiónico y colesterol o sus derivados.
2. Las vesículas de la reivindicación 1 donde el surfactante catiónico es de tipo amonio cuaternario.
3. Las vesículas de la reivindicación 2 donde el surfactante catiónico de tipo amonio cuaternario es un surfactante seleccionado del grupo compuesto por bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cetrimida y cloruro de benzalconio (BKC).
4. Las vesículas de las reivindicaciones 1-3 donde la proporción molar entre el surfactante catiónico y el colesterol, o sus derivados, se encuentra en el rango de 10M:1M a 1M:5M; y la proporción molar entre el EGF y el colesterol, o sus derivados, se encuentra en el rango de 0,5 μ M:1M a 100 μ M:1M.
5. Las vesículas de las reivindicaciones 1-4 que se caracterizan porque presentan estructura unilamelar y tamaño medio aproximado entre 25 y 500 nm, preferentemente entre 50 y 300 nm.
6. Las vesículas de las reivindicaciones 1-5 donde el EGF está incorporado a la bicapa vesicular.
7. Las vesículas de las reivindicaciones 1-6 que se caracterizan porque se obtienen por tecnología de fluidos comprimidos (FCs).
8. Las vesículas de la reivindicación 7 donde la tecnología de FCs incluye un proceso que comprende:
 - a) la preparación de una disolución acuosa de EGF y un surfactante catiónico.
 - b) la disolución de colesterol, o sus derivados, en un disolvente orgánico expandido con un FC,
 - c) la síntesis de las vesículas mediante la despresurización de la disolución resultante de la etapa b) sobre la disolución resultante de la etapa a).
9. Las vesículas de la reivindicación 8 donde el surfactante catiónico es de tipo amonio cuaternario.

10. Proceso para la preparación de vesículas que comprenden el EGF, un surfactante catiónico y colesterol, o sus derivados, que se caracteriza porque comprende:
 - a) la preparación de una disolución acuosa de EGF y un surfactante catiónico,
 - b) la disolución de colesterol o sus derivados en un disolvente orgánico expandido con un FC,
 - c) la síntesis de las vesículas mediante la despresurización de la disolución resultante de la etapa b) sobre la disolución resultante de la etapa a).
11. Proceso de la reivindicación 10 donde el surfactante catiónico es de tipo amonio cuaternario.
12. El proceso de la reivindicación 10 donde el disolvente orgánico de la etapa b) es un disolvente que se selecciona del grupo compuesto por los alcoholes monohídricos, los alcoholes polihídricos, las cetonas, la etilendiamina, el acetonitrilo, el acetato de etilo y mezclas de ellos.
13. El proceso de la reivindicación 10 donde el FC es un compuesto que se selecciona entre el dióxido de carbono, el etano, el propano, los hidroclorofluorocarbonos, y los hidrofluorocarbonos.
14. El proceso de las reivindicaciones 10-13 donde la relación entre la cantidad de FC y de disolvente orgánico corresponde a una fracción molar aproximada de 0,3 a 0,95, preferentemente de 0,5 a 0,8.
15. El proceso de las reivindicaciones 10-13 donde la disolución del colesterol, o de sus derivados, en un FC se realiza en un reactor a una presión aproximada de 1 a 30 MPa, y una temperatura aproximada de 10 a 70 °C, preferiblemente entre 10 y 50 °C.
16. El proceso de las reivindicaciones 10-15 donde el EGF se disuelve en una solución acuosa que contiene un surfactante catiónico cuya concentración se encuentra por encima de su concentración micelar crítica.
17. Composición farmacéutica que se caracteriza porque comprende las vesículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. La composición de la reivindicación 17 que se caracteriza porque puede ser administrada por vía sistémica, intralesional, mucosal, tópica, transdérmica, oftálmica, o como formulación inhalada.
19. El uso de las vesículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la fabricación de un medicamento.
20. El uso de la reivindicación 19 donde el medicamento se utiliza para el tratamiento de heridas complejas de todas las partes blandas periféricas.
21. El uso de la reivindicación 20 donde la herida compleja es una úlcera del pie diabético.
22. El uso de la reivindicación 20 donde la herida compleja es una úlcera venosa, una úlcera de decúbito o una quemadura.
23. El uso de la reivindicación 19 donde el medicamento se utiliza para el tratamiento del distrés respiratorio del adulto.
24. El uso de la reivindicación 19 donde el medicamento se utiliza para el tratamiento de lesiones del tubo digestivo.
25. El uso de la reivindicación 24 donde el medicamento se utiliza para el tratamiento de la mucositis, colitis ulcerativa, úlceras duodenales, o colitis distal.
26. El uso de la reivindicación 19 donde el medicamento se utiliza para el tratamiento de lesiones oculares.
27. Producto cosmético que se caracteriza porque comprende las vesículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, y al menos un excipiente.
28. El uso de las vesículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la fabricación de un producto cosmético.
29. El uso de la reivindicación 28 donde el producto cosmético es un producto para prevenir la senescencia y el envejecimiento de la piel.