

TITULO

Una composición farmacéutica para el tratamiento tópico de heridas.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones tópicas para el tratamiento de heridas. Además, también se refiere al campo de las composiciones y formulaciones farmacéuticas tópicas útiles para el tratamiento de heridas crónicas.

ESTADO DEL ARTE

Las heridas crónicas, entendidas como aquellas que no cicatrizan en una serie de etapas ordenadas y en tiempos predecibles, tales como úlceras venosas, úlceras del pie diabético, escaras, úlceras por presión, úlceras isquémicas, lesiones atípicas, entre otras, son lesiones que no cicatrizan (1). Afectan aproximadamente al 2% de la población mundial (2) y representan un gran problema económico para los sistemas de salud (3). Las heridas crónicas se detienen en un estado inflamatorio crónico que evita la cicatrización (4), aunque el fracaso en la cicatrización es multifactorial (5). Las heridas crónicas fueron estudiadas en profundidad por los científicos dando como resultado una gran cantidad de productos que intentan proporcionar una solución terapéutica. Sin embargo, hasta la fecha no existe un tratamiento holístico y eficaz para este tipo de heridas.

Existe una multiplicidad de productos para heridas crónicas en el mercado. Los médicos suelen utilizar una combinación de terapias para la infección, desbridamiento y cuidado de heridas (6). Este tipo de productos no aseguran la curación y los médicos a menudo deben recurrir a utilizar también sustitutos de la piel (7), cierre asistido por vacío (8), factores de crecimiento (9) y terapia hiperbárica (10). Sin embargo, ninguno de ellos puede ofrecer todos los requerimientos terapéuticos al mismo tiempo y por lo tanto también muestran una eficacia terapéutica limitada (11).

Entre los productos que podrían mencionarse para la infección de heridas: 1) La plata tiene un amplio espectro de actividad y está disponible en numerosas formas. Sin embargo, es necesario una liberación sostenida de plata en concentraciones suficientemente altas para mantener la eficacia. Por ejemplo, para que funcione correctamente, el nitrato de plata debe administrarse 12 veces al día (12). Además, una revisión reciente no encontró evidencia convincente de que la sulfadiazina de plata tenga algún efecto sobre la cicatrización de heridas en general, a pesar de su uso común entre los médicos (13). 2) Los compuestos que contienen yodo (es decir, yodo cadexómero - yodo dentro de una red de almidón formada en microperlas) se han utilizado durante mucho tiempo en la cicatrización de heridas, pero ha habido algunas preocupaciones con la toxicidad de los compuestos que contienen yodo, especialmente en áreas grandes de heridas (14, 15). 3) También se han desarrollado formulaciones tópicas de antibióticos para aplicar en sitios de heridas. Sin embargo, estudios recientes con la administración rutinaria de ungüento antibiótico no conducen a mejores resultados, pero a menudo provocan malestar en el paciente, junto con la posibilidad de resistencia a los antibióticos y dermatitis de contacto (16-18).

La gran mayoría de los patógenos en heridas crónicas pueden adherirse juntos en biofilms, que representan masas compactas bacterianas envueltas en una matriz polimérica, lo que las ayuda a evadir el ataque de los antibióticos y sistemas inmunológicos. Esto no solo crea una barrera física para la cicatrización de heridas, sino que también prolonga la fase inflamatoria, por lo que el abordaje correcto de los biofilms se ha convertido en un desafío importante en la cicatrización de heridas. Sin embargo, no existen productos anti-biofilm con un amplio espectro bacteriano para heridas crónicas. De hecho, para ser eficaz en heridas crónicas, un producto debe ofrecer propiedades bacteriostáticas, bactericidas, inhibidoras de biofilm y disrupción de biofilm al mismo tiempo.

El desbridamiento de la herida (19) implica la eliminación de material tisular no viable (necrótico) que solo sirve como combustible para infecciones e impide la cicatrización. De esta manera se expone tejido sano y bien perfundido que es capaz de proliferar y poblar el lecho de la herida a través de la migración de células epiteliales. El

desbridamiento quirúrgico es un componente importante del cuidado de heridas, pero tiene todos los inconvenientes que tienen los procedimientos quirúrgicos, como infecciones, dolor, costos y malestar del paciente. El desbridamiento autolítico se refiere a la autoactivación de enzimas endógenas involucradas en la degradación de la fibrina generada en un ambiente húmedo y que se observa con el uso de algunos tipos de apósitos para heridas. Sin embargo, ciertamente no es capaz de eliminar tejido desvitalizado y, por lo tanto, no puede servir como reemplazo adecuado para el desbridamiento quirúrgico. Por tanto, no existen productos que permitan un desbridamiento correcto sin procedimientos invasivos y sin molestias al paciente.

Los apósitos para el cuidado de heridas (20) son muy importantes para el tratamiento de heridas crónicas dada su gran morbilidad. Sin embargo, los apósitos para el cuidado de heridas no son productos activos (no pueden acelerar el proceso de curación) y solo ayudan a proteger la herida mientras ocurre el proceso de cicatrización. Además, ninguno de ellos puede usarse indistintamente en cualquier tipo de herida crónica debido a los siguientes problemas: 1) Una cantidad limitada de exudado retenido en la herida permite el desbridamiento autolítico, que sirve para promover una cicatrización exitosa. Los apósitos tradicionales de gasa seca para heridas (es decir, Curity, gasa con vaselina, Xeroform) pueden degradar este proceso y causar más lesiones cuando se retiran. 2) Los apósitos de baja adherencia y las películas semipermeables (es decir, Bioclusive, Blisterfilm, Cutifilm, Flexigrid, OpSite, Tegaderm) representan los tipos básicos de apósitos para heridas con el objetivo de restringir la penetración de líquidos y microbios pero permitiendo el paso de aire y vapor de agua. Por lo tanto, solo se pueden usar para heridas no exudativas que representan la minoría de ellas. 3) Los hidrocoloides (es decir, Aquacel, Comfeel, DuoDERM, Granuflex, Tegisorb) pueden absorber una cierta cantidad de exudado manteniendo un ambiente húmedo. Sin embargo, debido a su naturaleza impermeable, evitan el intercambio de aire y no deben usarse en heridas exudativas. Además, lleva mucho tiempo entre cambios. 4) Los hidrogeles (es decir, Carrasyn, Curagel, Nu-Gel, Purilon, Restore, SAF-gel, XCell) también se pueden usar para ayudar a mantener la humedad en una herida que de otro modo estaría seca. Son fáciles de quitar y cambiar, pero pueden causar sobrehidratación y, por lo tanto, retrasar la

cicatrización. 5) Los apósitos de alginato (es decir, Algisite, Kaltostat, Sorbsan, Tegagen) son fibras no tejidas derivadas de algas marinas que generalmente se reservan para heridas muy exudativas debido a su capacidad para absorber grandes cantidades de líquido. Como tal, se pueden observar efectos adversos en heridas secas tratadas con alginato, por ejemplo pueden ser hemostáticos (21). 6) Hidrofibra (es decir, Aquacel Hydrofiber) con propiedades y efectos adversos similares a los apósitos de alginato. 7) Las espumas (es decir, 3M Adhesive Foam, Allevyn, Lyofoam, Tielle) minimizan el trauma durante los cambios de apósito, pero tienen una capacidad de absorción limitada y solo se pueden usar en heridas moderadamente exudativas. 8) Existen combinaciones de apósitos para heridas tradicionales como espumas o hidrogeles con compuestos antimicrobianos como plata, betaína, quitina o polihexametilen biguanida (Kendall AMD). Estos materiales pueden no ser apropiados para una aplicación de amplio espectro para curar heridas, pero pueden ser apropiados en úlceras crónicas de miembros inferiores donde la infección puede ser un problema, especialmente con la formación de biofilms. Sin embargo, si bien pueden inhibir la formación de biofilms, no pueden producir su disrupción, que es el verdadero requisito terapéutico. 9) Productos con colágeno: Se han utilizado en heridas refractarias a tratamiento y úlceras crónicas. Se cree que ayuda a facilitar un entorno que atrae los tipos de células fundamentales para la cicatrización de heridas, al tiempo que reduce los efectos negativos causados por los radicales libres y las proteasas (22). Sin embargo, este colágeno no pretende ser un reemplazo directo de la nueva producción de colágeno en el tejido herido (ya que puede derivarse de múltiples fuentes, incluido el colágeno bovino y porcino). Además, no son útiles en heridas infectadas.

Los sustitutos de la piel (7) generalmente consisten en una sustancia de origen biológico combinada con un material para permitir su colocación en una herida. En general, estos apósitos son bastante costosos, lo que representa una barrera importante para la adopción generalizada. Además, representan un alto riesgo de infecciones y antigenicidad. Se pueden encontrar varios sustitutos de la piel en el mercado: 1) Múltiples opciones se han centrado en un material de malla recubierto con colágeno o polipéptidos porcinos (Biobrane y TransCyte), y otros contienen además células de fibroblastos recién

nacidos o un xenoinjerto porcino (EZ Derm). Sin embargo, demuestran ser costo-efectivos solo para quemaduras faciales y no para aplicaciones generales. 2) Dermagraft es un material desarrollado utilizando fibroblastos obtenidos del prepucio de recién nacidos, matriz extracelular y una malla de poliglactina bioabsorbible. Sin embargo, mostró un alto riesgo de rechazo e hipersensibilidad (ya que por su método de preparación, puede contener suero bovino en pequeñas cantidades). 3) Apligraf, es un equivalente de piel cultivada en bicapa alogénica, donde una capa dérmica de fibroblastos cultivados y colágeno tipo I bovino se combina con una capa epidérmica de queratinocitos cultivados. Sin embargo, esto tiene un costo significativo, ya que una sola aplicación de Apligraf puede costar más de US \$ 1000 para un disco circular de 7.5 cm de diámetro y puede ser rentable solo para heridas recalcitrantes, crónicas y que no cicatrizan, lo que limita un poco su aplicabilidad. en general de estos productos. 4) Omnigraft es una matriz de dos capas acelulares que consta de colágeno, glicosaminoglicano y condroitin-6-sulfato, con una capa de silicona para la función de barrera. Sin embargo, Omnigraft no debe usarse en pacientes con sensibilidad conocida al colágeno bovino o condroitina y ciertamente no debe usarse en heridas infectadas clínicamente diagnosticadas.

Los dispositivos de cierre asistido por vacío (VAC) (8) pueden mitigar numerosos factores que pueden ser deficientes en una herida crónica, al mantener un ambiente húmedo, optimizar el flujo sanguíneo, eliminar los exudados y aplicar presión para promover el cierre de la herida. Sin embargo, puede ser peligroso si los apósitos de presión negativa se colocan directamente en contacto con los vasos sanguíneos, huesos o nervios expuestos. Además, está contraindicado cuando hay osteomielitis o el paciente tiene alergias o sensibilidad a los adhesivos acrílicos.

Factores de crecimiento (9), dado que una herida crónica contiene tantas perturbaciones en los factores de crecimiento y las citocinas, puede ser útil abordar algunos de estos problemas. Sin embargo, en un entorno donde tantos factores son deficientes y desregulados, simplemente reemplazar uno, resulta insuficiente para rescatar el fenotipo de herida crónica. De hecho, la única de estas terapias que ha demostrado mejorar la curación en un ensayo controlado aleatorio doble ciego es el

factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (becaplermina de Regranex) y esos resultados fueron bastante modestos.

A pesar de que la oxigenación de la herida es una de las dianas terapéuticas más importantes para las heridas crónicas, no existen productos que aumentan la vascularización mediante el aumento del factor de crecimiento endotelial vascular in situ (VEGF).

El oxígeno hiperbárico (10) se ha utilizado en la cicatrización de heridas sobre la base del principio de que puede promover la proliferación de fibroblastos, mejorar la función inmunológica y estimular la angiogénesis, entre otras funciones. Sin embargo, estos ideales no se han confirmado necesariamente en la práctica, lo que ha dado lugar a cierto grado de controversia en su uso. Esta terapia se aplica al paciente en una cámara de oxígeno hiperbárico y no se ha demostrado que la administración localizada de oxígeno sea eficaz, ya que podría provocar efectos secundarios importantes, como miopía y toxicidad por oxígeno en el cerebro causando convulsiones y neumotórax.

Se pudieron encontrar varias patentes de invención que enseñan enfoques particulares como AR093779 cuyos inventores son los mismos que los de la presente invención: Esta solicitud enseña un sobrenadante de un fermento de *Lactobacillus* que se propone con éxito en el tratamiento de heridas crónicas (23-25) . En este documento, llamaremos al sobrenadante mencionado anteriormente "LAPS". El problema técnico de este sobrenadante es que al ser un sobrenadante de fermentación, tiene una composición indeterminada y variable según las condiciones de producción. Además, tiene una estabilidad limitada en el tiempo, ya que existe evidencia de que su función terapéutica no supera los 60 días.

El documento EP 0848 951 B1 proporciona el uso de N-acetilcisteína (NAC) para la preparación de una composición para el tratamiento o profilaxis de heridas crónicas seleccionada del grupo que consiste en úlceras del pie diabético y úlceras por presión en las que la composición está en forma de un ungüento para administración tópica a la úlcera crónica y el ungüento comprende: 1) 0,01 a 1% p / p de NAC o una sal farmacéuticamente aceptable o sus derivados y 2) Un vehículo: hidrogeles que contienen

celulosa (es decir, hidroxietilcelulosa), hidrogeles de ácido poliacrílico (es decir, carbopol) o cremas / ungüentos utilizados para preparaciones farmacéuticas (es decir, cetomacrogol). Los vehículos anteriores pueden incluir alginatos, como espesantes o estimulantes, conservantes (es decir, alcohol bencílico), tampones para controlar el pH (es decir, Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4), agentes para ajustar la osmolaridad (es decir, NaCl), estabilizadores (es decir, EDTA). La composición reivindicada para el tratamiento de heridas crónicas que se basa en NAC muestra una acción pro-cicatrizante al inhibir las MMP. Sin embargo, en su procedimiento 1, demuestran que NAC muestra una inhibición dependiente de la concentración de la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1). Esto no es algo deseable para el tratamiento de heridas crónicas ya que se demostró previamente que la cicatrización de heridas se retrasa en ausencia de ICAM-1 (26).

El documento US 9,211,305 B2 enseña una composición de glicosaminoglicanos para el tratamiento de la úlcera del pie diabético, se refiere específicamente a heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y heparinas de muy bajo peso molecular (VLMWH) en el tratamiento de úlceras crónicas, particularmente de las úlceras del pie diabético, y más específicamente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras crónicas, y en particular úlceras del pie diabético y úlceras por presión. En concreto, esta patente reivindica un método para el tratamiento de heridas crónicas pero este tratamiento no ofrece propiedades antimicrobianas (bacteriostáticas, bactericidas, anti-biofilm), ni propiedades antioxidantes ni angiogénicas. Por lo tanto, debe usarse combinado con otros productos.

US 10,285,938 B2 Los péptidos antimicrobianos representan un descubrimiento relativamente nuevo en la ruta del sistema inmunológico. Los diseños recientes de péptidos antimicrobianos modificados sintéticamente han demostrado una mayor potencia y eficacia / tolerabilidad, una mayor especificidad y una toxicidad reducida en comparación. Uno de esos péptidos, XYLENTRA®, ha demostrado ser una promesa significativa a partir de importantes estudios in vitro contra patógenos gram (+). Además, extensos estudios en animales han demostrado que XYLENTRA® es un péptido antimicrobiano contra una gran cantidad de patógenos. El péptido XYLENTRA® también

es resistente a los solutos. El péptido XYLENTRA® ha mostrado una actividad antibacteriana significativa en los organismos de prueba *Staphylococcus aureus* MTCC 96 y *Pseudomonas aeruginosa*. MTCC741. Se observó una disminución sustancial en el nivel de población microbiana en animales tratados con péptido utilizando el protocolo descrito en detalle en la solicitud. Específicamente, reivindican un método para tratar una herida que utiliza el péptido antimicrobiano mencionado anteriormente. Sin embargo, este método no contempla propiedades pro-cicatrizantes como la antioxidación, inhibición de MMPs, angiogénesis, etc. Además, en cuanto a sus propiedades antimicrobianas, no demuestran efectividad contra biofilm (inhibición y / o disrupción). Por lo tanto, debe usarse combinado con otros productos.

El documento WO 2019 / 193333A1 se refiere a una composición farmacéutica que comprende triclosán (2,4,4 triclora hidroxí difenil éter) y un espesante para su uso en el tratamiento de heridas crónicas y, en particular, en el tratamiento de úlceras del pie diabético. En concreto, una composición tópica con propiedades antimicrobianas relacionadas con el triclosán. El ingrediente activo pro curativo: aceite de ricino, aceite de jojoba, aloe vera 10: 1; Ingrediente antimicrobiano activo: Triclosan; Emulsionantes: Ácido esteárico, GMSSE, Palmitato de cetilo, Fluido de silicona 200100 CS, Parafina líquida pesada, Monopropilenglicol. Gelificante: Carbopol 980 5%, Trietanolamina, Conservante opcional: Nipastat. Sin embargo, esta composición no contempla propiedades pro-cicatrizantes como antioxidación, inhibición de MMPs, angiogénesis, etc. Además de sus propiedades antimicrobianas, no demuestran efectividad frente a biofilm (inhibición y / o interrupción). Por lo tanto, debe usarse combinado con otros productos.

Hay muchos autores que aseguran que atacar el estrés oxidativo es un factor clave en el tratamiento para la cicatrización de heridas (27-29). En este sentido, existen dos tipos de antioxidantes que se pueden aplicar in vivo, enzimas antioxidantes (como SOD, catalasa, peroxidasa y glutatión peroxidasa) y antioxidantes no enzimáticos (como vitamina C, óxido nítrico, proteína ligante de metales, etc.) (27). Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos con antioxidantes se limitaron a administraciones orales. Por ejemplo, se ha estudiado la influencia del ácido ascórbico suplementado por vía oral en la cicatrización (28, 29). Por otro lado, se ha propuesto la aplicación tópica de

antioxidantes de extractos de plantas o antioxidantes enzimáticos en hidrogeles para el tratamiento de heridas crónicas (27). El único ensayo clínico informado en el que se aplicó localmente un antioxidante no enzimático en heridas crónicas se realizó con una crema que contenía DMSO al 5%, un potente eliminador de especies reactivas de oxígeno (ROS) y este tratamiento no pudo disminuir la aparición de úlceras (31). Además, se observó un efecto perjudicial sobre lesiones en el talón y el tobillo. Los autores propusieron varias hipótesis para explicar este resultado inesperado, en particular evocaron la posible actividad pro-oxidante del DMSO (31). En concentraciones fisiológicas, el DMSO y el ácido ascórbico son potentes captadores de radicales libres en el plasma, que protegen a las células contra el daño oxidativo causado por ROS (32).

Ajwee DM y col. (2012) enseña que la etosuximida y el fenobarbital promueven la cicatrización de heridas mejorando la colagenización (33). Aplicaron etosuximida (Etho) a las heridas por escisiones en un modelo de ratas albinas. Demuestran que los ungüentos que contienen etosuximida al 10% p / p (80 mg / ml) en parafina blanda promueven significativamente la cicatrización de heridas al mejorar la colagenización. Aplicaron 150 mg del ungüento por día. Esto significa 15 mg de Etho por día. Teniendo en cuenta que las ratas albinas tenían un peso de 140 a 180 g y que la volemia de referencia de estos animales es de 50 mL por kilogramo, entonces estas ratas tenían una volemia aproximada de 10 mL. Si consideramos que el 100% de la Etho aplicado diariamente se trasloca al torrente sanguíneo, entonces el primer día de tratamiento la Etho alcanza una concentración plasmática de 15 mg / 10 mL. O sea, 1,5 mg / mL o 1500 ug / mL. En humanos, el nivel terapéutico aceptado es de 40 a 100 ug / mL (Ver prospecto Zarontin FDA). Por encima de esta concentración se observan hepatotoxicidad, leucopenia, trombocitopenia, sedación y náuseas. Además, esta composición no ha demostrado propiedades antimicrobianas (bacteriostáticas, bactericidas, anti-biofilm). Por tanto, debe utilizarse combinado con otros productos para el tratamiento de heridas.

Goldberg SR y col. en su revisión (2020) indican que hay cinco puntos clave que hacen que las heridas se vuelvan crónicas (34):

1) Isquemia. La isquemia produce lesión tisular, necrosis y el desarrollo de heridas abiertas que rápidamente son colonizadas por bacterias.

2) Infección. La infección prepara el escenario para la inflamación crónica y descontrolada. La mayoría de las heridas crónicas son de naturaleza polimicrobiana con preponderancia de especies de *Staphylococcus* y *Pseudomonas*.

3) Formación de Biofilms. La respuesta proinflamatoria se perpetúa mediante la formación de un biofilm que aísla y protege a las bacterias. Los biofilms estimulan la respuesta inmune del huésped mientras resisten directamente la terapia antimicrobiana y estimulan la inflamación crónica.

4) Inflamación crónica y daño tisular. A medida que las células inflamatorias del huésped intentan eliminar el tejido dañado, se liberan especies reactivas de oxígeno y proteasas como las MMP, lo que provoca más daño tisular. La sobreexpresión de MMP daña la matriz extracelular e impulsa la patología subyacente de las heridas que no cicatrizan. La sobreproducción de MMP también destruye factores de crecimiento vitales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento transformante-beta necesarios para la cicatrización de heridas.

5) Disminución de la actividad mitogénica. Debido al ambiente inflamatorio descontrolado, las células residuales del tejido conectivo tienen una actividad mitógena disminuida y se vuelven senescentes.

Goldberg y col. indican que este círculo vicioso de inflamación y destrucción de tejidos persiste hasta que se utilicen estrategias clínicas agresivas para eliminar bacterias, tejido dañado y necrótico y reducir la inflamación. También indican que, en el estado de la técnica, el mejor enfoque para el manejo de las heridas de un paciente es la guía de cuidado productos y servicios de apoyo para heridas (DIME) (35). Esta guía consiste en un enfoque integral para evaluar una herida y reconocer todos los productos y servicios que es necesario usar al mismo tiempo para aumentar la efectividad terapéutica. Como se puede ver en esta guía, no existe ningún producto en el mercado con capacidad para ofrecer los 5 puntos clave indicados por Goldberg al mismo tiempo (35).

Es por eso que los tratamientos actuales generalmente usan una combinación de terapias para la infección, desbridamiento y cuidado de heridas. Este tipo de productos no aseguran la curación y los médicos a menudo deben recurrir a utilizar también

sustitutos de la piel, cierre asistido por vacío, factores de crecimiento y terapia hiperbárica. Sin embargo, ninguno de ellos puede ofrecer todos los requisitos terapéuticos mencionados al mismo tiempo y, por lo tanto, también muestran una eficacia terapéutica relativa.

Los expertos indican que la efectividad terapéutica se incrementará cuando las terapias incluyan al mismo tiempo todos los siguientes requerimientos terapéuticos (36):

- a) manejo de la infección y eliminación del biofilm (37, 38),
- b) manejo del exudado en cantidad y composición (39),
- c) reconstitución de factores de crecimiento específicos (9),
- d) manejo de la inflamación (4) y sus efectos deletéreos como la acumulación de metaloproteinasas de matriz (MMP) (40) y estrés oxidativo (29) y
- e) control del dolor (41).

La presente invención resuelve los problemas descritos en el estado de la técnica al proporcionar una composición para el tratamiento de heridas crónicas que proporciona al mismo tiempo propiedades angiogénicas, antimicrobianas (bacteriostática , bactericida, inhibición de biofilm y disrupción de biofilm en amplio espectro, incluyendo las bacterias más aisladas en heridas crónicas *S. aureus* y *P. aeruginosa*), inhibición de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) (a través de sus propiedades de acidificación y quelación), formación de colágeno y alfa actina en el lecho de la herida y propiedades pro-cicatrizantes.

Además, la presente invención proporciona una composición tópica para el tratamiento de heridas crónicas que sorprendentemente muestra sinergias funcionales producidas por la combinación de sus componentes.

La presente invención proporciona una composición tópica, formulaciones y un kit que comprenden componentes para uso farmacológico que, en combinación, constituyen una solución al problema del tratamiento terapéutico de heridas crónicas resolviendo los problemas planteados en el estado de la técnica.

Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición para el tratamiento de heridas.

También es un objeto de la presente invención proporcionar una composición para el tratamiento de heridas crónicas.

También es un objeto de la presente invención proporcionar una composición tópica para el tratamiento de heridas crónicas, que comprende úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras por presión (escaras); úlceras del pie diabético y heridas mecánicas o posquirúrgicas producidas por una super-infección con bacterias formadoras de biofilm.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un kit y formulaciones para administración tópica para preparación in situ.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un kit de formulaciones de gel de preparación in situ para el tratamiento de heridas.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso para elaborar dicha composición.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un dispositivo que permita la preparación in situ de formulaciones de gel para el tratamiento de heridas.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un método para tratar a un mamífero con heridas crónicas, que comprende úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras por presión (úlceras por decúbito); úlceras del pie diabético y heridas mecánicas o posquirúrgicas cronificadas por una superinfección con bacterias formadoras de biofilm.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Diagrama del dispositivo que contiene la formulación de la invención. Muestra tres contenedores separados por dos membranas colapsables que permiten el aislamiento de cada composición. Cuando se rompen las membranas, se mezclan las composiciones de los recipientes.

Figura 2: Porcentajes de las propiedades antipatogénicas estudiadas sobre *P. aeruginosa*: actividad bacteriostática, inhibición de la formación de Biofilm (BF) y disrupción de biofilm preformado provocada por las composiciones M0 y M13 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en las composiciones mencionadas. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; Sm = Solvente de mezcla; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = Mezcla

Figura 3: Efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC / mL) de *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 h de tratamiento utilizando las composiciones M0 y M13 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla

Figura 4: Porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, inhibición de la formación de Biofilm (BF) y disrupción de biofilm preformado sobre *Pseudomonas aeruginosa* causada por la composición M15 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = Polisorbato 80; D1 = ADNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla.

Figura 5: Efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC / mL) de *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 h de tratamiento con la composición M15 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla

Figura 6: Porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, inhibición de la formación de Biofilm (BF) y disrupción de biofilm preformado sobre *Pseudomonas aeruginosa* causada por la composición M16 y las

moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla.

Figura 7: Efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC / mL) de *Pseudomonas aeruginosa* a las 24 h de tratamiento con la composición M16 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla

Figura 8: Porcentajes de las propiedades antipatogénicas estudiadas sobre *S. aureus*: actividad bacteriostática, inhibición de la formación de Biofilm (BF) y disrupción de biofilm preformado provocada por las composiciones M0 y M13 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en las composiciones mencionadas. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; Sm = Solvente de mezcla; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = Mezcla

Figura 9: Efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC / mL) de *S. aureus* a las 24 h de tratamiento utilizando las composiciones M0 y M13 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla.

Figura 10: Porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, inhibición de la formación de Biofilm (BF) y disrupción de biofilm preformado sobre *S. aureus* causada por la composición M15 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla

Figura 11: Efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC / mL) de *S. aureus* a las 24 h de tratamiento utilizando la composición M15 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla.

Figura 12: Porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, inhibición de la formación de Biofilm (BF) y disrupción de biofilm preformado sobre *S. aureus* causada por la composición M16 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla.

Figura 13: Efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC / mL) de *S. aureus* a las 24 h de tratamiento con la composición M16 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en dicha composición. Eto = etosuximida; AA = ácido ascórbico; AL = ácido láctico; PS80 = polisorbato 80; D1 = DNasa 1; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = mezcla; Sm = Solvente de mezcla.

Figura 14: Porcentaje de actividad antioxidante relativa la Trolox (%AAR) causada por Sm, LAPS, AA (0,5 mg/mL y 2,5 mg/mL), M15 y M16. Sm= Solvente de mezcla; AA= Ácido ascórbico; LAPS= Sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M= mezclas.

Figura 15: Porcentaje de quelación de calcio y zinc a pH 7.0 mostrado por el solvente de mezcla (Sm), soluciones de EDTA en Sm (0.25, 0.50 y 0.75 mg / mL), M0, M13, M15 y M16..

Figura 16: Halos de actividad DNasa (mm) medidos en agar DNasa en diferentes momentos para las diferentes muestras analizadas para evaluar la conservación de la actividad enzimática.

Figura 17: Halos (mm) de actividad DNasa de LAPS medidos en agar DNasa obtenidos con solución de Dornasa alfa 0,97 µg/mL, M0 and M13 (cada uno con 0,97 µg/mL de Dornasa alfa); LAPS= sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*, solución de

Dornasa alfa 3,90 µg/mL, M15 y M16 (cada uno con 3.90 µg/mL de Dornasa alfa). ; M= Mezcla.

Figura 18: Porcentaje de incremento de vascularización en membrana corioalantoidea de pollo en respuesta a las distintas muestras testeadas. Etho= Etosuximida; LAPS= Sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M=mezclas.

Figura 19: Efectos de la etosuximida sobre los niveles de VEGF normalizados a los niveles de GAPDH en macrófagos J774 y en los queratinocitos HaCaT, tratados durante 24 horas. Cambios en la expresión génica en escala log 2. El eje Y es el cambio log-2 veces mayor en la expresión génica en cada tratamiento con etosuximida en relación con el grupo de control. GAPDH sirvió como un gen de mantenimiento para corregir la entrada de ADNc.

Figura 20. Porcentaje de cierre de la herida a las 24 horas de tratamiento aplicado en los diferentes grupos de animales.

Figura 21: La figura muestra la técnica inmunohistoquímica en cortes histológicos de heridas tratadas para detectar alfa actina de músculo liso (α -SMA) usando un anticuerpo monoclonal de ratón (anti- α -SMA - Clon α sm-1) y revelando la reacción con un sistema de estreptavidina peroxidasa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un aspecto de la presente invención, se provee una composición para el tratamiento tópico de heridas que comprende al menos un compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con un grupo imida; una o más enzimas desoxirribonucleasa con pH de actividad entre 4,5 y 6,5; y uno o más ácidos carboxílicos. Donde el compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con grupo imida comprende un compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con grupo imida seleccionado del grupo que consiste en etosuximida, ácido barbitúrico, fenobarbital, ácido 5,5-dietilbarbitúrico, 5-etilo Ácido -5- (1-metilbutil) barbitúrico, pentobarbitona, pentobarbital, nembutal, ácido 5-etil-5- (1-metilpropil) barbitúrico, butobarbital, butisol, ácido 5-alil-5- (1-metilbutil) - barbitúrico, secobarbital, Seconal, fenitoína, hidantoína y una mezcla de los mismos; en

donde, preferiblemente, el compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con grupo imida es etosuximida. Donde la enzima desoxirribonucleasa comprende una enzima desoxirribonucleasa seleccionada del grupo que consiste en DNasa, rh-dornasa alfa, DNasa I pancreática bovina, DNasa II, DNasa II procariótica o DNasa II eucariótica, DNasa II alfa, DNasa II beta, DNasa II de bazo porcino, y una mezcla de los mismos; donde, preferiblemente, la enzima desoxirribonucleasa es Dornasa-alfa humana recombinante. Donde el ácido carboxílico comprende un ácido carboxílico seleccionado del grupo que consiste en ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido málico, ácido tartárico, ácido salicílico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido propiónico y una mezcla de los mismos; en donde, preferiblemente, el ácido carboxílico es ácido láctico.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende además, uno o más agentes tensioactivos seleccionados del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 60, triestearato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, octoxinol-9, nonoxinol-9 y una mezcla de los mismos; en donde, preferiblemente, el agente tensioactivo es polisorbato 80.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende además uno o más ácidos formadores de complejos seleccionados del grupo que consiste en ácido etilenglicol tetraacético, ácido etilendiaminotetraacético, ácido dimercaptosuccínico, ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico, ácido lipoico (1, Ácido 2-ditiol-3-valérico), ácido oxálico y una mezcla de los mismos; en el que, preferiblemente, el ácido formador de complejo es ácido etilendiaminotetraacético.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende además uno o más ácidos reductores hidrófilos seleccionados del grupo que consiste en ácido úrico, ácido ascórbico, ácido lipoico y una mezcla de los mismos; donde, preferiblemente, el ácido reductor hidrófilo es ácido ascórbico.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende además uno o más agentes gelificantes seleccionados del grupo que consiste en celulosa, celulosa nanocristalina, celulosa bacteriana, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa,

celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa, carbopol y una mezcla de los mismos; en donde, preferiblemente, el agente gelificante es hidroxietilcelulosa.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende además una solución seleccionada del grupo que consiste en ácido acético 0,2 M / acetato de sodio 0,2 M: Relación 2,78 a 0,66% (v / v) pH = 4,2 a 4,8; ácido acético 0,10 M / acetato de sodio 0,01 M: Relación de 1,05 a 10,05% (v / v) pH = 5,6; fosfato de potasio monobásico 0,05 M pH = 4,5; fosfato de potasio monobásico 0,36 M / fosfato disódico 0,07 M: relación 4,92 a 0,98% (p / v) pH = 5,7; fosfato de potasio monobásico 0,36 M / fosfato disódico 0,10 M: relación 4,92 a 1,49% (p / v) pH = 6,0; ácido cítrico 0,31 M / fosfato disódico 0,20 M: Relación de 2,99 a 1,42% (p / v) pH = 5,8; ácido cítrico 0,10 M / citrato de sodio 0,03 M: Relación 1,92 a 0,77% (p / v) pH = 5,8; Tampón de fosfato de Sørensen: fosfato monobásico de sodio 0,2 M / fosfato disódico 2,3 M: Relación de 1,2 a 16,33% (p / v) pH = 5,8; Solución salina equilibrada de Hank (HBSS): cloruro de sodio 0,14 M (0,800%), cloruro de potasio 5 mM (0,040%), cloruro de calcio 1 mM (0,014%), sulfato de magnesio heptahidrato 0,4 mM (0,010%), cloruro de magnesio hexahidratado 0,5 mM (0,010%), fosfato disódico dihidrato 0,3 mM (0,006%), fosfato monobásico de potasio 0,4 mM (0,006%), glucosa 6 mM (0,100%), bicarbonato de sodio 4 mM (0,035%): pH = 5,7; Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 1 M (pH = 6,5); Sal sódica del ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico, ácido 4-morfolinetanosulfónico (sal sódica MES) 0,5 M (pH 5,5 - 6,7); Sal sódica del ácido N, N-bis (2-hidroxietil) -2-aminoetanosulfónico (BES) 0,5 M (pH = 6,0); Ácido N- (2-acetamido) -2-aminoetanosulfónico (ACES) 0,5 M (pH = 6,0); Ácido 2,2' - [(2-amino-2-oxoetil) imino] diacético (ADA) 0,2 M (pH = 6,0); piperazina-N, N'-bis (ácido 2-etanosulfónico) (PIPES) 0,5 M (pH = 6,0 - 6,8); Ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO) 0,2 M (pH = 6,0); solución salina (0,9%) / MgCL₂ (5 mM). pH 5,5; Solución de NaHCO₃ 1 M y combinaciones de las mismas.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,8.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 50 mg / ml de uno o más compuestos heterocíclicos nitrogenados de 5 o 6 átomos con grupo imida; preferiblemente de

aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg / ml; más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 mg / ml.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4000 μg / ml de una o más enzimas desoxirribonucleasas; más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 μg / ml; más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 μg / ml, más preferiblemente de 0,97 a 3,9 μg / ml.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 mg / ml de uno o más ácidos carboxílicos, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 mg / ml, más preferiblemente de 1,6 a 9 mg / ml.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende aproximadamente 5 mg / ml o menos de uno o más agentes tensioactivos, más preferiblemente aproximadamente 3 mg / ml o menos.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende aproximadamente 1 mg / ml o menos de uno o más ácidos formadores de complejos, más preferiblemente aproximadamente 0,75 mg / ml o menos.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende aproximadamente 3 mg / ml o menos de uno o más ácidos reductores hidrófilos, más preferiblemente aproximadamente 2,5 mg / ml o menos.

En otra realización de la presente invención, dicha composición tópica comprende aproximadamente 25 mg / ml o menos de uno o más agentes gelificantes, más preferiblemente aproximadamente 17 mg / ml o menos.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, La composición tópica comprende etosuximida, Dornasa-Alfa humana recombinante y ácido láctico en solución.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, La composición tópica comprende etosuximida, Dornasa-Alfa humana recombinante, ácido

láctico hidrófilo reductor, polisorbato 80, ácido ascórbico, ácido etilendiaminotetraacético, hidroxietilcelulosa y una solución que comprende solución salina al 0,9% y MgCl_2 5 mM. a pH 5,5.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, La composición tópica comprende una solución acuosa de: de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg / ml de etosuximida; de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 μg / ml de Dornasa-alfa humana recombinante; de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 mg / ml de ácido láctico; aproximadamente 2,5 mg / ml o menos de ácido ascórbico; aproximadamente 3 mg / ml o menos de polisorbato-80; aproximadamente 0,75 mg / ml o menos de ácido etilendiaminotetraacético; aproximadamente 17 mg / ml o menos de hidroxietilcelulosa.

En una realización particularmente preferida de la presente invención, La composición tópica comprende una solución acuosa de: de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3 mg / ml de etosuximida; de 0,97 a 3,9 μg / ml de Dornasa-alfa humana recombinante; de aproximadamente 1,6 a aproximadamente 8,7 mg / ml de ácido láctico; aproximadamente 2,5 mg / ml o menos de ácido ascórbico; aproximadamente 3 mg / ml o menos de polisorbato-80; aproximadamente 0,75 mg / ml o menos de ácido etilendiaminotetraacético; aproximadamente 17 mg / ml o menos de hidroxietilcelulosa.

En una realización particularmente preferida, la presente invención provee un kit farmacéutico para el tratamiento tópico de heridas que comprende una primera composición y una segunda composición que se mezclan antes de su uso para obtener la composición de la invención, en donde: la primera composición es sólida y comprende una enzima desoxirribonucleasa y un polvo de agente gelificante; y la segunda composición que es un líquido acuoso que comprende al menos un compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con un grupo imida y al menos un ácido carboxílico; y la segunda composición tiene un pH entre 4,5 y 6,8.

En una realización particularmente preferida, la presente invención provee un kit farmacéutico para el tratamiento tópico de heridas que comprende una primera

composición, una segunda composición y una tercera composición que se mezclan antes de su uso, en la que: la primera composición es sólida y comprende un agente gelificante en polvo; la segunda composición es sólida y comprende una enzima desoxirribonucleasa; y la tercera composición es un líquido acuoso que comprende al menos un compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con un grupo imida y al menos un ácido carboxílico; y la tercera composición tiene un pH entre 4,5 y 6,8.

En otra realización de la presente invención el kit farmacéutico comprende la primera composición, la segunda composición y opcionalmente la tercera composición, cada una contenida en un contenedor hermético y separado.

Otro objeto de la presente invención es un proceso para preparar dicha composición tópica a partir de dicho kit farmacéutico que comprende las etapas de:

- a. poner en contacto la primera composición con la segunda composición;
- b. mezclar y agitar obteniendo La composición tópica en gel.

Otro objeto de la presente invención es un proceso para preparar la composición de la invención a partir del kit farmacéutico de la invención que comprende una primera composición, una segunda composición y una tercera composición que se mezclan antes de su uso, en donde la primera composición es sólida y comprende un polvo de agente gelificante; la segunda composición es sólida y comprende una enzima desoxirribonucleasa; y la tercera composición es un líquido acuoso que comprende al menos un compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con grupo imida y al menos un ácido carboxílico; y la tercera composición tiene un pH entre 4.5 y 6.8 que comprende:

- a. poner en contacto la tercera composición con la segunda composición;
- b. mezclar y agitar la tercera composición con la segunda composición;
- c. poner en contacto la primera composición con la mezcla obtenida en el paso b.;
- d. mezclar y agitar obteniendo La composición tópica en forma de gel.

Otro objeto de la presente invención es una formulación que comprende la composición de la invención para tratar una herida de un mamífero que se aplica a la herida al menos una vez al día.

En otra realización de la presente invención, dicha herida es una herida seleccionada del grupo que consiste en una úlcera del pie diabético, una úlcera venosa, una úlcera arterial, una úlcera por presión, una herida mecánica caracterizada por una superinfección con una bacteria formadora de biofilm, una herida post-quirúrgica caracterizada por una sobreinfección con una bacteria formadora de biofilms y una combinación de las mismas.

Otra realización de la presente invención es un dispositivo que comprende el kit farmacéutico de la invención, que comprende:

- un primer contenedor que comprende una primera composición; y

- un segundo contenedor que comprende una segunda composición,

en el que el primer contenedor y el segundo contenedor están separados por una membrana colapsable capaz de mantener aisladas la primera composición y la segunda composición.

Otra realización de la presente invención es un dispositivo que comprende el kit farmacéutico de la invención, que comprende:

- un primer contenedor que comprende una primera composición;

- un segundo contenedor que comprende una segunda composición; y

- un tercer contenedor que comprende una tercera composición,

donde:

el primer contenedor y el segundo contenedor están separados por una primera membrana colapsable capaz de mantener aisladas la primera composición y la segunda composición; y

el segundo contenedor y el tercer contenedor están separados por una segunda membrana colapsable capaz de mantener aisladas la segunda composición y la tercera composición.

Otra realización de la presente invención es un proceso para producir La composición tópica de la invención que comprende los siguientes pasos:

a. mezclar en una solución un compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con un grupo imida, una enzima desoxirribonucleasa y ácido carboxílico, formando así una mezcla;

b. añadir gota a gota una solución alcalina a la mezcla hasta que el pH de la mezcla esté entre 4,50 y 6,50, formando así una mezcla con pH ajustado; y

c. esterilizar la mezcla con pH ajustado.

Donde, además, en una forma de realización preferida, comprende el paso:

d. agregar un agente gelificante.

Donde, además, en una forma de realización preferida, comprende el paso:

e. añadir un ácido formador de complejo, un agente tensioactivo y un ácido reductor hidrófilo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona una composición y formulaciones farmacéuticas y un kit farmacéutico para el tratamiento tópico de heridas que consigue una multiplicidad de efectos técnicos, principalmente efectos terapéuticos.

Las heridas susceptibles de ser tratadas con esta invención son úlceras crónicas refractarias a los tratamientos de curación convencionales tales como úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras por presión (escaras); úlceras del pie diabético y heridas mecánicas o posquirúrgicas que registran una superinfección con bacterias formadoras de biofilms.

El término "compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con grupo imida" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto químico farmacéuticamente aceptable que tiene un anillo químico de 5 o 6 átomos en el que al menos uno de esos átomos es "N" y es parte de un grupo imida. El grupo imida es -CO-NH-CO-. Ejemplos de compuestos heterocíclicos nitrogenados de 5 o 6 átomos con grupo imida de algunas realizaciones de la presente invención son, sin limitarse a los mismos, etosuximida, ácido barbitúrico, fenobarbital, ácido 5,5-dietilbarbitúrico (barbital o veronal), 5-etil-5 - Ácido (1-metilbutil) barbitúrico (pentobarbitona, pentobarbital o nembutal), ácido 5-etil-5- (1-metilpropil) barbitúrico (butabarbital, butisol), ácido 5-alil-5- (1-metilbutil) -barbitúrico (secobarbital o secundario), fenitoína, hidantoína y combinaciones de los mismos. Se ha usado etosuximida para los ejemplos de esta invención, pero cualquier compuesto heterocíclico nitrogenado farmacéuticamente aceptable de 5 o 6 átomos con el compuesto del grupo imida enumerado anteriormente podría ser equivalente.

El término "ácido carboxílico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ácido carboxílico farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de ácido carboxílico de algunas realizaciones de la presente invención son, sin limitación, ácido cítrico, ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido málico, ácido tartárico, ácido salicílico, ácido oxálico, ácido benzoico, ácido propiónico y combinaciones de los mismos. Se ha usado ácido láctico para los ejemplos de esta invención, pero cualquier ácido carboxílico farmacéuticamente aceptable enumerado anteriormente podría ser equivalente.

El término "enzima desoxirribonucleasa", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enzima desoxirribonucleasa farmacéuticamente aceptable con pH de actividad entre 4,5 y 6,5. Ejemplos de enzimas desoxirribonucleasa de algunas realizaciones de la presente invención son, sin limitarse a las mismas, DNasa I de cualquier origen: procariota o eucariota, por ejemplo ADNasa humana recombinante o rh-dornasa alfa y ADNasa I pancreática bovina; DNasa II de cualquier origen: procariota o eucariota. Por ejemplo: ADNasa II alfa, ADNasa II beta y ADNasa II de bazo porcino, y combinaciones de las mismas. Se ha usado rh-dornasa alfa para los ejemplos de esta invención, pero

cualquier enzima desoxirribonucleasa farmacéuticamente aceptable enumerada anteriormente podría ser equivalente.

El término "ácido reductor hidrófilo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier ácido reductor hidrófilo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de ácido reductor hidrófilo de algunas realizaciones de la presente invención son, sin limitar la misma, ácido úrico, ácido ascórbico, ácido lipoico y combinaciones de los mismos. El ácido ascórbico ha sido utilizado para los ejemplos de esta invención, pero cualquier ácido reductor hidrófilo farmacéuticamente aceptable enumerado anteriormente podría ser equivalente.

El término "ácido formador de complejo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier ácido formador de complejo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de ácidos formadores de complejos de algunas realizaciones de la presente invención son, sin limitación, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dimercaptosuccínico (DMSA), ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), ácido lipoico (ácido 1,2-ditiol-3-valérico), ácido oxálico y combinaciones de los mismos. Se ha usado EDTA para los ejemplos de esta invención, pero cualquier ácido formador de complejo farmacéuticamente aceptable enumerado anteriormente podría ser equivalente.

El término "agente tensioactivo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de agentes tensioactivos de algunas realizaciones de la presente invención son, sin limitar la misma, polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 60, triestearato de sorbitán, monoestearato de sorbitán, octoxinol-9, nonoxinol-9 aceite de ricino etoxilado a 40 moles de óxido de etileno, láurico etoxilado alcohol de 7 a 10 moles, Cremophor Kolliphor, Lipocol oxo 650, Solutol HS 15, Emulgin B1 PH, Lanette 20 PH, Polisorbato, Polisorbato 20, Polisorbato 60, Polisorbato 80, alcoholes grasos etoxilados (de 6 a 30 moles de etileno óxido) derivados de alcohol Capri, alcohol decílico, alcohol laurílico, alcohol isotridecílico, alcohol miristílico, alcohol etílico, palmoleilo, estearilo, oleilo, elaidilo, petroselinilo, alcohol linolílico, linolénico, alcohol elaeostearílico, eicosilo, araquilo, gadoleilo, alcohol behenílico, erucilo alcohol, brassidilo; y combinaciones de los mismos. Se ha utilizado

polisorbato 80 para los ejemplos de esta invención, pero cualquier agente tensioactivo farmacéuticamente aceptable enumerado anteriormente podría ser equivalente.

El término "agente gelificante" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier agente formador de gel farmacéuticamente aceptable que cuando se disuelve en una fase líquida como una mezcla coloidal forma una estructura interna débilmente cohesiva. Ejemplos de agente gelificante de algunas realizaciones de la presente invención son, sin limitarla, celulosa, celulosa nanocristalina, celulosa bacteriana, hidroxipropilcelulosa, celulosa microcristalina, carbopol, derivado de celulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, goma guar, goma arábica, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, goma de xantano, quitosano, alginato, gelatina, glicolato de almidón de sodio, corscarmelosa de sodio, ácido algínico, pectina y combinaciones de los mismos. Se ha usado hidroxietilcelulosa para los ejemplos de esta invención, pero cualquier agente gelificante farmacéuticamente aceptable enumerado anteriormente podría ser equivalente.

La presente invención es una composición farmacéutica para el tratamiento tópico de heridas que comprende al menos tres componentes en una solución. Las concentraciones de dichos componentes están en mg / ml, es decir mg de componente / ml de dicha solución y en% p / v significa% peso de componente / volumen de dicha solución.

El término "solución" o "SM" o "Disolvente de mezcla", como se usa indistintamente en el presente documento, se refiere a cualquier disolvente acuoso farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de disolvente acuoso farmacéuticamente aceptable de algunas realizaciones de la presente invención son, sin limitarla, ácido acético 0,2 M / acetato de sodio 0,2 M: relación 2,78 a 0,66% (v / v) pH = 4,2 a 4,8; ácido acético 0,10 M / acetato de sodio 0,01 M: Relación de 1,05 a 10,05% (v / v) pH = 5,6; fosfato de potasio monobásico 0,05 M pH = 4,5; fosfato de potasio monobásico 0,36 M / fosfato disódico 0,07 M: relación 4,92 a 0,98% (p / v) pH = 5,7; fosfato de potasio monobásico 0,36 M / fosfato disódico 0,10 M: relación 4,92 a 1,49% (p / v) pH = 6,0; ácido cítrico 0,31 M / fosfato disódico 0,20 M: Relación de 2,99 a 1,42% (p / v) pH = 5,8; ácido cítrico 0,10 M / citrato de sodio 0,03 M: Relación 1,92 a 0,77% (p / v) pH = 5,8; Tampón

de fosfato de Sørensen: fosfato monobásico de sodio 0,2 M / fosfato disódico 2,3 M: relación 1,2 a 16,33% (p / v) pH = 5,8; Solución salina equilibrada de Hank (HBSS): cloruro de sodio 0,14 M (0,800%), cloruro de potasio 5 mM (0,040%), cloruro de calcio 1 mM (0,014%), sulfato de magnesio heptahidrato 0,4 mM (0,010%), cloruro de magnesio hexahidratado 0,5 mM (0,010%), fosfato disódico dihidrato 0,3 mM (0,006%), fosfato monobásico de potasio 0,4 mM (0,006%), glucosa 6 mM (0,100%), bicarbonato de sodio 4 mM (0,035%): pH = 5,7; Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 1 M (pH = 6,5); Sal sódica del ácido 2- (N-morfolino) etanosulfónico, ácido 4-morfolinetanosulfónico (sal sódica MES) 0,5 M (pH 5,5 - 6,7); Sal sódica del ácido N, N-bis (2-hidroxietil) -2-aminoetanosulfónico (BES) 0,5 M (pH = 6,0); Ácido N- (2-acetamido) -2-aminoetanosulfónico (ACES) 0,5 M (pH = 6,0); Ácido 2,2' - [(2-amino-2-oxoetil) imino] diacético (ADA) 0,2 M (pH = 6,0); piperazina-N, N'-bis (ácido 2-etanosulfónico) (PIPES) 0,5 M (pH = 6,0 - 6,8); Ácido 3-morfolino-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO) 0,2 M (pH = 6,0); solución salina (0,9%) / MgCl₂ (5 mM). pH 5,5; Solución de NaHCO₃ 1 M y combinaciones de las mismas. Se ha utilizado solución salina (0,9%) / MgCl₂ (5 mM) a pH 5,5 para los ejemplos de esta invención, pero cualquier solución farmacéuticamente aceptable o SM enumerada anteriormente podría ser equivalente. La solución usada para los ejemplos de la presente invención, es decir, el disolvente de mezcla (SM) es una solución salina (0,9%) y 5 mM de MgCl₂ a pH 5,5.

La composición de la invención es bactericida, pero podría formularse con un conservante farmacéuticamente aceptable seleccionado, entre otros, del grupo que consiste en alcohol bencílico, ácido benzoico, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, cloruro de benzalconio, clorocresol, nitrato fenilmercúrico, clorobutanol, deshidroacetato de sodio, timerosal, sodio. Benzoato, ácido sórbico y combinaciones de los mismos.

La composición de la invención podría formularse con un anestésico farmacéuticamente aceptable seleccionado, entre otros, del grupo que consiste en lidocaína, pramoxina, benzocaína, entre otros y combinaciones de los mismos.

Entre los efectos técnicos logrados por esta invención es posible detallar los siguientes:

Efecto bacteriostático y bactericida: Los productos existentes en el mercado tienen solo un espectro de actividad reducido, mientras que la composición de la presente invención es capaz de eliminar el 99% de las cepas planctónicas aisladas de heridas crónicas. Este efecto no se logra con ninguno de los productos de última generación, por lo que actualmente; se debe utilizar más de un producto.

Efecto inhibidor de la formación de biofilms bacterianas: los productos inhibidores existentes solo inhiben una cepa bacteriana a la vez, mientras que la composición de esta invención inhibe la formación de biofilms de un 99% de cepas aisladas de heridas crónicas.

Efecto de disrupción del biofilm bacteriano: los productos que alteran el biofilm de bacterias en el mercado sólo provocan la degradación del biofilm de una sola especie a la vez, mientras que la composición de esta invención provoca la disrupción del biofilm del 95% de las cepas aisladas de heridas crónicas, incluidos los biofilms mixtos (formados por más de una especie como in vivo), para lo que no existen productos en el mercado.

Efecto desbridante: la composición de esta invención elimina la capa de fibrina / biofilm / tejido necrótico de la superficie de la herida.

Efecto inhibidor del agrandamiento de la herida: este efecto se logra mediante la inhibición de las MMP y los radicales libres que provoca la composición de esta invención. También lo hace a través de la forma farmacéutica, absorbiendo el exudado. No hay productos en el mercado para este fin.

Efecto oxigenante: El poder oxigenante de la presente invención se consigue mediante la inducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que estimula la angiogénesis. La eliminación de la flora patógena aeróbica también aumenta la pO₂ en la herida.

Efecto colagenador: La presente invención estimula la formación y deposición de colágeno en el lecho de la úlcera.

La composición de esta invención presenta una estabilidad prolongada en comparación con el estado de la técnica ya que se ha demostrado que es activa al menos durante 6 meses.

Un dispositivo para contener la formulación de la presente invención es otro objeto de la presente invención. Dicho dispositivo, en una realización, comprende tres contenedores: un primer contenedor que almacena una primera composición, un segundo contenedor que almacena una segunda composición y un tercer contenedor que almacena la tercera composición. Donde la primera composición es sólida y comprende un polvo de agente gelificante; la segunda composición es sólida y comprende una enzima desoxirribonucleasa y la tercera composición es una solución acuosa que comprende al menos un compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 ó 6 átomos con un grupo imida y al menos un ácido carboxílico; y la tercera composición tiene un pH entre 4,5 y 6,8. La tercera composición podría comprender además uno o más ácidos reductores hidrófilos; uno o más agentes tensioactivos; uno o más ácidos formadores de complejos.

Una realización de la presente invención proporciona un dispositivo de tres contenedores en el que el primer contenedor y el segundo contenedor están separados por una primera membrana colapsable capaz de mantener aisladas la primera composición y la segunda composición; y el segundo contenedor y el tercer contenedor están separados por una segunda membrana colapsable capaz de mantener aisladas la segunda composición y la tercera composición.

El término "membrana colapsable" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier membrana o película que constituye una pared entre dos de dichos contenedores, que los vincula, hecha de material rígido o flexible que sea colapsable, rompible, frangible, rasgable o removible, que permite, al romperse o plegarse, o extraerse poner en contacto las composiciones que contienen dichos contenedores. Estas membranas colapsables están hechas de cualquier material conocido en la técnica, tal como polímero, aluminio, silicio, por ejemplo. Cuando se rompe, colapsa, rasga, colapsa, desintegra o se extrae la membrana colapsable que separa los contenedores adyacentes, las composiciones de dichos contenedores se ponen en contacto.

El término "contenedor", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier contenedor que contenga una composición aislada del ambiente y de otras composiciones. Este contenedor podría compartir una membrana colapsable con otro contenedor que, al romperse esta membrana, se pongan en contacto dichas

composiciones contenidas en esos contenedores. Los contenedores de la presente invención podrían ser contenedores independientes y aislados o podrían ser parte de un solo dispositivo con dos o tres contenedores que comparten membranas colapsables entre ellos, como se puede observar en la figura 1.

El dispositivo de la presente invención es un cartucho o un dispensador.

Una realización proporciona un dispositivo dispensador con una boquilla, que puede incluir una tapa extraíble.

En la figura 1 se muestra un dispositivo ejemplar. Este dispositivo multicompartimental es un cartucho cilíndrico de material rígido. Los materiales útiles para fabricar este dispositivo aquí descrito incluyen polipropileno, aluminio, vidrio de alta barrera, entre otros, para evitar la exposición a la humedad y al oxígeno. Dos membranas colapsables dividen este dispositivo ejemplar en tres contenedores. Esta membrana colapsable podría romperse mediante presión o con cualquier sistema para romper una película, conocido en la técnica.

Otro objetivo de la presente invención es un proceso para preparar la composición tópica de la invención in situ antes de su uso en el tratamiento de heridas. Este proceso comprende los siguientes pasos:

- a. poner en contacto la tercera composición con la segunda composición, rompiendo la segunda membrana colapsable;
- b. mezclar y agitar la tercera composición con la segunda composición;
- c. poner en contacto la primera composición con la mezcla obtenida en el paso b. romper la primera membrana colapsable;
- d. mezclar y agitar obteniendo La composición tópica en gel de la invención.

En el paso a. es posible una mezcla perfecta: la enzima de la segunda composición en el segundo contenedor se distribuye en todo el volumen cuando se agita con la tercera composición acuosa líquida del tercer contenedor. Esta mezcla del paso a. se combina con un agente gelificante de la primera composición en el primer contenedor, en el paso c. y se agitan para obtener una composición de gel homogénea de la invención.

Una realización de la presente invención provee un dispositivo para contener la formulación de la presente invención. Dicho dispositivo comprende dos contenedores: un primer contenedor que almacena una primera composición y un segundo contenedor que almacena una segunda composición. Donde la primera composición es sólida y comprende un polvo de agente gelificante y una enzima desoxirribonucleasa, y la segunda composición es una solución acuosa que comprende al menos un compuesto heterocíclico nitrogenado de 5 o 6 átomos con un grupo imida y al menos un ácido carboxílico; y la tercera composición tiene un pH entre 4,5 y 6,8. La segunda composición podría comprender además uno o más ácidos reductores hidrófilos; uno o más agentes tensioactivos; uno o más ácidos formadores de complejos.

La formulación de la presente invención, que se prepara in situ antes de la aplicación presentaría una fecha de caducidad similar a la de la enzima utilizada.

La estabilidad en el tiempo de la formulación de la invención contenido en el dispositivo de la invención, con dos o tres contenedores, es de aproximadamente dos años. Esta estabilidad es la de la enzima utilizada, ya que se encuentra en forma de polvo liofilizado en un contenedor o compartimento aislado sin estar en contacto con la solución ni con el ambiente. Por tanto, la formulación de la invención, en su dispositivo de la invención, presenta una estabilidad extendida en comparación con el estado de la técnica. Y cuando se prepara la composición de la invención, poniendo en contacto la primera composición con la segunda composición y con la tercera composición (cuando el dispositivo presenta 3 contenedores) y se agita para mezclar todas las composiciones, el gel preparado presenta una estabilidad de unos 6 meses o más.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de soluciones de componentes

Se prepararon soluciones de los diferentes componentes de la composición de la presente invención.

Solvente de mezcla (Sm): Solución salina (0,9%) / MgCl_2 (5 mM). pH 5,5

Se prepara un litro de solución pesando 9.0000 g de Cloruro de Sodio y 1.0106 g de Cloruro de Magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) y disolviéndolos en agua destilada.

Solución alcalina: Una solución de NaHCO_3 1M. En un matraz aforado se preparan 100 ml de solución disolviendo 8,4 g de Bicarbonato de Sodio en agua destilada. Es importante disolver completamente el bicarbonato de sodio con el solvente en un vaso de precipitados para evitar la sobresaturación antes de completar la marca en el matraz. El pH final de la solución alcalina es aproximadamente: 8,6

Solución de ácido láctico en solvente de mezcla (AL). AL se diluye en el solvente de mezcla mencionado y luego se mezcla durante unos minutos. El pH final = 5,5 se alcanza con la solución alcalina. Las concentraciones preparadas fueron: LA 1,63 mg/mL, LA 6,50 mg/mL, LA 8,67 mg/mL.

Solución de polisorbato 80 en solvente de mezcla (PS80). Se diluye PS80 y luego se mezcla durante unos minutos hasta que se alcanza la homogeneización. El pH final = 5,5 se alcanza con la solución alcalina. Las concentraciones preparadas fueron: PS80 2,0 mg/mL, PS80 3,0 mg/mL.

Solución de EDTA en solvente de mezcla: Se disuelve EDTA en el solvente de mezcla mencionado y luego se mezcla durante unos minutos. El pH final = 5,5 se alcanza con la solución alcalina. Las concentraciones preparadas fueron: EDTA 0,25 mg/mL, EDTA 0,50 mg/mL, EDTA 0,75 mg/mL.

Solución de ácido ascórbico en solvente de mezcla (AA). Se disuelve AA en el solvente de mezcla mencionado y luego se mezcla durante unos minutos. El pH final = 5,50 se alcanza utilizando la solución alcalina. Las concentraciones preparadas fueron: AA 0,5 mg/mL, AA 1,0 mg/mL, AA 2,50 mg/mL.

Solución de etosuximida en solvente de mezcla (Eto). Eto se disuelve en el solvente de mezcla y luego se mezcla durante unos minutos. El pH final = 5,5 se alcanza con la solución alcalina. Las concentraciones preparadas fueron: Eto 0,50 mg/mL, Eto 3,00 mg/mL, Eto 30,00 mg/mL.

Solución de rh-Dornasa alfa en el solvente de mezcla (D1). D1 se disuelve en el solvente de mezcla y luego se mezcla durante unos minutos. El pH final = 5,5 se alcanza con la solución alcalina. Las concentraciones preparadas fueron: D1 250 μg / mL, D1 125 μg / mL, D1 62,5 μg / mL, D1 31,2 μg / mL, D1 15,6 μg / mL, D1 7,8 μg / mL, D1 3,9 μg / mL, D1 1,9 μg / mL, D1 0,97 μg / mL, D1 0,5 μg / mL.

Sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* de 24 horas (LAPS 24h) control: *L. plantarum* ATCC 10241 se cultivó durante 12 horas en de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Britania. Argentina) a 37°C. El sobrenadante (LAPS) se obtuvo mediante centrifugación durante 15 min a 8000 rpm y filtración con filtros Millipore de 0,22 μm . Luego se almacenó la preparación a 2-8 °C durante 24 horas. Para obtener la forma farmacéutica en gel, se añadió Hidroxietilcelulosa al 1,7%.

Sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* de 6 meses (LAPS 6m) control: Las preparaciones de LAPS 24 h se almacenaron a 2-8 °C durante 6 meses antes de ser utilizadas.

Ejemplo 2

Composición de la invención. Preparación de la mezcla No. 0 (M0) en laboratorio

La composición de la invención está compuesta por:

- a. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- b. 3.00 mg/mL de etosuximida
- c. 0,97 μg /mL DNasa (rh-Dornasa alfa)

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden 150 mg de etosuximida, 318 μl de ácido láctico y 50 μg de enzima rh-Dornasa alfa.

Modo de preparación

1. Se pesan 150 mg de etosuximida sobre un cristal de reloj con una balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, esta sustancia se eluye en un vaso de precipitado para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
4. A continuación, se añaden 318 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
6. La solución se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de solución en un vaso de precipitados de 100 mL y se sumerge el electrodo medidor de pH Lutron PH-206 previamente calibrado (Lutron Electronics Co. Inc., Pensilvania, EE. UU.).
7. Se coloca el conjunto en un agitador a bajas revoluciones y se agrega gota a gota la solución alcalina hasta alcanzar un pH de 5,5, teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
9. Una vez terminado el proceso de esterilización, se colocan 50 mL de la preparación en tubos cónicos y se añaden 50 µg de enzima rh-Dornasa alfa (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para alcanzar una concentración final de 0,97 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
10. El tubo se sella y se mezcla en un vortex durante 1 minuto.
11. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio y luego se almacena a 4 °C - 25 °C.

Ejemplo 3

Composición de la invención. Preparación de la mezcla No. 13 (M13) en el laboratorio

La composición de la invención comprende:

- a. 3.00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 1.00 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,50 mg/mL de EDTA
- e. 3,00 mg/mL de etosuximida
- f. 0,97 µg/mL de DNAsa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 50 mg de ácido ascórbico, 25 mg de EDTA, 150 mg de etosuximida, 50 µg de rh-Dornasa alfa, 141 µl de polisorbato 80 y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 50 mg de ácido ascórbico y 25 mg de EDTA en vidrio de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitado, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añaden 318 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Se añaden 150 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. Dicha mezcla se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de mezcla en un vaso de precipitados de 100 mL y se sumerge en ella el electrodo medidor de pH Lutron PH-206 previamente calibrado (Lutron Electronics Co. Inc., Pennsylvania, EE. UU.).

8. Se coloca la mezcla del paso 7 en un agitador a bajas revoluciones y se agrega gota a gota la solución alcalina hasta alcanzar pH 5,5, teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
9. La mezcla del paso 8 se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
10. Una vez finalizado el proceso de esterilización, se colocan 50 mL de la mezcla en tubos cónicos de 50 mL y se añaden 50 µg de enzima rh-Dornasa alfa (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones de esterilidad para lograr una concentración final de 0,97 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
11. El tubo se sella y se mezcla en un vórtex durante 1 minuto.
12. La composición de la invención del paso 11 se aísla de la luz utilizando papel de aluminio y luego se almacena a 4 °C - 25 °C.

Ejemplo 4

Composición de la invención. Preparación de la mezcla No. 15 (M15) en el laboratorio.

La composición de la invención comprende:

- a. 2,00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 0,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 1,63 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,25 mg/mL de EDTA
- e. 0,50 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/mL de DNAsa

La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 25,00 mg de ácido ascórbico, 12,50 mg de EDTA, 25 mg de etosuximida, 200 µg de rh-Dornasa alfa, 94 µl de Polisorbato 80 y 80 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 25 mg de ácido ascórbico y 12,50 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).

2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
1. Durante la agitación, se añaden 94 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añaden 80 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Se añaden 25 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. Dicha mezcla se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de mezcla en un vaso de precipitados de 100 mL y se sumerge en ella el electrodo medidor de pH Lutron PH-206 previamente calibrado (Lutron Electronics Co. Inc., Pennsylvania, EE. UU.).
8. Se coloca la mezcla del paso 7 en un agitador a bajas revoluciones y se agrega gota a gota la solución alcalina hasta alcanzar pH 5,5, teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
9. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
10. Una vez finalizado el proceso de esterilización, se colocan 50 ml de la solución de preparación en tubos cónicos de 50 ml y se añaden 200 µg de enzima rh-Dornasa alfa (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 3,90 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
11. El tubo se sella y se mezcla en un vortex durante 1 minuto.
12. La composición de la invención del paso 11 se aísla de la luz utilizando papel de aluminio y luego se almacena a 4 °C - 25 °C.

Ejemplo 5

Composición de la invención Preparación de la mezcla No. 16 (M16) en laboratorio

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 2,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 8.67 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,75 mg/mL de EDTA
- e. 30,00 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/ml de DANsa

La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 125 mg de ácido ascórbico, 37,5 mg de EDTA, 1500 mg de etosuximida, 200 µg de rh-Dornasa alfa, 141 µl de polisorbato 80 y 424 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 125 mg de ácido ascórbico y 37,5 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitado, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añaden 424 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Se añaden 1500 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. Se calibra el electrodo medidor de pH Lutron PH-206 (Lutron Electronics Co. Inc., Pensilvania, EE.UU.) para medir el pH de la preparación.
8. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con el pHmetro en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y

agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH teniendo cuidado con la efervescencia generada por su agregado.

9. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
10. Una vez finalizado el proceso de esterilización, se colocan 50 ml de la solución de preparación en tubos cónicos de 50 ml y se añaden 200 µg de enzima rh-Dornasa alfa (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 3,90 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
11. El tubo se sella y se mezcla en un vórtice durante 1 minuto.
12. La composición de la invención del paso 11 se aísla de la luz utilizando papel de aluminio y luego se almacena a 4 °C - 25 °C.

Ejemplo 6

Composición de la invención. Preparación en gel de la mezcla No. 0 (M0) en el laboratorio

La composición de la invención está compuesta por:

- a. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- b. 3,00 mg/mL de etosuximida
- c. 0,97 µg/mL DNAsa
- d. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden 150,0 mg de etosuximida, 318 µl de ácido láctico y 50 µg de enzima rh-Dornasa alfa.

Modo de preparación

1. Se pesan 150,0 mg de etosuximida en un cristal de reloj con una balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, esta sustancia se eluye en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A

(Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.

4. A continuación, se añaden 318 µl de ácido láctico a la preparación.
 5. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
 6. La solución se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de solución en un vaso de precipitados de 100 mL y se sumerge el electrodo medidor de pH Lutron PH-206 previamente calibrado (Lutron Electronics Co. Inc., Pensilvania, EE. UU.).
 7. Se coloca el conjunto en un agitador a bajas revoluciones y se agrega gota a gota la solución alcalina hasta alcanzar un pH de 5,5, teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
 8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
 9. Una vez terminado el proceso de esterilización, se colocan 50 mL de la preparación en tubos cónicos y se añaden 50 µg de enzima rh-Dornasa alfa (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para alcanzar una concentración final de 0,97 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
 10. El tubo se sella y se mezcla en un vortex durante 1 minuto.
- Gel: La mezcla está formulada (Solución + g)
11. Se añade 0,85 g de hidroxietilcelulosa a la mezcla preparada.
 12. Mezclar suavemente hasta que esté homogéneo.
 13. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio, luego se almacena a 4 - 25°C y se tapa. Debe dejarse reposar entre 6 y 8 horas hasta que se eliminan las burbujas.

Ejemplo 7

Composición de la invención. Preparación en gel de la mezcla No. 13 (M13) en el laboratorio.

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 1,00 mg/mL de ácido ascórbico

- c. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,50 mg/mL de EDTA
- e. 3,00 mg/mL de etosuximida
- f. 0,97 µg/ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 50 mg de ácido ascórbico, 25 mg de EDTA, 150 mg de etosuximida, 50 µg de rh-Dornasa alfa, 141 µl de polisorbato 80 y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 50 mg de ácido ascórbico y 25 mg de EDTA en vidrio de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añaden 318 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Se añaden 150 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. Dicha mezcla se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de mezcla en un vaso de precipitados de 100 mL y se sumerge en ella el electrodo medidor de pH Lutron PH-206 previamente calibrado (Lutron Electronics Co. Inc., Pennsylvania, EE. UU.) .
8. Se coloca la mezcla del paso 7 en un agitador a bajas revoluciones y se agrega gota a gota la solución alcalina hasta alcanzar pH 5,5, teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.

9. La mezcla del paso 8 se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
 10. Una vez finalizado el proceso de esterilización, se colocan 50 mL de la mezcla en tubos cónicos de 50 mL y se añaden 50 µg de enzima rh-Dornasa alfa (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 0,97 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
 11. El tubo se sella y se mezcla en un vórtice durante 1 minuto.
- Gel: Se formula la mezcla (Solución + g)
12. Se añade 0,85 de hidroxietilcelulosa a la mezcla preparada.
 13. Mezclar suavemente hasta que esté homogéneo.
 14. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio, luego se almacena a 4 - 25°C y se tapa. Debe dejarse reposar entre 6 y 8 horas hasta que se eliminen las burbujas.

Ejemplo 8

Composición de la invención. Preparación de gel de la mezcla No. 15 (M15) en el laboratorio.

La composición de la invención comprende:

- a. 2,00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 0,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 1,63 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,25 mg/mL de EDTA
- e. 0,50 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 25,00 mg de ácido ascórbico, 12,50 mg de EDTA, 25 mg de etosuximida, 200 µg de rh-Dornasa alfa, 94 µl de Polisorbato 80 y 80 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 25 mg de ácido ascórbico y 12,5 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
 2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
 3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 94 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
 4. A continuación, se añaden 80 µl de ácido láctico a la preparación.
 5. Se añaden 25 mg de etosuximida.
 6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
 7. Dicha mezcla se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de mezcla en un vaso de precipitados de 100 mL y se sumerge en ella el electrodo medidor de pH Lutron PH-206 previamente calibrado (Lutron Electronics Co. Inc., Pennsylvania, EE. UU.).
 8. Se coloca la mezcla del paso 7 en un agitador a bajas revoluciones y se agrega gota a gota la solución alcalina hasta alcanzar pH 5,5, teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
 9. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
 10. Una vez finalizado el proceso de esterilización, se colocan 50 ml de la solución de preparación en tubos cónicos de 50 ml y se añaden 200 µg de enzima rh-Dornasa alfa (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 3,90 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
 11. El tubo se sella y se mezcla en un vórtice durante 1 minuto.
- Gel: Se formula la mezcla (Solución + g)
12. Se añade 0,85 g de hidroxietilcelulosa a la mezcla preparada.
 13. Mezclar suavemente hasta que esté homogéneo.

14. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio, luego se almacena a 4 - 25°C y se tapa. Debe dejarse reposar entre 6 y 8 horas hasta que se eliminen las burbujas.

Ejemplo 9

Composición de la invención. Preparación de gel de la mezcla No. 16 (M16) en el laboratorio.

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 2,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 8,67 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,75 mg/mL de EDTA
- e. 30,00 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 125 mg de ácido ascórbico, 37,5 mg de EDTA, 1500 mg de etosuximida, 200 µg de rh-Dornasa alfa, 141 µl de polisorbato 80 y 424 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 125 mg de ácido ascórbico y 37,5 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añaden 424 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Se añaden 1500 mg de etosuximida.

6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
 7. Se calibra el electrodo medidor de pH Lutron PH-206 (Lutron Electronics Co. Inc., Pensilvania, EE.UU.) para medir el pH de la preparación.
 8. La solución se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de solución con el pHmetro en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH teniendo cuidado con la efervescencia generada por su agregado.
 9. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
 10. Una vez finalizado el proceso de esterilización, se colocan 50 ml de la solución de preparación en tubos cónicos de 50 ml y se añaden 200 µg de enzima rh-Dornasa alfa (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 3,90 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
 11. El tubo se sella y se mezcla en un vórtice durante 1 minuto.
- Gel: Se formula la mezcla (Solución + g)
12. Se añade 0,85 g de hidroxietilcelulosa a la mezcla preparada.
 13. Mezclar suavemente hasta que esté homogéneo.
 14. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio, luego se almacena a 4 - 25°C y se tapa. Debe dejarse reposar entre 6 y 8 horas hasta que se eliminen las burbujas.

Ejemplo 10

Composición de la invención. Preparación de la mezcla No. 0 (M0) en una formulación farmacéutica preferida.

La composición de la invención está compuesta por:

- a. 6,5 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- b. 3,00 mg/mL de etosuximida
- c. 0,97 µg/mL de DNAsa
- d. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden 150,0 mg de etosuximida y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación

1. Se pesan 150,0 mg de etosuximida en un cristal de reloj con una balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda de todo el solvente de mezcla, esta sustancia se eluye en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. El vaso de precipitados con la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
4. A continuación, se añaden 318 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
6. Se calibra el electrodo del medidor de pH Lutron PH-206 (Lutron Electronics Co. Inc., Pensilvania, EE.UU.) para medir el pH de la preparación.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min y se almacena a 4 - 25 °C, cerrado herméticamente y protegido de las fuentes de luz.

La forma farmacéutica preferida de la presente invención es un gel. El gel se obtiene después de un proceso de dos etapas. El dispositivo de aplicación comprende tres contenedores separados por dos membranas colapsables. La formulación de la invención comprende:

Contenedor 1: Este contenedor está cargado con 0,85 g de hidroxietilcelulosa liofilizada en c.s.p. para obtener un gel con las propiedades reológicas deseadas.

Contenedor 2: En este contenedor se colocan 50 µg de rh-Dornasa alfa liofilizada en c.s.p. para obtener una solución final de 0,97 µg/mL.

Contenedor 3: En este contenedor se colocan 50 mL de la preparación obtenida en el paso 8.

En la primera etapa de mezclado, se rompe la membrana No. 2 para permitir el mezclado de los contenidos de los contenedores 2 y 3. El mezclado mejora la homogeneización.

En la segunda etapa de mezclado, se rompe la membrana No. 1 permitiendo la mezcla del homogeneizado con el contenido del contenedor 1. Este contenedor tiene el excipiente por lo que en esta etapa se logra la composición de la invención en la forma farmacéutica final de gel. La mezcla mejora la homogeneización de todos los componentes.

Ejemplo 11

Composición de la invención. Preparación de la mezcla No. 13 (M13) en una formulación farmacéutica preferida.

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 1,00 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,50 mg/mL de EDTA
- e. 3,00 mg/mL de etosuximida
- f. 0,97 µg/ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 50 mg de ácido ascórbico, 25 mg de EDTA, 150 mg de etosuximida, 141 µl de polisorbato 80 y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 50 mg de ácido ascórbico y 25 mg de EDTA en un cristal de reloj.
2. El solvente de mezcla se eluye en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se

hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.

4. A continuación, se añaden a la preparación 318 µl de ácido láctico.
5. Se añaden los 150 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min y se almacena a 4 - 25 °C, cerrado herméticamente y protegido de las fuentes de luz.

La forma farmacéutica preferida de la presente invención es un gel. El gel se obtiene después de un proceso de dos etapas. El dispositivo de aplicación comprende tres contenedores separados por dos membranas colapsables. El kit de la invención comprende:

Contenedor 1: Este contenedor está cargado con 0,85 g de hidroxietilcelulosa liofilizada en c.s.p. para obtener un gel con las propiedades reológicas deseadas.

Contenedor 2: En este Contenedor se colocan 50 µg de rh-Dornasa alfa liofilizada en c.s.p. para obtener una solución de 0,97 µg / mL.

Contenedor 3: En este contenedor se colocan 50 mL de la preparación obtenida en el paso 8.

En la primera etapa de mezclado, se rompe la membrana No. 2 para permitir el mezclado de los contenidos de los contenedores 2 y 3. El mezclado mejora la homogeneización.

En la segunda etapa de mezclado, se rompe la membrana No. 1 permitiendo la mezcla del homogeneizado con el contenido del contenedor 1. Este contenedor tiene el excipiente por lo que en esta etapa se logra la composición de la invención en la forma farmacéutica final de gel. La mezcla mejora la homogeneización de todos los componentes.

Ejemplo 12

Composición de la invención Preparación de la mezcla nº 15 (M15) en una formulación farmacéutica preferida.

La composición de la invención comprende:

- a. 2,00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 0,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 1,63 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,25 mg/mL de EDTA
- e. 0,50 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 25 mg de ácido ascórbico, 12,5 mg de EDTA, 25 mg de etosuximida, 94 µl de polisorbato 80 y 80 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 25 mg de ácido ascórbico y 12,5 mg de EDTA en un cristal de reloj.
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla solvente en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 94 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añade a la preparación el volumen de 80 µl de ácido láctico.
5. Se añaden los 25 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con el pHmetro en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y

agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH teniendo cuidado con la efervescencia generada por su agregado.

8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min y se almacena a 4 - 25 °C, cerrado herméticamente y protegido de las fuentes de luz.

La forma farmacéutica preferida de la presente invención es un gel. El gel se obtiene después de un proceso de dos etapas. El dispositivo de aplicación comprende tres contenedores separados por dos membranas colapsables. La formulación de la invención comprende:

Contenedor 1: Este contenedor está cargado con 0,85 g de hidroxietilcelulosa liofilizada en c.s.p. para obtener un gel con las propiedades reológicas deseadas.

Contenedor 2: En este contenedor se colocan 200 µg de rh-Dornasa alfa liofilizada en c.s.p. para obtener una solución de 3,90 µg/mL.

Contenedor 3: En este contenedor se colocan 50 mL de la preparación del paso 8.

En la primera etapa de mezclado, se rompe la membrana No. 2 para permitir el mezclado de los contenidos de los contenedores 2 y 3. El mezclado mejora la homogeneización.

En la segunda etapa de mezclado, se rompe la membrana No. 1 permitiendo la mezcla del homogeneizado con el contenido del contenedor 1. Este contenedor tiene el excipiente por lo que en esta etapa se logra la composición de la invención en la forma farmacéutica final de gel. La mezcla mejora la homogeneización de todos los componentes.

Ejemplo 13

Composición de la invención Preparación de la mezcla nº 16 (M16) en una formulación farmacéutica preferida.

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL Polisorbato 80
- b. 2,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 8,67 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,75 mg/mL de EDTA

- e. 30,00 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg / ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 125 mg de ácido ascórbico, 37,5 mg de EDTA, 1.500 mg de etosuximida, 141 µl de polisorbato 80 y 424 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 125 mg de ácido ascórbico y 37,5 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, esta sustancia se eluye en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de añadir el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
4. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
5. A continuación, se añade el volumen de 424 µl de ácido láctico a la preparación.
6. Se añaden los 1500 mg de etosuximida.
7. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
8. La mezcla del paso 6 se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con el electrodo de pHmetro Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta que el nivel de pH sea alcanzado teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
9. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min. y se almacena después de este paso a 4 - 25 °C, cerrado herméticamente y protegido de las fuentes de luz.

La forma farmacéutica preferida de la presente invención es un gel. El gel se obtiene después de un proceso de dos etapas. El dispositivo de aplicación comprende tres

contenedores separados por dos membranas colapsables. La formulación de la invención comprende:

Contenedor 1: Este contenedor está cargado con 0,85 g de hidroxietilcelulosa liofilizada en c.s.p. para obtener un gel con las propiedades reológicas deseadas.

Contenedor 2: En este contenedor se colocan 200 µg de rh-Dornasa alfa liofilizada en c.s.p. para obtener una solución de 3,90 µg/mL.

Contenedor 3: En este contenedor se colocan 50 mL de la preparación obtenida en el paso 8.

En la primera etapa de mezclado, se rompe la membrana No. 2 para permitir el mezclado de los contenidos de los contenedores 2 y 3. El mezclado mejora la homogeneización.

En la segunda etapa de mezclado, se rompe la membrana No. 1 permitiendo la mezcla del homogeneizado con el contenido del contenedor 1. Este contenedor tiene el excipiente por lo que en esta etapa se logra la composición de la invención en la forma farmacéutica final de gel. La mezcla mejora la homogeneización de todos los componentes.

Ejemplo 14

Composición de la invención. Preparación de la mezcla No. 0 (M0) en una formulación farmacéutica preferida.

La composición de la invención comprende:

- a. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- b. 3,00 mg/mL de etosuximida
- c. 0,97 µg/mL de DNAsa
- d. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 150 mg de etosuximida y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 150,0 mg de etosuximida en un cristal de reloj con una balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).

2. Con la ayuda de todo el solvente de mezcla, esta sustancia se eluye en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. El vaso de precipitados con la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
4. A continuación, se añaden 318 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
6. La solución se lleva a un pH final de 5.50, colocando 50 mL de solución con electrodo medidor de pH Lutron PH-206 calibrado en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
7. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min. y se almacena a 4 - 25 °C, herméticamente cerrado y protegido de las fuentes de luz.

La forma farmacéutica preferida de la presente invención es un gel. El gel se obtiene después de un proceso de una etapa. El dispositivo de aplicación comprende dos contenedores separados por una membrana colapsable. La formulación de la presente invención comprende:

Contenedor 1: En este contenedor se colocan 50 mL de la preparación obtenida en el paso 7.

Contenedor 2: En este contenedor se colocan 50 µg de rh-Dornasa alfa liofilizada en c.s.p. para obtener una solución de 0,97 µg/mL y 0,85 g de Hidroxietilcelulosa liofilizada en c.s.p. para obtener un gel con las propiedades reológicas deseadas.

En el proceso de mezcla, se rompe la membrana colapsable para permitir la mezcla de los contenidos de los contenedores 1 y 2. La mezcla permite lograr la forma farmacéutica final y mejora la homogeneización de todos los componentes.

Ejemplo 15

Composición de la invención Preparación de la mezcla nº 13 (M13) en una formulación farmacéutica preferida.

La composición de la invención está compuesta por:

- a. 3,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 1 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,50 mg/mL de EDTA
- e. 3,00 mg/mL de etosuximida
- f. 0,97 µg / ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 50 mg de ácido ascórbico, 25 mg de EDTA, 150 mg de etosuximida, 141 µl de polisorbato 80 y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 50 mg de ácido ascórbico y 25 mg de EDTA en vidrio de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
 - a. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añade a la preparación el volumen de 318 µl de ácido láctico.
5. Se añaden los 150 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH teniendo cuidado con la efervescencia que genera su agregado.

8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min y se almacena a 4 - 25 °C, cerrado herméticamente y protegido de las fuentes de luz.

La forma farmacéutica preferida de la presente invención es un gel. El gel se obtiene después de un proceso de una etapa. El dispositivo de aplicación comprende dos contenedores separados por una membrana colapsable. La formulación de la presente invención comprende:

Contenedor 1: En este contenedor se colocan 50 mL de la preparación obtenida en el paso 8.

Contenedor 2: En este contenedor se colocan 50 µg de rh-Dornasa alfa liofilizada en c.s.p. para obtener una solución de 0,97 µg/mL y 0,85 g de Hidroxietilcelulosa liofilizada en c.s.p. para obtener un gel con las propiedades reológicas deseadas.

En el proceso de mezcla, se rompe la membrana colapsable para permitir la mezcla de los contenidos de los contenedores 1 y 2. La mezcla permite lograr la forma farmacéutica final y mejora la homogeneización de todos los componentes.

Ejemplo 16

Composición de la invención Preparación de la mezcla nº 15 (M15) en la presente invención en una formulación farmacéutica preferida.

La composición de la invención comprende:

- a. 2,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 0,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 1,63 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,25 mg/mL de EDTA
- e. 0,50 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 25 mg de ácido ascórbico, 12,5 mg de EDTA, 25 mg de etosuximida, 94 µl de polisorbato 80 y 80 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 25 mg de ácido ascórbico y 12,5 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
 - a. Durante la agitación, se añaden 94 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añade a la preparación el volumen de 80 µl de ácido láctico.
5. Se añaden los 25 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min y se almacena a 4 - 25 °C, cerrado herméticamente y protegido de las fuentes de luz.

Forma farmacéutica: la forma farmacéutica preferida de la presente invención es un gel. El gel se obtiene después de un proceso de una etapa. El dispositivo de aplicación comprende dos contenedores separados por una membrana colapsable. La presente invención comprende:

Contenedor 1: En este contenedor se colocan 50 mL de la preparación del paso 8.

Contenedor 2: En este contenedor se colocan 200 µg de rh-Dornasa alfa liofilizada en c.s.p. para obtener una solución de 3,90 µg/mL y 0,85 g de Hidroxietilcelulosa liofilizada en c.s.p. para obtener un gel con las propiedades reológicas deseadas.

En el proceso de mezcla, se rompe la membrana colapsable para permitir la mezcla de los contenidos de los contenedores 1 y 2. La mezcla permite lograr la forma farmacéutica final y mejora la homogeneización de todos los componentes.

Ejemplo 17

Composición de la invención. Preparación de la mezcla nº 16 (M16) en una forma preferida de la presente invención.

La composición de la invención está compuesta por:

- a. 3,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 2,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 8,67 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,75 mg/mL de EDTA
- e. 30,00 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 125 mg de ácido ascórbico, 37,5 mg de EDTA, 1500 mg de etosuximida, 141 µl de polisorbato 80 y 424 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 125 mg de ácido ascórbico y 37,5 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añade el volumen de 424 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Se añaden los 1500 mg de etosuximida.

6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.

7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.

8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min y se almacena a 4 - 25 °C, cerrado herméticamente y protegido de las fuentes de luz.

Forma farmacéutica: la forma farmacéutica preferida de la presente invención es un gel. El gel se obtiene después de un proceso de una etapa. El dispositivo de aplicación comprende dos contenedores separados por una membrana colapsable. La formulación de la presente invención comprende:

Contenedor 1: En este contenedor se colocan 50 mL de la preparación del paso 8.

Contenedor 2: En este contenedor se colocan 200 µg de rh-Dornasa alfa liofilizada en c.s.p. para obtener una solución de 3,90 µg/mL y 0,85 g de Hidroxietilcelulosa liofilizada en c.s.p. para obtener un gel con las propiedades reológicas deseadas.

En el proceso de mezcla, se rompe la membrana colapsable para permitir la mezcla de los contenidos de los contenedores 1 y 2. La mezcla permite lograr la forma farmacéutica final y mejora la homogeneización de todos los componentes

Ejemplo 18

Composición de la invención. Preparación de la mezcla No. 0 (M0) en laboratorio

La composición de la invención comprende:

- a. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- b. si. 3,00 mg/mL de etosuximida
- c. C. 0,97 µg/mL de DNAsa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 150 mg de etosuximida, 50 µg de rh-Dornasa alfa y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 150,0 mg de etosuximida en un cristal de reloj con una balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda de todo el solvente de mezcla, esta sustancia se eluye en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. El vaso de precipitados con la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
4. A continuación, se añaden 318 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
6. La solución se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
7. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
8. Se colocan 50 ml de la preparación del paso 7 en tubos cónicos (50 ml) y se añaden 0,05 ml de Dornasa alfa 1 mg/mL de enzima Pulmozyme (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 0,97 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
9. Una vez sellado, el tubo se mezcla en vórtex durante 10 segundos.
10. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio y luego se almacena a 4 °C - 25 °C.

Ejemplo 19

Composición de la invención. Preparación de la mezcla No. 13 (M13) en el laboratorio

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 1 mg/mL de ácido ascórbico

- c. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,50 mg/mL de EDTA
- e. 3,00 mg/mL de etosuximida
- f. 0,97 µg/mL de DNAsa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 50 mg de ácido ascórbico, 25 mg de EDTA, 150 mg de etosuximida, 50 µg de rh-Dornasa alfa, 141 µl de polisorbato 80 y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 50 mg de ácido ascórbico y 25 mg de EDTA en vidrio de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añade a la preparación el volumen de 318 µl de ácido láctico.
5. Se añaden los 150 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
9. Se colocan 50 ml de la preparación del paso 8 en tubos cónicos (50 ml) y se añaden 0,05 ml de Dornasa alfa 1 mg/mL de enzima Pulmozyme (Roche, Basilea, Suiza) en

condiciones estériles para lograr una concentración final de 0,97 µg / ml. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.

10. Una vez sellado, el tubo se mezcla en vórtex durante 10 segundos.

11. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio y luego se almacena a 4 °C - 25 °C.

Ejemplo 20

Composición de la invención Preparación de la mezcla No. 15 (M15) en el laboratorio

La composición de la invención está compuesta por:

- a. 2,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 0,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 1,63 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,25 mg/mL de EDTA
- e. 0,50 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/mL de DNAsa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 25 mg de ácido ascórbico, 12,5 mg de EDTA, 25 mg de etosuximida, 200 µg de rh-Dornasa alfa, 94 µl de Polisorbato 80 y 80 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 25 mg de ácido ascórbico y 12,5 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 94 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añade a la preparación el volumen de 80 µl de ácido láctico.

5. Se añaden los 25 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
9. Se colocan 50 ml de la preparación del paso 8 en tubos cónicos (50 ml) y se añaden 0,20 ml de Dornasa alfa 1 mg/mL de enzima Pulmozyme (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 3,90 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
10. Una vez sellado, el tubo se mezcla en vórtex durante 10 segundos.
11. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio y luego se almacena a 4 °C - 25 °C.

Ejemplo 21

Composición de la invención Preparación de la mezcla No. 16 (M16) en laboratorio

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 2,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 8,67 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,75 mg/mL de EDTA
- e. 30,00 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/mL de DNAsa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 125 mg de ácido ascórbico, 37,5 mg de EDTA, 1500 mg de etosuximida, 200 µg de rh-Dornasa alfa, 141 µl de polisorbato 80 y 424 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 125 mg de ácido ascórbico y 37,50 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añade el volumen de 424 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Se añaden los 1500 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
9. Se colocan 50 ml de la preparación del paso 8 en tubos cónicos (50 ml) y se añaden 0,20 ml de Dornasa alfa 1 mg/mL de enzima Pulmozyme (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 3,90 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
10. Una vez sellado, el tubo se mezcla en vórtex durante 10 segundos.
11. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio y luego se almacena a 4 °C - 25 °C.

Ejemplo 22

Composición de gel de la invención. Preparación de la mezcla No. 0 (M0) en laboratorio

La composición de la invención comprende:

- a. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- b. 3,00 mg/mL de etosuximida
- c. 0,97 µg/mL de DNAsa
- d. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 150 mg de etosuximida, 50 µg de rh-Dornasa alfa y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 150,0 mg de etosuximida en un cristal de reloj con una balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda de todo el solvente de mezcla, esta sustancia se eluye en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. El vaso de precipitados con la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente.
4. A continuación, se añaden 318 µl de ácido láctico a la preparación.
5. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
6. La solución se lleva a un pH final de 5,5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
7. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
8. Se colocan 50 ml de la preparación obtenida en el paso 7 en tubos cónicos (50 ml) y se añaden 0,05 ml de Dornasa alfa 1 mg/mL de enzima Pulmozyme (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 0,97 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
9. Una vez sellado, el tubo se mezcla en vórtex durante 10 segundos.

Gel: Se formula la mezcla (Solución + g)

10. Se añaden 0,85 g de hidroxietilcelulosa a la mezcla preparada.

11. Mezclar suavemente hasta lograr la homogeneización.

12. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio, luego se almacena a 4 - 25°C y se tapa. Debe dejarse reposar entre 6 y 8 horas hasta que se eliminen las burbujas.

Ejemplo 23

Composición de gel de la invención. Preparación de la mezcla No. 13 (M13) en el laboratorio

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 1 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 6,50 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,50 mg/mL de EDTA
- e. 3,00 mg/mL de etosuximida
- f. 0,97 µg/mL de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml solvente de mezcla se añaden: 50 mg de ácido ascórbico, 25 mg de EDTA, 150 mg de etosuximida, 50 µg de rh-Dornasa alfa, 141 µl de polisorbato 80 y 318 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

- 1. Se pesan 50 mg de ácido ascórbico y 25 mg de EDTA en vidrio de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
- 2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
- 3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se

hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.

4. A continuación, se añade a la preparación el volumen de 318 µl de ácido láctico.
 5. Se añaden los 150 mg de etosuximida.
 6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
 7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
 8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
 9. Se colocan 50 ml de la preparación del paso 8 en tubos cónicos (50 ml) y se añaden 0,05 ml de Dornasa alfa 1 mg/mL de enzima Pulmozyme (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 0,97 µg/ml. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
 10. Una vez sellado, el tubo se mezcla en vórtex durante 10 segundos.
- Gel: Se formula la mezcla (Solución + g)
11. Se añaden 0,85 g de hidroxietilcelulosa a la mezcla preparada.
 12. Mezclar suavemente hasta lograr la homogenización.
 13. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio, luego se almacena a 4 - 25°C y se tapa. Debe dejarse reposar entre 6 y 8 horas hasta que se eliminan las burbujas.

Ejemplo 24

Composición en gel de la invención Preparación de la mezcla No. 15 (M15) en el laboratorio

La composición de la invención está compuesta por:

- a. 2,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 0,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 1,63 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)

- d. 0,25 mg/mL de EDTA
- e. 0,50 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/ml de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 25 mg de ácido ascórbico, 12,5 mg de EDTA, 25 mg de etosuximida, 200 µg de rh-Dornasa alfa, 94 µl de polisorbato 80 y 80 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 25 mg de ácido ascórbico y 12,5 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.
3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 94 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
4. A continuación, se añade a la preparación el volumen de 80 µl de ácido láctico.
5. Se añaden los 25 mg de etosuximida.
6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
9. Se colocan 50 ml de la preparación del paso 8 en tubos cónicos (50 ml) y se añaden 0,20 ml de Dornasa alfa 1 mg/mL de enzima Pulmozyme (Roche, Basilea, Suiza) en

condiciones estériles para lograr una concentración final de 3,90 µg/mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.

10. Una vez sellado, el tubo se mezcla en vórtex durante 10 segundos.

Gel: Se formula la mezcla (Solución + g)

11. Se añaden 0,85 g de hidroxietilcelulosa a la mezcla preparada.

12. Mezclar suavemente hasta lograr la homogenización.

13. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio, luego se almacena a 4 - 25°C y se tapa. Debe dejarse reposar entre 6 y 8 horas hasta que se eliminen las burbujas.

Ejemplo 25

Composición de gel de la invención Preparación de la mezcla No. 16 (M16) en el laboratorio

La composición de la invención comprende:

- a. 3,00 mg/mL de polisorbato 80
- b. 2,50 mg/mL de ácido ascórbico
- c. 8,67 mg/mL de ácido láctico (85% - 90% de pureza)
- d. 0,75 mg/mL de EDTA
- e. 30,00 mg/mL de etosuximida
- f. 3,90 µg/mL de DNAsa
- g. 17 mg/mL de hidroxietilcelulosa

Solución: La mezcla está formulada (a + b + c + d + e + f)

En 50 ml de solvente de mezcla se añaden: 125 mg de ácido ascórbico, 37,50 mg de EDTA, 1500 mg de etosuximida, 200 µg de rh-Dornasa alfa, 141 µl de Polisorbato 80 y 424 µl de ácido láctico.

Modo de preparación:

1. Se pesan 125 mg de ácido ascórbico y 37,50 mg de EDTA en un cristal de reloj con balanza analítica Radwag AS 220 R2 (Radwag LLC, Radom, Polonia).
2. Con la ayuda del solvente de mezcla, se eluye esta sustancia en un vaso de precipitados para no dejar partículas en el cristal del reloj.

3. Después de agregar el resto de los 50 ml del solvente de mezcla en el vaso de precipitados, la preparación se coloca en un agitador magnético NUMAK GL-3250A (Numak Technology LLC, Dubai, UAE) durante 5 min hasta que las partículas sólidas se hayan disuelto parcialmente. Durante la agitación, se añaden 141 µl de polisorbato 80 con puntas de 200 µl cortando la punta.
 4. A continuación, se añade el volumen de 424 µl de ácido láctico a la preparación.
 5. Se añaden los 1500 mg de etosuximida.
 6. Una vez agregadas estas sustancias, la mezcla se deja agitando durante 5 minutos más.
 7. La solución se lleva a un pH final de 5.5, colocando 50 mL de solución con un pHmetro calibrado Lutron PH-206 en un vaso de precipitados de 100 mL en un agitador a bajas revoluciones y agregando la solución alcalina gota a gota hasta alcanzar el nivel de pH. cuidado con la efervescencia que genera su agregado.
 8. La preparación se esteriliza en autoclave Arcano LS-B75L a 120 ° C a 1 atm de sobrepresión durante 10 min.
 9. Se colocan 50 ml de la preparación del paso 8 en tubos cónicos (50 ml) y se añaden 0,20 ml de Dornasa alfa 1 mg/mL de enzima Pulmozyme (Roche, Basilea, Suiza) en condiciones estériles para lograr una concentración final de 3,90 µg / mL. Este paso se realiza en una cabina de seguridad biológica.
 10. Una vez sellado, el tubo se mezcla en vórtex durante 10 segundos.
- Gel: Se formula la mezcla (Solución + g)
11. Se añaden 0,85 g de hidroxietilcelulosa a la mezcla preparada.
 12. Mezclar suavemente hasta lograr la homogenización.
 13. La preparación se aísla de la luz con papel de aluminio, luego se almacena a 4 - 25°C y se tapa. Debe dejarse reposar entre 6 y 8 horas hasta que se eliminen las burbujas.

Ejemplos relacionados con ensayos con las composiciones de la presente invención

Se han formulado y probado diversas composiciones de la presente invención para demostrar sus efectos técnicos.

En la siguiente tabla se puede ver un resumen de algunas composiciones de la invención utilizadas para evaluar la presente invención:

	AL (mg/mL)	PS80 (mg/mL)	EDTA (mg/mL)	AA (mg/mL)	Eto (mg/mL)	rh-dornasa alfa (µg/mL)
M0	6,50	0	0	0	3,0	0,97
M13	6,50	3,0	0,50	1,0	3,0	0,97
M15	1,63	2,00	0,25	0,50	0,50	3,90
M16	8,67	3,00	0,75	2,50	30,00	3,90

Tabla 1: Concentraciones de los diferentes componentes en el solvente de mezcla (Sm; pH 5,5) de las composiciones ensayadas

Además, se ensayaron soluciones de moléculas individuales (preparadas como se observa ver en el ejemplo 1) para demostrar las propiedades sinérgicas de la composición de la presente invención. Las soluciones probadas fueron:

1. Ácido láctico (AL) en solvente de mezcla: 1,63 mg/ml; 6,50 mg/ml; 8,67 mg/ml.
pH final de todas las soluciones: 5,5

2. Polisorbato 80 (PS80) en solvente de mezcla: 2,0 mg/ml; 3,0 mg/ml. pH final de todas las soluciones: 5,5

3. EDTA en solvente de mezcla: 0,25 mg/ml; 0,50 mg/ml; 0,75 mg/ml. pH final de todas las soluciones: 5,5

4. Ácido ascórbico (AA) en solvente de mezcla: 0,5 mg/ml; 1,0 mg/ml; 2,5 mg/ml.
pH final de todas las soluciones: 5,5

5. Etosuximida (Eto) en solvente de mezcla: 0,50 mg/ml; 3,00 mg/ml; 30,00 mg/ml.
pH final de todas las soluciones: 5,5

6. Dornasa alfa (D1) en solvente de mezcla: 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,2 µg/mL; 15,6 µg/mL; 7,8 µg/mL; 3.9 µg/mL; 1,9 µg/mL; 0,97 µg/ml; 0,5 µg /ml. pH final de todas las soluciones: 5,5.

Ejemplo 26

Efectos antipatógenos

Cepas de bacterias:

1) *Pseudomonas aeruginosa* cepa mucoide (Código interno LEF037): Aislamiento clínico de úlcera venosa crónica con más de 6 meses de evolución.

2) *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (código interno LEF006). Aislamiento clínico de úlcera venosa crónica con más de 6 meses de evolución.

Suspensiones bacterianas: Se sembró *P. aeruginosa* LEF037 durante 12 h en medio de cultivo Luria-Bertani (LB) a 37°C. A partir de este cultivo, se preparó una suspensión ($DO_{600\text{ nm}} = 0,120$) en LB. Se sembró *S. aureus* LEF006 durante 12 h en medio de cultivo Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C. A partir de este cultivo, se preparó una suspensión ($DO_{600\text{ nm}} = 0,120$) en BHI.

Controles: En los ensayos realizados se han utilizado los siguientes controles:

- a. Control de crecimiento normal para *P. aeruginosa*: medio Luria Bertani (LB) (pH 7,2).
- b. Control de crecimiento normal para *S. aureus*: medio Brain Heart Infusion (BHI) (pH 7,2).
- c. Control del efecto de dilución: Solvente de mezcla (Sm) (pH 5,50).
- d. Control del efecto LAPS recién obtenido: LAPS almacenado durante 24 horas a 4°C (pH 5,22) (LAPS 24h).
- e. Control de conservación de la actividad de LAPS: LAPS almacenado durante 6 meses a 4°C (pH 6,05) (LAPS6m).

Sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* (LAPS): se prepararon controles de LAPS de acuerdo con los detalles del ejemplo 1. Se sembró *L. plantarum* ATCC 10241 durante 12 h en de Man Rogosa Sharpe (MRS) (Britania. Argentina) a 37°C. El sobrenadante (LAPS) se obtuvo mediante centrifugación durante 15 min a 8000 rpm y filtración con filtros Millipore de 0,22 µm. Este sobrenadante corresponde a la solicitud de patente N°

AR093779 y se toma como el producto conocido del mejor efecto terapéutico para el tratamiento de heridas crónicas. Este producto presenta algunos problemas que la presente invención pretende solucionar. Por un lado, de las pruebas que se presentan a continuación, se observa que pierde su eficiencia con el tiempo. También presenta problemas regulatorios porque no tiene una composición absolutamente definida debido a que depende de un proceso de fermentación. La presente invención consigue una gran estabilidad prolongada en el tiempo y está constituida por componentes absolutamente definidos y aprobados para uso terapéutico humano.

Soluciones de moléculas individuales: Todas las soluciones se prepararon en solvente de mezcla con un pH final de 5,5 según el ejemplo 1. Las soluciones preparadas fueron: 1. Ácido láctico (AL) (1,63, 6,50 y 8,67 mg/ml); 2. Polisorbato 80 (PS80) (2,0 y 3,0 mg/ml); 3. EDTA (0,25, 0,50 y 0,75 mg/ml); 4. Ácido ascórbico (AA) (0,5, 1,0 y 2,5 mg/ml); 5. Etosuximida (Eto) (0,50, 3,00 y 30,00 mg/ml); 6. rh-Dornasa alfa (D1) (0,97 y 3,9 µg/ml).

M0, M13, M15 y M16 (consulte la Tabla 1). Las composiciones de la invención se elaboraron según los ejemplos 18 a 21.

Ensayos para la determinación del efecto bacteriostático: Para los ensayos bacteriostáticos se utilizaron placas de 96 pocillos (Deltalab. Argentina) (200 µL de capacidad). Todos los ensayos se realizaron por triplicado utilizando 100 µL de medio de cultivo LB o medio de cultivo BHI con 50 µL de la suspensión bacteriana de *P. aeruginosa* o *S. aureus*, respectivamente. Posteriormente, se colocaron las siguientes muestras:

- a) 50 µL de los controles (Ver controles),
- b) Soluciones de 50 µL de moléculas individuales (Ver Soluciones de moléculas individuales)
- c) 50 µL de mezclas de moléculas.

A continuación, se colocó la microplaca en un lector de microplacas (Multiskan Go. Thermo Scientific. Alemania) utilizando el siguiente programa de lectura: a) Incubación a 37°C; b) Ligera agitación (duración de 3 segundos) cada 58 minutos, c) Ciclo de lectura de absorbancia a 600 nm una vez por hora durante 24 h. La densidad óptica (DO) inicial para todos los pocillos fue de 0,100. Los datos se analizaron en Microsoft Excel®, calculando

promedios. Los resultados se muestran en columna como porcentaje del efecto bacteriostático a las 24 h.

Ensayos para la determinación del efecto bactericida: de las pruebas utilizadas para la determinación del efecto bacteriostático, se tomaron alícuotas de 10 µL de cada pocillo, se hicieron diluciones seriadas y se sembró una alícuota de cada dilución en agar LB o BHI según la cepa bacteriana. Se contaron los números iniciales de unidades formadoras de colonias (UFC) para compararlos con el número final de UFC obtenido después de 24 h de tratamiento. Se calculó el número de bacterias supervivientes, representandolas en columnas según el número de UFC/mL obtenido tras el tratamiento.

Ensayos para la determinación del efecto inhibidor del biofilm: Después de 24 h del ensayo de inhibición del crecimiento, se descartó el contenido de los pocillos y se lavaron tres veces los pocillos vacíos con solución fisiológica estéril. Las placas se secaron a temperatura ambiente durante 15 minutos (boca abajo, sobre papel absorbente). A cada pocillo se le añadieron 200 µL de cristal violeta al 0,1% y la placa se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con agitación suave y constante en Vortex (Labnet) para teñir el biofilm adherido a la pared de los pocillos. Posteriormente, se descartó el contenido de los pocillos, se lavó tres veces con solución fisiológica estéril y se secó a temperatura ambiente durante 15 minutos (boca abajo, sobre papel absorbente). A continuación, para disolver el violeta cristal adherido al biofilm, se añadieron 200 µL de etanol 96° a cada pocillo y las placas se incubaron durante 10 minutos con agitación suave y constante en Vortex (Labnet) a temperatura ambiente. La cantidad de cristal violeta es directamente proporcional a la cantidad de biofilm formado. De esta forma, en cada pocillo se obtuvo una solución, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de biofilm formado. La lectura de la absorbancia se realizó con precisión a 540 nm, a 37°C en el lector de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific). Los datos se procesaron en Microsoft Excel®, se calcularon los promedios y los resultados se muestran en la columna como porcentaje de inhibición de la formación de biofilm.

Ensayos para la determinación del efecto de disrupción del biofilm: En placas de 96 pocillos (Deltalab) se colocaron 150 µL de medio de cultivo + 50 µL de suspensión bacteriana. Las placas se incubaron en una cámara húmeda, a 37 ° C durante 24 horas

hasta la formación del biofilm. Posteriormente, el contenido de los pocillos se descartó cuidadosamente, se lavó suavemente tres veces con solución fisiológica estéril, evitando la pérdida de biofilm adherido a las paredes. Las placas se secaron durante 20 min a temperatura ambiente en una cabina de seguridad biológica. Luego, se agregaron 150 μL de medio de cultivo y respectivamente: 50 μL de controles, 50 μL de soluciones de moléculas individuales y 50 μL de mezclas de moléculas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron en una cámara húmeda a 37°C durante 24 horas. Después de eso, se descartó el contenido de los pocillos y se lavó tres veces con solución fisiológica estéril. Las placas se secaron a temperatura ambiente durante 15 minutos (boca abajo sobre papel absorbente). Los pocillos se tiñeron con 200 μL /pocillo de cristal violeta al 0,1%, durante 15 minutos con agitación suave y constante en Vortex (Labnet) a temperatura ambiente. El contenido de los pocillos se descartó, se lavó tres veces con solución salina estéril y las placas se secaron a temperatura ambiente durante 15 minutos (boca abajo sobre papel absorbente). Finalmente, se agregaron 200 μL /pocillo de etanol de 96° para disolver el cristal violeta adherido al biofilm. Las placas se incubaron durante 10 minutos con agitación suave y constante en Vortex (Labnet) a temperatura ambiente. La absorbancia de las soluciones resultantes se midió en el lector de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific) a 540 nm (37°C). Los datos se procesaron en Microsoft Excel®, se calcularon los promedios y los resultados se muestran en la columna como porcentaje de la disrupción del biofilm.

Resultados y discusiones

En la figura 2 se muestran los porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, la inhibición de la formación de Biofilm (BF) y la disrupción de biofilm preformado sobre *Pseudomonas aeruginosa* causada por las composiciones M0 y M13 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en las composiciones mencionadas. La figura también muestra estas propiedades para LAPS 24 horas, LAPS 6 meses y solvente de mezcla (Sm).

Las moléculas individuales presentaron alguna actividad para cada propiedad. Sin embargo, M0 y M13 muestran un poder sinérgico para todas las actividades. Aunque LAPS 24h tuvo un gran efecto bacteriostático y de inhibición de BF, su efecto de disrupción

sobre el biofilm fue menor que el de las composiciones. Además, después de 6 meses, LAPS perdió drásticamente sus efectos antipatogénicos.

La Figura 3 muestra el efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC/mL) de *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 h de tratamiento utilizando las composiciones M0 y M13 y las diferentes moléculas individuales a concentraciones que se encuentran en las composiciones mencionadas.

Como muestra la figura, ninguna de las moléculas individuales causó un efecto bactericida porque el número de bacterias supervivientes fue similar al control (no tratadas). LAPS mostró un importante efecto bactericida, pero se pierde con el tiempo. M0 muestra un notable efecto bactericida mientras que M13 provocó una eliminación absoluta de la bacteria.

La Figura 4 muestra los porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, la inhibición de la formación de Biofilm (BF) y la disrupción de biofilm preformada sobre *Pseudomonas aeruginosa* causada por la composición M15 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en las composiciones mencionadas. La figura también muestra estas propiedades para LAPS 24 horas, LAPS 6 meses y solvente de mezcla (Sm). Las moléculas individuales presentaron alguna actividad para cada propiedad. Sin embargo, M15 muestra un poder sinérgico para todas las actividades. Aunque LAPS 24h tuvo un gran efecto bacteriostático y de inhibición BF, su efecto de disrupción sobre el biofilm fue menor que el de la composición M15. Además, después de 6 meses, LAPS perdió drásticamente sus efectos antipatogénicos.

La Figura 5 muestra el efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC / mL) de *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 h de tratamiento utilizando la composición M15 y las diferentes moléculas individuales a concentraciones que se encuentran en dicha composición. Como muestra la figura, ninguna de las moléculas individuales causó un efecto bactericida porque el número de bacterias supervivientes fue similar al control (no tratadas). LAPS tuvo un importante efecto bactericida pero este efecto se pierde con el tiempo. M15 provocó una gran eliminación de las bacterias.

En la Figura 6 se muestran los porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, la inhibición de la formación de Biofilm (BF) y la disrupción de biofilm preformada sobre *Pseudomonas aeruginosa* causada por la composición M16 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en la composición mencionada. La figura también muestra estas propiedades para LAPS de 24 horas, LAPS de 6 meses y solvente de mezcla (Sm). Las moléculas individuales presentaron alguna actividad para cada propiedad. Sin embargo, M16 muestra un notable poder sinérgico para todas las actividades. Aunque LAPS 24h tuvo un gran efecto bacteriostático y de inhibición BF, su efecto de disrupción sobre el biofilm fue menor que la formulación. Además, después de 6 meses, LAPS perdió drásticamente sus efectos anti-patogénicos.

La Figura 7 muestra el efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC/mL) de *Pseudomonas aeruginosa* después de 24 h de tratamiento utilizando la composición M16 y las diferentes moléculas individuales a concentraciones que se encuentran en dicha composición. Como muestra la figura, algunas de las moléculas individuales causaron un efecto bactericida bajo porque el número de bacterias supervivientes fue similar al del control (no tratadas). LAPS tuvo un importante efecto bactericida, pero este efecto se pierde con el tiempo, mientras que M16 provocó una completa eliminación de la bacteria.

En la figura 8 se muestran los porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, la inhibición de la formación de Biofilm (BF) y la disrupción de biofilm preformada sobre *Staphylococcus aureus* causada por las composiciones M0 y M13 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en las composiciones mencionadas. La figura también muestra estas propiedades de de LAPS de 24 horas, de 6 meses y del solvente de mezcla (Sm).

Las moléculas individuales presentaron alguna actividad para cada propiedad. Sin embargo, M13 muestra un poder sinérgico para todas las actividades. M0 presentó sinergismo para la inhibición de la formación de Biofilm (BF) y disrupción del biofilm. Aunque LAPS 24h tuvo un gran efecto bacteriostático y de inhibición de BF, su efecto de disrupción de biofilm fue menor que las formulaciones. Además, después de 6 meses, LAPS perdió drásticamente sus efectos anti-patógenos.

La Figura 9 muestra el efecto bactericida expresado en bacterias supervivientes (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* después de 24 h de tratamiento utilizando las composiciones M0 y M13 y las diferentes moléculas individuales a concentraciones que se encuentran en las composiciones mencionadas.

Como muestra la figura, la mayoría de las moléculas individuales no causaron un efecto bactericida porque el número de bacterias supervivientes fue similar al del control (no tratadas). LAPS tuvo un importante efecto bactericida, pero este efecto se pierde con el tiempo. M0 muestra un notable efecto bactericida mientras que la eliminación de bacterias por M13 fue mayor.

En la Figura 10 se muestran los porcentajes de diferentes efectos antipatogénicos: la actividad bacteriostática, la inhibición de la formación de Biofilm (BF) y la disrupción de biofilm preformado sobre *S. aureus* provocada por la composición M15 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en la composición mencionada. La figura también muestra estas propiedades de LAPS de 24 horas, de 6 meses y del solvente de mezcla (Sm).

Las moléculas individuales presentaron alguna actividad para cada propiedad. Sin embargo, M15 muestra un poder sinérgico para todas las actividades. Aunque LAPS 24h tuvo un gran efecto bacteriostático y de inhibición BF, su efecto de disrupción sobre el biofilm fue menor que el de la formulación. Además, después de 6 meses, LAPS perdió drásticamente sus efectos anti-patógenos.

La Figura 11 muestra el efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* después de 24 h de tratamiento utilizando la composición M15 y las diferentes moléculas individuales a concentraciones que se encuentran en la composición mencionada.

Como muestra la figura, la mayoría de las moléculas individuales no causaron un efecto bactericida porque el número de bacterias supervivientes fue similar al del control (no tratadas). LAPS tuvo algún efecto bactericida, pero se pierde con el tiempo. Finalmente, M15 provocó una gran eliminación de las bacterias.

En la Figura 12 se muestran los porcentajes de los diferentes efectos antipatógenos: la actividad bacteriostática, la inhibición de la formación de Biofilm (BF) y la disrupción de biofilm preformada sobre *Staphylococcus aureus* causada por la composición M16 y las moléculas individuales a las concentraciones que se encuentran en la formulación mencionada. La figura también muestra estas propiedades de LAPS de 24 horas, 6 meses y del solvente de mezcla (Sm).

Las moléculas individuales presentaron alguna actividad para cada propiedad. Sin embargo, M16 muestra un notable poder sinérgico para todas las actividades. Aunque LAPS 24h tuvo un gran efecto bacteriostático y de inhibición BF, su efecto de disrupción de biofilm fue menor que la formulación. Además, después de 6 meses, LAPS perdió drásticamente sus efectos anti-patógenos.

La Figura 13 muestra el efecto bactericida expresado en las bacterias supervivientes (UFC/mL) de *Staphylococcus aureus* después de 24 h de tratamiento utilizando la composición M16 y las diferentes moléculas individuales a concentraciones que se encuentran en dicha composición.

Como muestra la figura, algunas de las moléculas individuales causan un efecto bactericida bajo porque el número de bacterias supervivientes fue similar al del control (no tratadas). LAPS tuvo un importante efecto bactericida, pero este efecto se perdió con el tiempo, mientras que M16 provocó la mayor eliminación de la bacteria.

La capacidad de disrupción del biofilm es una de las propiedades más buscadas en el tratamiento de heridas crónicas, ya que el paciente acude al médico cuando el biofilm ya se ha formado sobre la herida. Se sabe que los antimicrobianos convencionales no son capaces de provocar disrupción del biofilm, teniendo una eficacia relativa especialmente *in vivo*, debido a que:

- Cada especie tiene una composición química diferente de la matriz de su biofilm.
- Las infecciones son polimicrobianas, lo que conduce a la formación de biofilm mixtos.
- Los tratamientos existentes apuntan a una composición química particular.

Es por eso que los tratamientos existentes siempre dejan restos de biofilm mixtos que se convierten en nuevas fuentes de infección, cronificando la infección. Los buenos tratamientos disruptivos deben atacar biofilms mixtos y biofilms de diferentes especies, produciendo disrupciones cercanas al 100%.

Conclusión

Sorprendentemente, los componentes de esta invención muestran propiedades sinérgicas bacteriostáticas, bactericidas, de inhibición y disrupción de biofilm en las bacterias más identificadas en heridas crónicas (*P. aeruginosa* y *S. aureus*). Esta invención también muestra un efecto superior a LAPS en las propiedades estudiadas sobre *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Ejemplo 27

Capacidad antioxidante de las composiciones de la invención

El método para determinar la actividad antioxidante se basa en la capacidad para atrapar radicales libres del 2,2-difenil -1-picrilhidrazilo (DPPH) (una sustancia que da protones es una sustancia antioxidante). El radical DPPH* acepta un protón de la sustancia antioxidante y se convierte en DPPH. De esta forma, el efecto antioxidante es proporcional a la disminución de DPPH *. El DPPH* tiene su absorbancia máxima a 517 nm, cambiando de púrpura a amarillo cuando se forma DPPH. Por lo tanto, el efecto antioxidante podría medirse siguiendo la caída de absorbancia a 517 nm mediante espectrofotometría. Luego, con los valores inicial y final de absorbancia de las muestras, se calcula el Coeficiente de Inhibición 50 (IC50). IC50 representa la concentración mínima de la sustancia antioxidante necesaria para reducir el 50% del DPPH*. Para obtener el CI50, se realizaron dos curvas de concentración creciente: la primera usando la muestra probada y la segunda usando un estándar de referencia (Trolox). Finalmente, el porcentaje de la actividad antioxidante relativa (% AAR) se calcula siguiendo las recomendaciones de Sharma *et al.* (42)

Preparación de la solución madre (solución standard, SS) y la solución de trabajo (ST) del radical DPPH *: Se prepara una solución de aproximadamente 100 ppm de DPPH en metanol absoluto. La solución debe reposar a temperatura ambiente en la oscuridad

durante al menos 30 minutos. A continuación, se prepara la ST a partir de la SS con metanol absoluto, hasta obtener una absorbancia de $0,800 \pm 0,100$ en la microplaca, a una longitud de onda de 517 nm.

Preparación de la solución estándar de Trolox: Preparar una SS = 500 ppm. Para obtener un volumen de 10 mL, se deben disolver 5 mg de Trolox en 10 mL de metanol absoluto. Se prepararon seis ST con concentraciones de: 25, 50, 100, 150, 200 y 250 ppm.

Muestras: 1) Solvente de mezcla (Sm), 2) Se prepararon soluciones que contenían respectivamente 0,5 y 2,5 mg/mL de ácido ascórbico en solvente de mezcla como se indica en el ejemplo 1; 3) M15 (composición de la invención elaborada según el ejemplo 20); 4) M16 (composición de la invención elaborada según el ejemplo 21) y 5) LAPS (preparada según los detalles del ejemplo 1).

Espectrofotometría: Se realizaron lecturas de absorbancia (Abs) por triplicado con un espectrofotómetro a 517 nm usando microplacas adecuadas para UV-Vis.

- a) Colocar en los pocillos: Blanco de muestras: (12,5 μ L de la muestra o ST 25 ppm); Muestras (12,5 μ L de la muestra o ST 25 a 250 ppm); Valor inicial de DPPH (12,5 μ L de metanol absoluto)
- b) Llevar a cero el equipo con metanol absoluto.
- c) Adicionar 250 μ L de metanol absoluto a los pocillos de blanco de muestras.
- d) Adicionar 250 μ L de ST de DPPH* a pocillos de muestras y de valor inicial de DPPH.
- e) Registrar la absorbancia a 517 nm (Abs inicial DPPH)
- f) Reposar durante 30 minutos (en oscuridad y a temperatura ambiente).
- g) Registrar la absorbancia a 517 nm (Abs final).
- h) Registrar las lecturas de absorbancias (Abs blanco de muestras)
- i) Calcular los porcentajes de captación para las muestras y Trolox

Construcción de las curvas con estándar de referencia (Trolox) y con la muestra analizada: Se construyen dos curvas, graficando en el eje de las ordenadas (y), porcentaje de captación, y en el eje de las abscisas (x), logaritmo natural (Ln) de la concentración de Trolox o muestra analizada (ppm de TEAC o muestra, respectivamente). Sustituir en cada gráfica el eje (y) con el valor 50 y calcular el IC50 mediante la ecuación obtenida por regresión lineal de la gráfica. Con los respectivos valores de IC50 calcular el %AAR.

Resultados

En la figura 14 se puede observar que el solvente de mezcla no presentó actividad antioxidante. A pesar de que no contiene ácido ascórbico, LAPS mostró actividad antioxidante debida a su contenido de compuestos fenólicos. Sorprendentemente, las composiciones M15 y M16 tuvieron mejor actividad antioxidante que sus soluciones equivalentes de concentración de ácido ascórbico (AA 0,5 y 2,5 mg/mL).

Conclusión

Los componentes de nuestras composiciones mejoran las propiedades antioxidantes del ácido ascórbico.

Ejemplo 28

Capacidad quelante de la composición

Las siguientes soluciones se prepararon en solvente de mezcla (Sm) a pH 7,0. Todas las soluciones se complementaron con ZnCl₂ (1 ppm), CaCl₂ (100 ppm) y MgCl₂ (25 ppm). Las concentraciones de Zn, Ca y Mg utilizadas aquí fueron cercanas a las que se encuentran típicamente en los exudados de heridas crónicas. El pH elegido para la reacción (7,0) resultaría de la combinación de las composiciones de la presente invención (pH 5,5) y el exudado de una herida crónica (pH 8,5). Las soluciones preparadas fueron: EDTA (0,25, 0,50 y 0,75 mg/ml) como se indica en el ejemplo 1; se elaboraron M0, M13, M15 y M16 según los ejemplos 18 a 21; y se desproteinizó LAPS: Sobre una muestra de LAPS 24h obtenida según el ejemplo 1, se realizó un proceso de desproteinización utilizando reactivos e indicaciones del kit comercial empleado.

Medición de calcio remanente (sin quelar) en las soluciones preparadas: Se utilizó kit comercial de medición de calcio de Wiener Lab. El método usado es colorimétrico y se basa en la reacción del calcio con la o-cresolftaleín complexona (o-CPC) a pH alcalino, dando un complejo de color magenta que se mide fotolorimétricamente a 570 nm.

Medición de Zn remanente (sin quelar) en las soluciones preparadas: Se utilizó el kit comercial de medición de zinc de Randox Lab. El método usado es colorimétrico y se

basa en la reacción del zinc con Dimetilglioxima y Salicilaldoxina a pH alcalino dando un complejo coloreado que se mide fotolorimétricamente a 560 nm.

Para la determinación de Zinc en LAPS fue necesario un paso previo de desproteinización. Para ello, en tubos cónicos se mezclan partes iguales de LAPS y reactivo desproteinizante (Ácido Tricloroacético 370 mmol/L), se homogeneizó y luego centrifugó durante 10 min a 10,000 g. Para el ensayo se usó el sobrenadante.

Resultados

La Figura 15 muestra que el EDTA pudo quelar completamente el zinc en todas las concentraciones probadas, incluso cuando se usó una combinación de zinc, calcio y magnesio. EDTA también fue capaz de quelar todo el calcio a las concentraciones de 0,50, 0,75 y 1,00 mg/mL, aún cuando se utilizó una combinación de zinc, calcio y magnesio. Sin embargo, a la concentración de EDTA de 0,25 mg/mL no se logró quelar todo el calcio. M0 no contiene EDTA, pero aún así mostró actividad quelante tanto de calcio como de zinc. M15 que contiene 0,25 mg/mL de EDTA perdió poder quelante de calcio (aunque no de zinc) con respecto a su equivalente de EDTA solo. En cambio, M13 y M16 que contienen 0,50 mg/mL y 0,75 mg/mL de EDTA respectivamente, conservaron el máximo poder quelante que sus equivalentes de EDTA solo. Todas las mezclas mostraron capacidad quelante superior con respecto a LAPS, que además no tuvo poder quelante de zinc.

Conclusión

Las composiciones tienen capacidad quelante independiente del EDTA. Sorprendentemente, los componentes de las composiciones mejoran la capacidad quelante del EDTA.

Ejemplo 29

Incremento y conservación en el tiempo de la actividad DNAsa de las composiciones

El agar DNAsa es un medio de cultivo que contiene DNA altamente polimerizado y agar como agente solidificante. El DNA es el sustrato de la enzima desoxirribonucleasa (DNAsa), la cual lo hidroliza. Este medio de cultivo permite detectar actividad DNAsa en

distintos tipos de muestras y microorganismos. La presencia de la enzima, se puede detectar mediante el agregado de ácido clorhídrico 1N. El ácido desoxirribonucleico hidrolizado presenta transparencia, mientras que el ácido desoxirribonucleico polimerizado, precipita y torna opacidad al medio de cultivo.

Preparación de las placas: Las placas de agar DNAsa se prepararon según indicaciones del fabricante (Britania). Se utilizó un volumen de 20 ml, lo cual dejó una altura de agar de 2 mm. Con sacabocados estéril se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro en el agar. Por lo tanto, el volumen a sembrar en cada pocillo fue: $\pi \times r^2 \times h = \pi \times (2,5 \text{ mm})^2 \times 2 \text{ mm} = 40 \text{ mm}^3 = 40 \mu\text{L}$.

Curva de calibración: Se utilizaron soluciones de dornasa alfa (Roche) en solvente de mezcla con las siguientes concentraciones: C1 (0,1 $\mu\text{g/mL}$); C2 (0,97 $\mu\text{g/mL}$); C3 (2,0 $\mu\text{g/mL}$); C4 (3,90 $\mu\text{g/mL}$); C5 (8,0 $\mu\text{g/mL}$); C6 (10,0 $\mu\text{g/mL}$); C7 (100,0 $\mu\text{g/mL}$) y C8 (1000 $\mu\text{g/mL}$).

Muestras analizadas: LAPS, M0, M13, M15 y M16 gelificados con hidroxietilcelulosa y conservados a T° ambiente (25°C) y en heladera (4°C). Se midió la actividad DNAsa una vez por semana durante 6 meses. Se preparó LAPS como se indica en el ejemplo 1 y las composiciones de la invención se elaboraron de acuerdo con los ejemplos 22 a 25.

Siembra en las placas de agar DNAsa: Se sembraron por duplicado los puntos de la curva de calibración y las distintas muestras gelificadas durante 6 meses.

Incubación: 24 horas a 32 °C (Temperatura normal de piel humana).

Revelado: Las placas se inundaron añadiendo suficiente HCl (1 M) para cubrir toda la superficie de la placa, dejándolas en reposo y realizando la lectura de las mismas no más de 5 minutos después de haber adicionado el HCl. Se midió la actividad DNAsa a través del registro en milímetros de los halos transparentes alrededor de la zona de siembra.

Resultados

La Figura 16 muestra la conservación de la actividad DNAsa en las composiciones de la invención hasta 6 meses, mientras que LAPS perdió esta actividad enzimática en menos de 2 meses.

Como muestra la Figura 17, las composiciones de la invención tienen una mayor actividad enzimática que sus soluciones equivalentes de DNAsa sola. Por ejemplo, M0 y M13 con concentraciones de DNAsa de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ mostraron halos de 13-15 mm mientras que concentraciones de DNAsa de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ sola (C2), mostraron halos de 8-10 mm. Además, M15 y M16 con concentraciones de DNAsa de 3,90 $\mu\text{g/mL}$ mostraron halos de 17-20 mm, mientras que concentraciones de DNAsa de 3,90 $\mu\text{g/mL}$ sola (C4), mostraron halos de 13-15 mm. Esto demuestra una actividad DNAsa amplificada para rh-Dornasa alfa en las composiciones de la invención.

Conclusión

Los componentes de las composiciones mejoran la actividad DNAsa de rh-Dornase alfa y permiten extender la actividad enzimática en el tiempo.

Ejemplo 30

Capacidad angiogénica de la composición

La angiogénesis es un proceso biológico complejo que implica la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. El proceso implica la cooperación de varios tipos de células diferentes y, en particular, implica la proliferación, supervivencia e invasión tisular por células endoteliales activadas. La mayoría de las investigaciones de angiogénesis incluyen al menos un estudio in vivo. El ensayo de membrana corioalantoidea de pollo se adapta a diversas aplicaciones. En este ensayo, se probaron las propiedades angiogénicas de diferentes concentraciones de etosuximida y ácido láctico y las mezclas.

Materiales y métodos

Se utilizaron huevos de líneas comerciales con un peso entre 30-90 g. Mediante el uso de un ovoscopio se determinó la viabilidad de la membrana corioalantoidea para seleccionar únicamente los huevos fertilizados y viables.

Procedimiento: Antes de colocar los huevos en la incubadora, se desinfectaron con povidona yodada y en los días 6 a 9 de incubación se observaron los huevos embrionados en el ovoscopio para determinar viabilidad y control de edad. Posteriormente, se identificó la cámara de aire y la cáscara de cada huevo, rompiendo y recortando cuidadosamente para facilitar la exposición de la membrana testácea interna. Se humedeció la membrana con 2 ml de NaCl (0,9%) a 37 °C. A continuación, se vertió solución salina y se retiró cuidadosamente la membrana testácea con un fórceps para acceder a la membrana corioalantoidea subyacente. Se descartaron los huevos cuya membrana corioalantoidea estaba dañada (presencia de hemorragia o cualquier otra lesión).

Luego, se colocaron lentamente 300 µl de las siguientes soluciones sobre la membrana corioalantoidea: Eto-4 (etosuximida 3,0 mg / ml); Eto-5 (etosuximida 0,5 mg / ml); M0; M13; M15; LAPS; Control negativo (PBS). Cada solución se evaluó por triplicado.

Se obtuvieron soluciones de etosuximida y LAPS como se indica en el ejemplo 1. Mientras que las composiciones de la invención se elaboraron según los ejemplos 18 a 21.

Los huevos se cubrieron con una película transparente y se tomaron fotografías a los 5 minutos, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación.

Pruebas de angiogénesis: El análisis de imágenes digitales se realizó utilizando el software Image J plus. Se evaluó la longitud de vascularización (cm) por área de membrana corioalantoidea (cm²) antes de la adición de la solución (basal) y después de 24 h y 48 h. A continuación, se calculó el porcentaje de aumento de vascularización.

Resultados

La figura 18 muestra la cinética de vascularización en presencia de LAPS y diferentes soluciones de etosuximida, M0, M13 y M15. Como se puede observar, LAPS no mostró efecto angiogénico. La etosuximida mostró propiedades angiogénicas, aunque fue

mejor a 0,5 mg/mL que a 3,0 mg/mL. Las mezclas M0, M13 y M15 mostraron un mayor efecto angiogénico en comparación con soluciones con las mismas concentraciones de etosuximida.

Conclusión

Las composiciones de la presente invención amplifican sorprendentemente el poder angiogénico de la etosuximida.

Ejemplo 31

Regulación la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) con etosuximida

Materiales y Métodos

Las líneas celulares se cultivaron y mantuvieron siguiendo los protocolos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, EE. UU.), Usando Medio Esencial Mínimo (MEM), Suero Bovino Fetal (SFB), L-glutamina.

Para evaluar la expresión de los genes VEGF, se utilizaron las siguientes líneas celulares:

Línea celular de macrófagos murinos J774 (ATCC), estimulada con 25 ng/mL de lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli* (L-8274, Sigma).

Línea celular de queratinocitos de piel humana adulta HaCaT (ATCC).

Las células se colocaron en placas durante 24 horas con etosuximida a diferentes concentraciones para evaluar su efecto sobre la expresión génica.

Se utilizaron monocapas de las líneas celulares de macrófagos J774 y queratinocitos HaCaT, hasta obtener células confluentes, que se estimularon con etosuximida a 0,5 y 3,0 mg/mL, como se indica en el ejemplo 1, en placas de 12 pocillos, a un volumen final de 300 µL/pocillo. Para la línea de macrófagos J774, todos los tratamientos fueron suplementados con LPS (25 ng/mL), usando MEM 1X con LPS (25 ng/mL) como control (Control +LPS). Los queratinocitos HaCaT se trataron con las

concentraciones de etosuximida en MEM con SFB al 10%, utilizando MEM 1X como control.

Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 24 horas. Se realizaron triplicados de cada línea celular para cada experimento.

Los niveles de ARNm de VEGF y GAPDH se midieron por triplicado para cada muestra utilizando los sistemas de RT-qPCR StepOnePlus (Applied Biosystems) y el kit Power Up SYBR Green Master Mix (ROCHE). Las secuencias del cebador para VEGF y GAPDH fueron: 5'-ACCTCCACCATGCCAAGT-3' (sentido) y 5'-TTGGTCTGCATTACATCTG-3' (antisentido) para VEGF y, 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3' (sentido) y 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT-3' (antisentido) para GAPDH. Los valores medios de VEGF se normalizaron con los valores medios de GAPDH para cada muestra. Para cada experimento las medias de grupo se determinaron y normalizaron con el grupo control tratado con MEM.

Resultados y Discusiones

Como resultado, se indujo el nivel de expresión de VEGF tanto en las células de macrófagos como en las de queratinocitos. El nivel de inducción de la expresión de VEGF se produce con etosuximida 0,5 mg/mL en macrófagos y con 3,0 mg / ml en queratinocitos (Figura 19).

Durante la fase de proliferación del proceso de cicatrización normal, ocurre la angiogénesis que permite la restauración de nuevos vasos sanguíneos en el área lesionada bajo la regulación de factores de crecimiento angiogénicos, como el VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) (43, 44). En las heridas crónicas, el VEGF tiende a mostrar niveles disminuidos o ausentes (45), y esta es una causa probable de vascularización insuficiente de la herida debido a la baja actividad (46). VEGF estimula la captación de células apoptóticas por macrófagos a través de VEGFR-1 (46, 47). Si esto ocurre durante la cicatrización, el aumento de la expresión de VEGF en los macrófagos ayuda a la resolución de la inflamación (46) y favorece el paso hacia la fase proliferativa de cicatrización.

Los queratinocitos también son una de las principales fuentes de VEGF durante la cicatrización de heridas (46, 48). El VEGF producido por los queratinocitos epidérmicos funciona regulando las células endoteliales en los vasos sanguíneos dentro de la dermis subyacente (46). Por tanto, el aumento de la expresión de VEGF en los queratinocitos estimula la angiogénesis.

Conclusión

Se observó un aumento en la expresión de VEGF en macrófagos y queratinocitos causado por etosuximida.

Ejemplo 32

Efecto cicatrizante de heridas de las composiciones (49)

Animales: Se utilizaron 42 ratas macho de la cepa Wistar/Cmedc, de 8-10 semanas de edad divididos en 7 grupos experimentales de 6 animales cada uno (Grupos A, B, C, D, E, F y G).

Modelo de herida excisional (50): La cirugía inició con la anestesia de los animales y preparación del campo quirúrgico. Para ello, la piel dorsal rasurada se lavó y desinfectó con soluciones de Iodo povidona y etanol 70°. Posteriormente, por medio de un punch biopsial estéril de 5 mm de diámetro se realizaron dos heridas en el tórax dorsal (herida 1, correspondiente al lado izquierdo y herida 2, al lado derecho del animal) incidiendo piel y panículo carnoso. Luego se colocó cianoacrilato adhesivo (Tegaderm TM 3M) en cada anillo de silicona y se adhirieron a la piel, respetando el interior del anillo con la incisión. Cuando el adhesivo fijó la piel y los anillos de silicona se realizaron cinco puntos simples a la piel perforando el anillo de silicona en su porción externa para asegurar la posición utilizando suturas de polipropileno. Finalizada la cirugía y recuperado el animal se les colocó un collar isabelino con el fin de evitar que los animales puedan sacarse los anillos de silicona.

Evaluación de la colonización bacteriana en el lecho de las heridas: Con el fin de estimar la carga bacteriana total no intencional se realizó un hisopado en la herida 1 de un animal de cada grupo experimental. La muestra obtenida se colocó en un tubo conteniendo 10 ml de PBS 1X estéril y se determinó la carga bacteriana total mediante

diluciones seriadas y siembra en agar para recuento en placa (APC). Posteriormente a la incubación de 24 h a 37 °C, se registraron las UFC/herida.

Infección con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para imitar las condiciones de una herida crónica: Se inocularon tópicamente ambas heridas en los animales de todos los grupos experimentales. El inóculo fue de 10 µl de una suspensión bacteriana de la mencionada cepa de *S. aureus* ajustada a la escala 0,5 de McFarland en PBS 1X estéril (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Consecuentemente, la concentración bacteriana final obtenida en cada herida fue de $1,5 \times 10^6$ UFC totales.

Tratamiento: Se trataron tópicamente ambas heridas de todos los animales de cada grupo con las siguientes composiciones gelificadas con Hidroxietilcelulosa: Grupo A (M0), Grupo B (M13), Grupo C (M15), Grupo D (M16), Grupo E (LAPS), Grupo F (Solvente de mezcla) y Grupo G (Control sin tratamiento). La primera administración se realizó a las 48 h post infección y luego se realizó una aplicación diaria hasta la finalización del ensayo. Antes de la aplicación de la sustancia de ensayo correspondiente se limpiaron las heridas de los animales utilizando un hisopo y solución fisiológica estéril. Hasta el día 7 se administraron 20 µl de cada composición sustancia de ensayo en cada herida, reduciendo la dosis a 10 µl a partir del día 8.

Las composiciones de la invención (M0, M13, M15 y M16) se elaboraron según los ejemplos 22 a 25.

Observación y seguimiento de los animales: Se evaluaron diariamente los signos clínicos, comportamiento y cambios en el peso de los animales. Además, cada 3 a 5 días se fotografiaron las heridas utilizando la cámara digital Olympus Stylus SZ-15 y se cuantificaron sus áreas mediante el programa Image ProPlus 6.0.

Necropsias: Los animales 1, 3 y 5 de todos los grupos experimentales fueron sacrificados cuando la herida del grupo control sin tratar, alcanzó el 40 % de cicatrización (alrededor del día 6 postcirugía). Los animales 2, 4 y 6 de todos los grupos experimentales fueron sacrificados cuando la herida del grupo control sin tratar, alcanzó aproximadamente el 80 % de cicatrización (alrededor del día 10 postcirugía). Al momento del punto final se procedió a la eutanasia de los animales del grupo control.

[illegible]

Tabla 2: Evaluación de la colagenización utilizando el puntaje de Abramov como clasificación histopatológica. Sm = solvente de mezcla; LAPS = sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*; M = Mezclas; DE= Desvío estándar.

La presencia de colágeno se evaluó con tinción tricrómica de Masson en animales de todos los grupos experimentales (control no tratado, Sm, LAPS, M0, M13, M15 y M16). La clasificación histopatológica utilizada para estimar la colagenización es el sistema de puntuación de Abramov, adaptado de Nisbet *et al.*, (2010) donde la cantidad de colágeno se clasifica como 0 = ausencia de colágeno, 1 = escaso, 2 = moderado y 3 = abundante. Ambas heridas de cada animal se estudiaron con 5 campos de gran aumento (400X) contemplando desde la epidermis hasta la dermis (Nisbet *et al.*, 2010. Effect of three types of honey on cutaneous wound healing. Wounds 22:11;275-283).

Ajwee y col. (2012) (Ajwee DM *et al.* 2012. Ethosuximide and phenobarbital promote wound healing via enhancing collagenization. Chemical Biology & Drug Design, 79(1), 137-142) aplicaron etosuximida (Eto) a heridas por escisión en el modelo de ratas albinas. Demostraron que los ungüentos que contienen etosuximida al 10% p/p (80 mg/ml) en parafina blanda promueven significativamente la cicatrización de heridas al mejorar la colagenización. Los inventores de esta patente también aplicaron etosuximida combinada con otros componentes (M0, M13, M15 y M16) en ratas Wistar en un modelo de herida por escisión infectada con *S. aureus*. La composición de la invención permitió obtener resultados de colagenización similares o mejores, pero con cantidades menores de etosuximida (0,5 a 30 mg/mL) en heridas infectadas. Los resultados de ambos ensayos se pueden ver en la siguiente tabla. Los datos de la columna Ajwee y col. (2012) se extrajeron de su publicación y la concentración de etosuximida del 10% p/p se transformó en 80 mg/ml utilizando el valor de densidad de parafina blanda.

	Ajwee <i>et al.</i> (2012)	M15	M0	M13	M16
Animal	<i>Rattus Norvegicus</i> UJ-1 (Rata albina)	<i>Rattus Norvegicus</i> domestica (Rata Wistar)	<i>Rattus Norvegicus</i> domestica (Rata Wistar)	<i>Rattus Norvegicus</i> domestica (Rata Wistar)	<i>Rattus Norvegicus</i> domestica (Rata Wistar)

Tipo de herida	Escisional	Escisional	Escisional	Escisional	Escisional
Espesor de la herida	Completa	Completa	Completa	Completa	Completa
Infección	No	Si	Si	Si	Si
Matriz farmacéutica	Ungüento de parafina	Gel de HEC	Gel de HEC	Gel de HEC	Gel de HEC
[Etosuximida]	80 mg/mL	0,5 mg/mL	3,0 mg/mL	3,0 mg/mL	30 mg/mL
Colagenización	Si	Si	Si	Si	Si
Tinción para la detección de colágeno en cortes de tejido	Tricrómico de Masson	Tricrómico de Masson	Tricrómico de Masson	Tricrómico de Masson	Tricrómico de Masson
Día de medición (después de la herida)	16	14	14	14	14
Puntuación de Abramov para la colagenización	2,42 (0,58)	2,17 (0,41)	2,50 (0,55)	2,67 (0,52)	3,00 (0,00)

Tabla 3

La expresión de alfa-actina del músculo liso (α -SMA) se estudió como un marcador específico de las capas musculares de los vasos sanguíneos y miofibroblastos asociados con el proceso de cicatrización. Los miofibroblastos son fibroblastos contráctiles especializados que son fundamentales para el cierre de heridas y la contractura de los tejidos. La expresión de α -SMA se ve en fotografías (Figura 21) como una coloración marrón. Una mayor cantidad e intensidad de color marrón significa una mayor expresión de α -SMA. A los 7 días después de la cirugía (el primer punto final del ensayo), el control no tratado (Figura 21G) y el grupo tratado con gel de solvente de mezcla (Sm) (Figura 21F) solo mostraron expresión de α -SMA en los vasos sanguíneos. LAPS aumentó ligeramente la expresión de α -SMA en miofibroblastos (Figura 21E). Por otro lado, las heridas tratadas con las composiciones mostraron una expresión de α -SMA directamente proporcional a las concentraciones de su componente. Por ejemplo, M0 y M15 mostraron una expresión

moderada (Figura 21C), M13 mostró una expresión alta (Figura 21B) y M16 mostró una expresión muy alta (Figura 21D).

Conclusión: Las composiciones de la invención aceleran el proceso de cicatrización al tiempo que estimulan la producción de colágeno y alfa-actina del músculo liso, logrando un efecto bactericida simultáneo.

Bibliografía

Bibliography

1. Kyaw BM et al. (2018). Need for Improved Definition of. *Acta dermatovenereologica*, 98(1-2), 157-158.
2. Martinengo L et al. (2019). Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Annals of epidemiology*, 29, 8-15.
3. Olsson M et al. (2019). The humanistic and economic burden of chronic wounds: a systematic review. *Wound Repair and Regeneration*, 27(1), 114-125.
4. Zhao R et al. (2016). Inflammation in chronic wounds. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 2085.
5. Morton LM et al. (2016). Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(4), 589-605.
6. Rezvani Ghomi E et al. (2019). Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(27), 47738.
7. Snyder D et al. (2020). Skin substitutes for treating chronic wounds.
8. El-Sabbagh AH. (2017). Negative pressure wound therapy: an update. *Chinese Journal of Traumatology*, 20(2), 103-107.
9. Zarei F et al. (2018). Role of growth factors and biomaterials in wound healing. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1), 906-911.

10. Jones MW et al. S. (2017). Hyperbaric Therapy For Wound Healing.
11. Jones, RE et al. (2018). Management of chronic wounds—2018. *Jama*, 320(14), 1481-1482.
12. Warriner R, Burrell RI (2005). Infection and the chronic wound: a focus on silver. *Adv Skin Wound Care*;18(Suppl 1):2–12.
13. Miller AC et al. (2012). Silver sulfadiazine for the treatment of partial-thickness burns and venous stasis ulcers. *J Am Acad Dermatol*;66(5):e159–65.
14. Skog E et al. (1983) A randomized trial comparing cadexomer iodine and standard treatment in the out-patient management of chronic venous ulcers. *Br J Dermatol*;109(1):77–83.
15. Moberg S et al (1983). A randomized trial of cadexomer iodine in decubitus ulcers. *J Am Geriatr Soc*;31(8):462–5.
16. Lipsky BA, Hoey C. (2009). Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infect Dis*;49(10):1541–9.
17. Draelos ZD et al. (2011). A comparison of postprocedural wound care treatments: do antibiotic-based ointments improve outcomes? *J Am Acad Dermatol*. ;64(3 Suppl):S23–9.
18. Taylor SC et al. (2011). Postprocedural wound-healing efficacy following removal of dermatosis papulosa nigra lesions in an African American population: a comparison of a skin protectant ointment and a topical antibiotic. *J Am Acad Dermatol*;64(3 Suppl):S30–5.
19. Liu WL et al. (2017). Combined debridement in chronic wounds: A literature review. *Chinese Nursing Research*, 4(1), 5-8.
20. Han G et al. (2017). Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in therapy*, 34(3), 599-610.
21. Barnett SE, Varley SJ. The effects of calcium alginate on wound healing. *Ann R Coll Surg Engl*. 1987;69(4):153–5.

22. Cullen B et al. (2002). Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen*;10(1):16–25.
23. Valdez J et al. (2013). Probiotics and their potential use in wound treatment. *Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics*, 298-335.
24. Ramos AN et al. (2015). Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. *Pharmaceutical biology*, 53(3), 350-358.
25. Lindon S et al. (2016). Biotechnological design to optimize the production of bioactive *Lactobacillus plantarum* by-products: novel chronic wound treatment.
26. Nagaoka T et al. (2000). Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *The American journal of pathology*, 157(1), 237-247.
27. Xu Z et al. (2020). Advances and impact of antioxidant hydrogel in chronic wound healing. *Advanced Healthcare Materials*, 9(5), 1901502.
28. Fitzmaurice SD et al.. (2011). Antioxidant therapies for wound healing: a clinical guide to currently commercially available products. *Skin pharmacology and physiology*, 24(3), 113-126.
29. Cano Sanchez M et al. (2018). Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review. *Antioxidants*, 7(8), 98.
30. Bikker A et al. (2016). Ascorbic acid deficiency impairs wound healing in surgical patients: Four case reports, *International Journal of Surgery Open* (2016), doi: 10.1016/j.ijso.2016.02.009
31. Houwing R et al. (2008). An unexpected detrimental effect on the incidence of heel pressure ulcers after local 5% DMSO cream application: A randomized, double-blind study in patients at risk for pressure ulcers. *Wounds*; 20: 84-8.

32. Li Y & Schellhorn HE. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of nutrition*, 137(10), 2171-2184.
33. Ajwee DM et al. (2012). Ethosuximide and phenobarbital promote wound healing via enhancing collagenization. *Chemical Biology & Drug Design*, 79(1), 137-142.
34. Goldberg, S. R., & Diegelmann, R. F. (2020). What Makes Wounds Chronic. *Surgical Clinics*, 100(4), 681-693.
35. Snyder RJ et al. (2016). Components and quality measures of DIME (Devitalized Tissue, Infection/Inflammation, Moisture Balance, and Edge Preparation) in wound care. *Adv Skin Wound Care*;29(5):205–15
36. Darwin E et al. (2018). Healing chronic wounds: current challenges and potential solutions. *Current dermatology reports*, 7(4), 296-302.
37. Malone M et al. (2017). The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *Journal of Wound Care*, 26(1), 20-25.
38. Ammons MC. (2010). Anti-biofilm strategies and the need for innovations in wound care. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 5(1), 10-17.
39. Brown A. (2017). Managing exudate and maceration in venous leg ulceration within the acute health setting. *British Journal of Nursing*, 26(Sup20), S18-S24.
40. Tardáguila-García A et al. (2019). Metalloproteinases in chronic and acute wounds: A systematic review and meta-analysis. *Wound Repair and Regeneration*, 27(4), 415-420.
41. Paschou SA et al. (2018). Pain management of chronic wounds: Diabetic ulcers and beyond. *Maturitas*, 117, 17-21.
42. Sharma OP & Bhat TK (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4), 1202-1205).
43. Bennett NT, Schultz GS. (1993). Growth-Factors and Wound-Healing. Role in Normal and Chronic Wound-Healing. *Am J Surg*;166(June):74–81.

44. Raffetto JD. (2016). Pathophysiology of wound healing and alterations in venous leg ulcers-review. *Phlebology*;31:56– 62.
45. Han G, Ceilley R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther*;34(3):599–610.
46. Johnson KE, Wilgus TA. (2014). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care*;3(10):647–61.
47. Kearns MT et al. (2012). Vascular endothelial growth factor enhances macrophage clearance of apoptotic cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*;302(7):711–8.
48. Seeger MA, Paller AS. (2015). The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Adv Wound Care*;4(4):213–24.
49. Dunn L et al. (2013). Murine model of wound healing. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (75), e50265.
50. Galiano RD et al. (2004). Quantitative and reproducible murine model of excisional wound healing. *Wound repair and regeneration*, 12(4), 485-492.