

**COMPOSICIONES TÓPICAS QUE COMPRENDEN UN COMPONENTE
DE ESTETROL Y USO DE DICHAS COMPOSICIONES PARA LA
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS**

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente al tratamiento de heridas de la piel mediante una efectiva cantidad de un componente de estetrol. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un componente de estetrol adecuado para tratar heridas de la piel. Las composiciones farmacéuticas y los métodos relacionados materia de la invención tienen efectos favorables en heridas, en el proceso de cicatrización de heridas, y finalmente en la recuperación del paciente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

A lo largo de la vida, cada persona está expuesta muchas veces a estímulos o eventos adversos que dan lugar a heridas cutáneas, como lesiones, cirugía, quemaduras y heridas inducidas por patologías de la piel y opcionalmente de los tejidos subyacentes. A menudo, estas heridas cicatrizan sin una carga sustancial para el sujeto después del cuidado rutinario adecuado, que incluye prácticas como la desinfección y/o cubriendo temporalmente el lugar de la herida. Sin embargo, pueden surgir complicaciones si la persona tiene cicatrización deficiente de la herida, si hay una excesiva inflamación o infección en el lugar de la herida, o en situaciones en donde el lugar de la herida cubre un área sustancial de la persona.

Si bien a menudo se percibe como una funcionalidad "básica" del tejido cutáneo, la cicatrización de heridas es la culminación de diferentes mecanismos moleculares complejos. En el tejido cutáneo normal (es decir, tejido cutáneo sin herida), la epidermis (capa más externa de la piel) y la dermis (corium)

(Kolarsick y otros, JDNA, 2011) forman una capa protectora contra estímulos externos. Al producirse un daño en dicha capa protectora, se inicia un proceso de reparación que tiene por objeto reparar el daño. Este proceso de reparación ha sido descrito en la técnica en detalle y comprende los pasos posteriores de hemostasia (coagulación de la sangre), inflamación, proliferación (crecimiento de nuevo tejido), y maduración (remodelación tisular).

Cuando se examina con más detalle, el antedicho proceso de reparación se caracteriza por un número de mecanismos moleculares que también han sido materia de estudio en la técnica (p.ej., en Rodrigues y otros, *Physiol Rev.*, 2019). Brevemente, durante la fase de coagulación (considerada comúnmente una parte de la fase de inflamación), se genera un coágulo de fibrina para evitar más pérdida de sangre. La fase de inflamación se caracteriza por una vasoconstricción inicial y la posterior vasodilatación, y reclutamiento de células como neutrófilos, monocitos y macrófagos. La fase de proliferación se caracteriza por angiogénesis, diferenciación de fibroblastos y formación de tejido de granulación. La formación del tejido de granulación permite la re-epitelialización por células epiteliales (queratinocitos) que migran para cubrir el lugar de la herida. Adicionalmente, la última parte de la fase de proliferación abarca la contracción mediada por fibroblastos de la herida. La fase final de cicatrización de la herida, es decir, la fase de maduración, se caracteriza por el reordenamiento y reticulación de las fibras de colágeno que se forman en el lugar de la herida que aumentan la fuerza tensil de la herida e inducen la formación de tejido cicatricial. En personas que tienen cicatrización deficiente de herida, uno o más de las fases o sub-procesos anteriores están alterados o esencialmente ausentes (Avishai y otros, *EPMA J*, 2017).

No puede exagerarse la importancia del cuidado adecuado de la herida, en particular porque se espera que la prevalencia de heridas crónicas aumente en las próximas décadas como consecuencia de la creciente prevalencia de enfermedades crónicas como diabetes, cáncer y enfermedades autoinmunes. Los estudios epidemiológicos ya han alertado de esta creciente carga sanitaria. Se ha reportado un marcado aumento en un periodo de 10 años, con una prevalencia de 605,036,000 en el 2015 en comparación con 492,883,000 en el 2005 en base a información global, regional y local en más de 195 países y territorios (reportado por el Global Burden of Disease (GBD) 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, Lancet, 2016). Estimaciones mundiales sugieren que al menos 7 millones de personas sufren complicaciones después de cirugía cada año, que incluye al menos 1 millón de muertes. La cicatrización retardada de heridas agudas aumenta el riesgo posquirúrgico de morbilidad y mortalidad. Un buen ejemplo son las infecciones en el lugar quirúrgico, que son la segunda causa de infecciones hospitalarias. Las mayores complicaciones en heridas agudas se relacionan con la falta de cicatrización relacionada con la edad y la deficiencia hormonal. Aquí, la población mayor de 65 años (actualmente 15-28% del total) está aumentando a nivel mundial.

Si bien actualmente existen numerosas estrategias del cuidado de heridas (tanto mecánicas como farmacéuticas), permanece una necesidad no cubierta de estrategias eficaces para el cuidado de heridas y composiciones farmacéuticas que ayuden a dicho cuidado de heridas. Tales composiciones ayudarían idealmente a la cicatrización de heridas de sujetos con cicatrización deficiente de heridas, como sujetos de edad avanzada y sujetos afectados por heridas crónicas causadas, por ejemplo, una falta de motilidad y/o patologías subyacentes.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Como se evidencia en detalle por los ejemplos que se adjuntan en este documento, los inventores han encontrado sorprendentemente que el estetrol es particularmente conveniente para utilizarse en la cicatrización de heridas, que incluye la cicatrización de heridas en sujetos que se caracterizan por cicatrización deficiente de herida. Mediante experimentos exhaustivos, se encontró que los componentes del estetrol pueden incluirse de manera segura en composiciones farmacéuticas destinadas a ayudar en la cicatrización de heridas. Dichas composiciones no tienen efecto o efecto limitado sobre el aumento del peso uterino que puede ocurrir con el uso tópico de estrógenos en sujetos femeninos mediante la exposición sistémica inadvertida. Más particularmente, los inventores han encontrado que la inclusión de cantidades particulares de un componente de estetrol en composiciones farmacéuticas destinadas a ayudar en la cicatrización de heridas ofrece un compromiso sin precedentes entre la eficacia y los efectos adversos como un aumento en el peso del útero. La ausencia del aumento en el peso del útero indica que los efectos sistémicos de las composiciones farmacéuticas que comprenden un componente de estetrol son limitados e incluso podría decirse que ausente en ciertas dosis, incluso tras la inclusión de un potenciador de la permeabilidad.

De los experimentos de cicatrización de heridas *in vitro* e *in vivo* se deduce que el estetrol ejerce al menos efectos similares como el estradiol en por ejemplo cierre de heridas, re-epitelialización, y anti-inflamación. El tratamiento con estradiol y estetrol aumenta la expresión del receptor de estrógeno (ER por sus siglas en inglés) en los fibroblastos, mientras que el estetrol también favorece la expresión de la fibronectina e inhibe la actividad de metaloproteinasas de matriz (MMP por sus siglas inglés). El estetrol también parece favorecer la migración de fibroblastos dérmicos en ensayos de

raspado y favorecer la migración de queratinocitos epidérmicos en mayor medida que el estradiol. Además, se ha demostrado que el estetrol modula la expresión de genes epidérmicos relevantes para las heridas con una magnitud de efecto ligeramente superior a la del estradiol y favorece el cierre de la herida más eficazmente que el estradiol. Estas mejoras en la cicatrización de heridas en combinación con los efectos sistémicos reducidos (p.ej. sobre el aumento del peso uterino) hacen de las composiciones de estetrol una alternativa atractiva para el estradiol y otras composiciones a base de estrógenos utilizadas para la cicatrización de heridas.

Finalmente, en algunas realizaciones, las composiciones se caracterizan adicionalmente por un perfil de liberación gradual que es una ventaja adicional en el contexto de cicatrización de heridas. Por tanto, la presente invención contribuye significativamente a estrategias nuevas e innovadoras para el cuidado de heridas.

En consecuencia, en un primer aspecto la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende de 0.02% a 1.5%(p/p) de un componente de estetrol, que comprende preferiblemente de 0.05% a 1.2%(p/p) de un componente de estetrol, de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 1%(p/p) de un componente de estetrol de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 1%(p/p) de un componente de estetrol, preferiblemente de aproximadamente 0.04% a aproximadamente 1%(p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 1% (p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.06% a aproximadamente 0.5%(p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.09% a aproximadamente 1.1%(p/p), incluso más de 0.1% a 1% (p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente de 0.3% a 0.7% (p/p) de un componente de estetrol. Preferiblemente, dicha composición es

para uso tópico, o para aplicación tópica, tal como para aplicación tópica a la piel.

Preferiblemente, dicha composición no produce un efecto sistémico significativo en el sujeto durante o después de la aplicación tópica.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.12% (p/p) de un componente de estetrol, preferiblemente de aproximadamente 0.04% a aproximadamente 0.08% (p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.07% (p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente aproximadamente 0.06% (p/p) de un componente de estetrol.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica además comprende un potenciador de la permeabilidad que permite la permeación a través del estrato córneo y/o la permeación a través de la escara de la herida.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica es una composición para su uso en la cicatrización tópica de heridas.

En otro aspecto, la invención está dirigida a una composición (farmacéutica) que comprende un componente de estetrol para su uso en la cicatrización tópica de heridas, en donde la composición opcionalmente además comprende un potenciador de la permeabilidad que permite la permeación a través del estrato córneo.

En realizaciones particulares, la composición (farmacéutica) comprende de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 5% (p/p) de un componente de estetrol, preferiblemente de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 1% (p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.03% a aproximadamente

0.75% (p/p) de un componente de estetrol, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.04% a aproximadamente 0.5%(p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente aproximadamente 0.06% (p/p) de un componente de estetrol.

En otro aspecto, la invención está dirigida a una formulación de hidrogel que comprende de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 1.5%(p/p) de un componente de estetrol, más particularmente de aproximadamente 0.05% a 1.2%(p/p), incluso más particularmente de aproximadamente 0.09% a aproximadamente 1.1%(p/p), o de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1% (p/p).

En realizaciones particulares, el hidrogel comprende de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 1.3%(p/p), más particularmente de aproximadamente 0.08% a aproximadamente 1.2%(p/p), incluso más particularmente de aproximadamente 0.09% a aproximadamente 1.1% (p/p), o de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1% (p/p) de un componente de estetrol. En realizaciones alternativas, el hidrogel comprende de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.75%(p/p) de un componente de estetrol, preferiblemente de aproximadamente 0.04% a aproximadamente 0.5%(p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.25%(p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente aproximadamente 0.06%(p/p) de un componente de estetrol.

Como puede deducirse de la sección de ejemplos, se demostró que un componente de estetrol al 0.06%(p/p) no tiene efecto sobre el aumento del peso del útero en los ratones probados, lo que contrasta fuertemente con el efecto sobre el aumento de peso del útero al aplicar Estrogel® que comprende con 0.06% de estradiol disponible comercialmente.

Además, también las concentraciones más altas de 0.22 y 0.5% (p/p) de estetrol seguían teniendo un efecto significativamente

menor sobre el aumento del peso del útero en ratones en comparación con el Estrogel®. Esto demuestra que la aplicación tópica de una composición que comprende estetrol es menos propensa a producir un efecto sistémico en el sujeto, lo que es particularmente importante en sujetos de sexo femenino. En realizaciones particulares, el hidrogel además comprende un potenciador de la permeabilidad que permite la permeación a través del estrato córneo.

En realizaciones particulares, el hidrogel es para su uso en la cicatrización tópica de heridas.

Opcionalmente la composición (farmacéutica) de cualquiera de los aspectos y realizaciones que se describen en este documento es en la forma de una formulación seleccionada del grupo que consiste de emulsiones, suspensiones, ungüentos, pastas, lociones, geles (incluyendo los hidrogeles), espumas, mousses y cremas.

En realizaciones en donde la composición (farmacéutica) es un hidrogel, dicho hidrogel se caracteriza por un perfil de liberación favorable, p.ej., más favorable cuando se le compara con otras formulaciones como, pero no limitándose a cremas.

En una realización preferida, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una cantidad acumulativa media del componente de estetrol liberada de al menos aproximadamente 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, preferiblemente al menos aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, más preferiblemente al menos 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, más preferiblemente al menos aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, más preferiblemente al menos aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dentro de la raíz cuadrada de 1 hora a través de una membrana

isopore en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua. Dependiendo de la superficie de la herida, la concentración del componente de estetrol puede necesitar ser reducida para que no provoque una administración acumulada de estetrol en cantidades muy altas. Esto puede ser calculado fácilmente por un médico o farmacéutico.

En realizaciones preferidas, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una cantidad acumulativa media del componente de estetrol liberada de al menos aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 250 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 450 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dentro de 8 horas a través de una membrana isopore en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua. Más preferiblemente, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una cantidad acumulativa media del componente de estetrol liberada de al menos aproximadamente 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Preferiblemente, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por un porcentaje medio de dosis aplicada del componente de estetrol en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua de al menos aproximadamente 15%, preferiblemente al menos aproximadamente 20% después de 1 hora y/o un porcentaje medio de dosis aplicada del componente de estetrol en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua de al menos aproximadamente 40%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos 80% después de 8 horas y más preferiblemente al menos 90% después de 8 horas.

En cualquiera de los aspectos anteriores, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el

hidrogel puede comprender un potenciador de la permeabilidad en una cantidad de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 60% (p/p), o preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 5% (p/p). Preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende una sustancia o molécula que permite la permeación a través del estrato córneo (es decir, una molécula potenciadora de la permeabilidad), y un disolvente. Preferiblemente, la molécula potenciadora de la permeabilidad se selecciona del grupo que consiste de: etanol, éter, tal como éter monoetílico de dietilenglicol (Transcutol®), alcohol bencílico, ácidos grasos y sus esteres o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende un disolvente que consta de uno o más polietilenglicoles (PEG por sus siglas en inglés), propilenglicol (PG por sus siglas en inglés), o combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el PEG es un PG que tiene un peso molecular entre aproximadamente 200 g/mol y aproximadamente 600 g/mol tal como un PEG seleccionado del grupo que consiste de: PEG200, PEG300, PEG400, PEG500, PEG 600, o cualquier combinación de los mismos. Más preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende un disolvente que incluye un PEG con un peso molecular de aproximadamente 400g/mol como el PEG400. En algunos aspectos, el potenciador de la permeabilidad comprende hasta 50% de PEG400 (p/p) y/o de aproximadamente 15% a 45% de PEG400 (p/p), y/o de aproximadamente 20% a 40% de PEG400 (p/p), y/o de aproximadamente 30% a 35% de PEG400 (p/p). Más preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende de aproximadamente 14% a aproximadamente 21% de PEG400 (p/p) y/o de aproximadamente 10% a aproximadamente 25% de PEG (p/p). En realizaciones preferidas alternativas, el potenciador de la permeabilidad comprende de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10% del potenciador de la permeabilidad como por ejemplo PEG400. En otras realizaciones preferidas alternativas, el potenciador de la permeabilidad comprende de aproximadamente

0.5% a aproximadamente 5% del potenciador de la permeabilidad como por ejemplo PEG400.

En ciertas realizaciones, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel comprende alcohol bencílico, preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 3%.

En cualquiera de los aspectos anteriores, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender un espesante. En realizaciones particulares, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel comprende un espesante en una cantidad de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 20% (p/p), o preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 3% (p/p), o más preferiblemente en una cantidad de 0.5% a 3% (p/p). Preferiblemente, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel comprende un espesante seleccionado del grupo que consiste de una hidroxietilcelulosa (HEC por sus siglas en inglés), una carboximetilcelulosa (CMC por sus siglas en inglés), un polímero acrílico reticulado de alto peso molecular, un copolímero tribloque no iónico, o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el polímero acrílico reticulado de alto peso molecular es Carbopol®.

Preferiblemente, HEC es HEC250 HHX. Preferiblemente, el copolímero tribloque no iónico tiene una masa molecular aproximada entre aproximadamente 1800 a aproximadamente 4000 y un contenido de polioxietileno de aproximadamente 70 a aproximadamente 80%. Preferiblemente, el copolímero tribloque no iónico se selecciona de un poloxámero, como poloxámero 188, poloxámero 407 o una combinación de los mismos.

En cualquiera de los aspectos anteriores, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender un conservante. En realizaciones particulares, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender un conservante en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (p/p), preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 3% (p/p). Preferiblemente, el conservante se selecciona del grupo que consiste de: lisozima, nisina, conservantes de amonio cuaternario, parabenos, fenoxietanol, alcohol bencílico, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, conservantes naturales y cualquier combinación de los mismos.

En cualquiera de los aspectos anteriores, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender un emoliente. En realizaciones particulares, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender un emoliente en una cantidad de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 30% (p/p), preferiblemente de aproximadamente 8% a aproximadamente 12% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10% (p/p). Preferiblemente, el emoliente se selecciona del grupo de consiste de: glicerol, alcohol acetílico, alcohol estearílico, ácido esteárico, palmitato de isopropilo, escualeno, lanolina, glicerina, vaselina, petróleo y cualquier combinación de los mismos.

Por lo tanto, en cualquiera de los aspectos y realizaciones que se describen en este documento, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender además del componente de estetrol un potenciador de la permeabilidad, un espesante, y como ingrediente opcional un conservante y/o un emoliente, cada uno de los cuales se selecciona preferiblemente de los grupos descritos en este

documento. En cualquiera de los aspectos y realizaciones que se describen en este documento, la composición (farmacéutica) puede complementarse al 100% (p/p) mediante una solución acuosa como agua.

En realizaciones particulares, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender además del componente de estetrol (p/p):

- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 60% p/p) de un potenciador de la permeabilidad, preferiblemente en donde dicho potenciador de la permeabilidad comprende una molécula potenciadora de la permeabilidad y un disolvente o sistema disolvente;
- de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 20%(p/p) de un espesante;
- opcionalmente un conservante y/o un emoliente;
- agua hasta el 100%(p/p).

En otras realizaciones, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender de 0.05% a 0.6%(p/p) de estetrol y además:

- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5% (p/p) de un potenciador de la permeabilidad, preferiblemente en donde dicho potenciador de la permeabilidad comprende una molécula potenciadora de la permeabilidad y un disolvente o sistema disolvente;
- de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 3%(p/p) de un espesante;
- opcionalmente un conservante y/o un emoliente;
- agua hasta el 100%(p/p).

En otras realizaciones particulares, la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el

hidrogel puede comprender además del componente de estetrol (p/p) :

- de aproximadamente 16% a aproximadamente 20%(p/p) de PEG400;
- de aproximadamente 18% a aproximadamente 22%(p/p) de PG;
- de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%(p/p) de glicerol;
- de aproximadamente 1% a aproximadamente 2%(p/p) de HEC; y
- de aproximadamente 1.5% a aproximadamente 2.5%(p/p) de alcohol bencílico.

En realizaciones alternativas la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender además del componente de estetrol:

- de aproximadamente 18% a aproximadamente 22%(p/p) de PEG400;
- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%(p/p) de Carbopol®; y
- de aproximadamente 4% a aproximadamente 6%(p/p) de Transcutol®.

En otras realizaciones alternativas la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender además del componente de estetrol:

- de aproximadamente 25% a aproximadamente 55%(p/p) de PEG400, preferiblemente de aproximadamente 35% a aproximadamente 45%(p/p) de PEG400;
- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%(p/p) de Carbopol®, preferiblemente de aproximadamente 0.25% a aproximadamente 0.75% p/p) de Carbopol®; y

- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5%(p/p) de Transcutol®, preferiblemente de aproximadamente 0.75% a aproximadamente 3% de Transcutol®.

En otras realizaciones alternativas la composición (farmacéutica), la composición (farmacéutica) para su uso o el hidrogel puede comprender además del componente de estetrol:

- de aproximadamente 38% a aproximadamente 45%(p/p) de PEG400;
- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%(p/p) de Carbopol®; y
- de aproximadamente 0.8% a aproximadamente 3%(p/p) de Transcutol®.

Aspectos de la invención comprenden cada una de las composiciones (farmacéuticas), hidrogeles y alternativas que se describen en este documento como un medicamento, es decir, en un contexto terapéutico y/o profiláctico. En realizaciones particulares, las composiciones (farmacéuticas) y los hidrogeles de los antedichos aspectos son para su uso en la cicatrización de heridas. En otras realizaciones, el uso en la cicatrización de heridas corresponde a su uso como formulaciones tópicas en el tratamiento de heridas. De manera similar, aspectos de la invención se relacionan con el uso de una composición farmacéutica o hidrogel que se describe en este documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento tópico de heridas. En relación con lo anterior, los aspectos de la invención comprenden igualmente métodos de tratamiento tópico de heridas que comprenden la administración de cualquiera de las composiciones farmacéuticas o hidrogeles que se describen en este documento a una herida o lugar de la herida de un sujeto.

En realizaciones particulares, las composiciones (farmacéuticas) y los hidrogeles de los antedichos aspectos son para su uso en

el tratamiento de heridas agudas. Opcionalmente, la herida aguda es una herida quirúrgica o una herida ocasionada por lesión aguda. La herida también puede ser una herida de espesor parcial (p. ej., en una zona donante de injerto de piel). En realizaciones alternativas, las composiciones farmacéuticas y los hidrogeles de los antedichos aspectos son para su uso en el tratamiento de heridas crónicas. Opcionalmente, la herida crónica es una herida ocasionada y/o mantenida por una enfermedad diabética. Otros factores causales importantes de heridas crónicas son la isquemia, la radiación, cuerpos extraños y prolongada presión externa. Generalmente las heridas crónicas se dividen en herida infectada o isquémica.

En realizaciones particulares, el uso médico o tratamiento como se describe en este documento da como resultado mejores parámetros de cicatrización histológica mejorados frente a las heridas no tratadas. Preferiblemente, el uso médico o tratamiento da como resultado una mejor incidencia del cierre completo de la herida, el cierre acelerado de la herida, y/o facilitación del cierre de la herida quirúrgica. En realizaciones preferidas, el uso médico o tratamiento mejora la calidad de la cicatrización conocida también como cosmesis. En particular para las heridas quirúrgicas se observan menos cicatrices.

En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas y los hidrogeles que se describen en este documento muestran un efecto beneficioso en heridas inflamadas. Con el uso, se evita la inflamación y/o la progresión inflamatoria. También puede prevenirse la reaparición de heridas.

En realizaciones particulares, las composiciones (farmacéuticas) y los hidrogeles de los antedichos aspectos son para su uso en el tratamiento de heridas en sujetos con cicatrización deficiente de herida, incluida una cicatrización cutánea

deficiente retardada o una cicatrización cutánea retardada debido a bacterias. En realizaciones particulares, la cicatrización deficiente de heridas se caracteriza por una migración reducida del borde de la herida. En otras realizaciones, la cicatrización deficiente de la herida se caracteriza por una mayor proliferación del borde de la herida.

En realizaciones particulares, las composiciones (farmacéuticas) y los hidrogeles de los antedichos aspectos son para su uso en el tratamiento de lugares de heridas infectadas, heridas de combate, quemaduras y úlceras crónicas en las piernas. En algunas realizaciones dichas heridas infectadas pueden estar asociadas con una re-epitelialización reducida, aumento de la proliferación, una respuesta inflamatoria elevada y una deposición alterada de la matriz de la herida. Un patógeno estudiado particularmente a este respecto es la *Klebsiella pneumoniae* y las composiciones que contienen un componente de estetrol que se describen en este documento han demostrado reducir la inflamación en un modelo de heridas infectadas por *Klebsiella pneumoniae*.

En realizaciones particulares, las composiciones (farmacéuticas) y los hidrogeles de los antedichos aspectos son para su uso en mejorar la re-epitelialización de un lugar de la herida, aumento de la proliferación de células en un lugar de la herida, reducir una respuesta inflamatoria en/dentro del lugar de la herida, mejorar la deposición de la matriz como la remodelación de la matriz, y mejorar la angiogénesis en los sitios de la herida.

En realizaciones particulares, el uso médico o tratamiento como se describe en este documento resulta en una mejora de la calidad de la cicatrización conocida también como cosmesis. Esto está formando un aspecto interesante, particularmente en el contexto de la cicatrización de heridas quirúrgicas.

En realizaciones particulares, el uso médico o tratamiento como se describe en este documento resulta en una mejora del perfil inflamatorio del lugar de la herida frente a heridas no tratadas. Preferiblemente, el uso médico o tratamiento da como resultado un perfil mejorado de macrófagos y neutrófilos, indicativo de una reducción de la inflamación local de la herida frente a heridas no tratadas.

Opcionalmente, el sujeto es un sujeto de avanzada edad, tal como un sujeto de ≥ 50 años, o preferiblemente ≥ 60 años. Opcionalmente, la composición (farmacéutica) o el hidrogel como se describe en este documento se aplica al lugar de la herida en al menos dos distintas distancias como parte del tratamiento o uso médico. Opcionalmente, el tratamiento puede durar un periodo de al menos 1 semana, o incluso 1 mes o más, p.ej., 12 semanas. De manera alternativa, la composición (farmacéutica) o el hidrogel como se describe en este documento se aplica al lugar de la herida de manera continua durante un periodo prolongado de tiempo. Preferiblemente, el periodo prolongado de tiempo corresponde a al menos 1 día, al menos 1 semana o al menos 1 mes. En realizaciones particulares, la composición (farmacéutica) o el hidrogel como se describe en este documento se incluye en un apósito, vendaje, parche o esparadrapo. Podría utilizarse cada tipo de andamio o matriz. También podría ser necesario un tratamiento prolongado, p.ej., 12 semanas y las formas como se describe en este documento son particularmente adecuadas para facilitar los periodos de administración prolongados.

Otros aspectos de la invención, se dirigen a las unidades de envasado que comprenden la composición farmacéutica del hidrogel que se describe en cualquier realización en este documento. Una unidad de envasado contiene preferiblemente una o más unidades de dosificación de la composición (farmacéutica) (u

opcionalmente hidrogel) que se describe en este documento. Las unidades de envasado adecuados incluyen cualquier envase capaz de contener y conservar líquidos. Opcionalmente, la unidad de envasado es una caja, una unidad de visualización, una ampolla, una botella, un vial, un tubo, una jeringa, un cartucho, una bolsa, un sobre, una bolsita, un film, una lámina, un papel de aluminio, una lata, un cilindro o un envase presurizado.

Los antedichos y demás aspectos y realizaciones de la invención se describen en las secciones que siguen y en las reivindicaciones anexas. La materia objeto de las reivindicaciones anexas se incorpora de forma específica en esta descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Cantidad acumulativa media de estetrol monohidrato liberada por unidad de superficie ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) entre el periodo experimental de 1 y 8 h (presentada como una raíz cuadrada de tiempo) de 10 formulaciones a través de una membrana isopore en la solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua. Las barras de error representan la desviación normal de la media ($n=6$).

Figura 2. Cantidad acumulativa media de estetrol monohidrato liberada por unidad de superficie ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) entre el periodo experimental de 1 y 8 h (presentada como una raíz cuadrada de tiempo) de 7 formulaciones de gel acuoso a través de una membrana isopore en la solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua. Las barras de error representan la desviación normal de la media ($n=6$).

Figura 3. Cantidad acumulativa media de estetrol monohidrato liberada por unidad de superficie ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) entre el periodo experimental de 1 y 8 h (presentada como una raíz cuadrada de tiempo) de 3 formulaciones de crema a través de una membrana

isopore en la solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua. Las barras de error representan la desviación normal de la media (n=6).

Figura 4. Porcentaje medio (%) de la dosis aplicada de estetrol monohidrato liberada en la solución receptora entre el periodo experimental de 1 y 8 h (presentada como una raíz cuadrada de tiempo) de 4 formulaciones de gel acuoso a través de una membrana isopore en la solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua. Las barras de error representan la desviación normal de la media (n= 5 - 6).

Figura 5. Cantidad acumulativa media de estetrol monohidrato liberada por unidad de superficie ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) entre el periodo experimental de 1 y 8 h (presentada como una raíz cuadrada de tiempo) de 4 formulaciones de gel acuoso a través de una membrana isopore en la solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400:agua. Las barras de error representan la desviación normal de la media (n= 5 - 6).

Figura 6. Efecto de la aplicación tópica de placebo (PBO), EstroGel® (EG), AG24, AG25 y AG26 sobre el peso y la morfología uterinos. A ratones hembras de ocho semanas de edad se les inyectó LPS por vía subcutánea 24h y 2h antes de la herida (6 ratones por grupo). Se aplicó EstroGel®, AG24, AG25, AG26 o placebo en una capa delgada sobre la parte superior de la herida un día antes, al momento de la herida y en 1, 2, 3 y 4 días después de la herida. Se evaluaron los cambios morfológicos uterinos a los 5 días mediante la medición del peso uterino (A) y tomando fotos del útero (B). Barra de escala = 10mm. Los resultados se presentan como media $\pm$ e.e.m. (s.e.m. por sus siglas en inglés). Las diferencias frente al placebo se determinaron utilizando la prueba t pareada; *valores de $P \leq 0.05$, y ***valores de $P \leq 0.001$.

Figura 7. El tratamiento tópico en E4 favorece la re-epitelialización en el modelo de ratones con cicatrización retardada de heridas inducida por LPS.

A ratones hembras de ocho semanas de edad se les inyectó LPS por vía subcutánea 24h y 2h antes de la herida (6 ratones por grupo). Se aplicó EstroGel®, AG24, AG25, AG26 o placebo en una capa delgada sobre la parte superior de la herida un día antes, al momento de la herida y en 1, 2, 3 y 4 días después de la herida. Se usó imágenes histológicas para calcular el porcentaje de re-epitelialización de la herida al día 5. Las secciones histológicas se sometieron a inmunohistoquímica K14 para visualizar la epidermis recién formada. Se determinó el grado de re-epitelialización como la longitud de la neo-epidermis dividida por la distancia entre los márgenes de la herida multiplicados por 100. Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Las diferencias frente al placebo se determinaron utilizando la prueba t pareada; *valores de $P \leq 0.05$, y ***valores de $P \leq 0.001$, $n=6$ ratones por grupo. Media + EEM.

Figura 8. El tratamiento tópico con E4 reduce el número de neutrófilos de la herida. Inmunohistoquímica y cuantificación de neutrófilos de la herida (A), con imágenes representativas (B) para cada grupo de tratamiento. ** $p \leq 0.01$, $n=6$ ratones por grupo. Media + EEM.

Figura 9. El tratamiento tópico con E4 reduce el número de macrófagos de la herida. Inmunohistoquímica y cuantificación de neutrófilos de la herida (A), con imágenes representativas (B) para cada grupo de tratamiento. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, $n=6$ ratones por grupo. Media + EEM.

Figura 10. El tratamiento tópico con E4 promueve un fenotipo pro-resolutivo de herida, con una reducción en la expresión del

marcador M1 y un aumento en la expresión del marcador M2. Se aisló el ARN del tejido de la herida y se cuantificó la expresión de los marcadores de la herida de M1 (TNF- α e IL1- β) y de M2 (Fizz1 e Yml) mediante qPCR. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, n=6 ratones por grupo. Media + EEM.

Figura 11. En la polarización in vitro de los macrófagos peritoneales aislados de ratones experimentales indica que los tratamientos tópicos confieren efectos sistémicos sobre el fenotipo celular inmune. Se aisló los macrófagos peritoneales al completarse el estudio in vivo. Se cultivó células y se polarizaron in vitro al fenotipo M1 o M2, con la expresión de los marcadores M1 (*Tnf- α* e iNOS) y M2 (*Arg1* e *Yml*) cuantificada mediante qPCR. * $p \leq 0.05$, n=3 réplicas en células agrupadas de n=6 ratones. Media + EEM.

Figura 12. Efecto de la aplicación tópica de placebo (PBO), EstroGel® (EG), AG26 y AG28 en el peso y la morfología uterinos. A ratones hembras de ocho semanas de edad, se les inyectó LPS por vía subcutánea con 24h y 2h antes de la herida (6 ratones por grupo). Solo en el día 0 (única administración), o en los días -1, 0, 1 y 2 (administración repetida) se aplicó EstroGel®, AG26, AG28 o sus placebos en una capa delgada sobre la parte superior de la herida. Se evaluaron los cambios morfológicos en el útero a los 3 días mediante la medición del peso uterino. Los resultados se presentan como media $\pm$ error estándar de la media. Las diferencias frente al placebo se determinaron utilizando la prueba t pareada; *valores de $P \leq 0.05$, y ***valores de $P \leq 0.001$.

Figura 13. A) Efecto de la aplicación tópica de placebo (PBO), EstroGel® (EG), AG26 y AG28 en la re-epitelialización. A ratones hembras de ocho semanas de edad, se les inyectó LPS por vía subcutánea 24 h y 2h antes de la herida (6 ratones por grupo). Solo en el día 0 (única administración), o en los días -1, 0, 1

y 2 (administración repetida) se aplicó EstroGel®, AG26, AG28 o sus placebos en una capa delgada sobre la parte superior de la herida. Se utilizó imágenes histológicas para calcular el porcentaje de la re-epitelialización de la herida al día 3. Las secciones histológicas se sometieron a inmunohistoquímica K14 para visualizar la epidermis recién formada. Se determinó el grado de re-epitelialización como la longitud de la neo-epidermis dividida por la distancia entre los márgenes de la herida multiplicados por 100. Los resultados se presentan como media $\pm$ e.e.m. Las diferencias frente al placebo se determinaron utilizando la prueba t pareada; *valores de $P \leq 0.05$, y ***valores de $P \leq 0.001$, $n=6$ ratones por grupo. Media + EEM. B) y C). La administración tópica única de E4 ya reduce el número de neutrófilos en la herida en un modelo de ratones con cicatrización retardada de heridas inducida por LPS. A ratones hembras de ocho semanas de edad se les inyectó LPS por vía subcutánea 24h y 2h antes de la herida (6 ratones por grupo). Solo en el día 0 (única administración), o en los días -1, 0, 1 y 2 (administración repetida) se aplicó EstroGel® (EG, gel E2 al 0.06%), AG24 (gel E4 al 0.5%), AG25 (gel E4 al 0.22%) y AG26 (gel E4 al 0.06%) o placebo en una capa delgada sobre la parte superior de la herida. Se cuantificó el número de células neutrófilas por cm^2 en secciones histológicas al día 3. ** $p \leq 0.001$, $n=6$ ratones por grupo. B) Media + EEM y C) Puntos de Datos Individuales.

Figura 14. Tanto E2 como E4 promueven la migración de fibroblastos dérmicos humanos. (A) El porcentaje de cierre se calculó después de 36 horas, tras el tratamiento con vehículo, E2 o E4 en una variedad de concentraciones. Datos de cuatro donantes de fibroblastos independientes ($n=8$). (B) Imágenes representativas del mismo donante. ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$. Media + EEM.

Figura 15. Evaluar si la composición de la media/suero influye en los efectos de E2 y E4 sobre la migración de los fibroblastos dérmicos humanos. Se mantuvo las células en DMEM conteniendo 10% de FBS desprovisto de carbón (CS por sus siglas en inglés) y luego se cambiaron a CS-FBS al 2%, FBS al 0% o FBS al 2%, se rasparon y se trataron con vehículo, E2 o E4. Se calculó el porcentaje de cierre después de 24 horas. Datos (A) e imágenes representativas (B) de un único donante (n=3). Media + EEM.

Figura 16. Tanto E2 como E4 promueven la migración de fibroblastos dérmicos de ratón de alto paso. Se calculó el porcentaje de cierre después de 24 horas, tras al tratamiento con vehículo, E2 o E4 en una variedad de concentraciones. Se aisló los datos de las células de un único ratón (n=4). Imágenes representativas de células aisladas de un único ratón. **p≤0.001, *p≤0.05. Media + EEM.

Figura 17. Los efectos de E4 sobre la migración de fibroblastos dérmicos de ratón son mayores en células de alto paso. Se calculó el porcentaje de cierre después de 24 horas, tras el tratamiento con vehículo, E2 o E4. Datos de células de bajo paso (a, b) y células de alto paso (c, d). Los resultados se presentan con células aisladas de 3 ratones independientes (n=12). Imágenes representativas de células aisladas del mismo ratón. **p≤0.001, *p≤0.05. Media + EEM.

Figura 18. E4 aumenta la expresión tanto de ERα como de ERβ en los fibroblastos dérmicos de ratón (MDFs por sus siglas en inglés). La expresión de ERα (Esrl), ERβ (Esr2), se midió mediante qPCR utilizando ARN aislado de los MDF tratados con E2, E4 o ERα (PTT) y ERβ (DPN) agonista en 10⁻⁷M. Datos de células derivadas de n=3 ratones independiente. **p≤0.01, *p≤0.05. Media + EEM.

Figura 19. E2y E4 inhiben la actividad de MMP2 en los sobrenadantes de los fibroblastos dérmicos humanos (HDFs por sus siglas en inglés). Se trató los HDFs de n=3 donantes independientes con E2 o E4. Se realizó la zimografía incluyendo estándares para MMP2 y MMP9. Datos (A) de n=6 experimentos con n=3 donantes independientes. Se muestra un zimograma representativo (B) de un único experimento/donante. **p≤0.01, *p≤0.05. Media + EEM.

Figura 20. El tratamiento con E4 aumenta la expresión de los componentes de matriz extracelular (ECM por sus siglas en inglés)) en fibroblastos dérmicos de ratones diabéticos, pero no del tipo silvestre. La expresión de *Colla1* y *Fn1* se midió mediante qPCR utilizando ARN aislado de los MDF derivados de ratones diabéticos (db/db) o del tipo silvestre y tratados con E2, E4. Datos de células derivadas de n=3 ratones independientes. *p≤0.05. Media + EEM.

Figura 21. E2 y E4 promueven la migración de queratinocitos epidérmicos humanos normales (NHEK por sus siglas en inglés). Se calculó el porcentaje de cierre después de 24 horas, tras el tratamiento con vehículo, E2 o E4 en una variedad de concentraciones. Datos (A: 15% de suplemento para el crecimiento de queratinocitos humanos (HKGS por sus siglas en inglés), B: 30% de HKGS) de un único donante primario de NHEK(n=9-15). Imágenes representativas de área (C) de un único experimento. **p≤0.01, *p≤0.05. Media + EEM.

Figura 22. Los queratinocitos epidérmicos de ratón primario tratados con E4 muestran una fuerte tendencia al aumento de las expresiones tanto de ERα como de ERβ, y cambios en los marcadores del fenotipo de queratinocitos. Se midió la expresión de ERα (*Esr1*), ERβ (*Esr2*), del marcador *Snail* de la transición epitelial a mesenquimal y del marcador *Krt1* de la diferenciación de queratinocito mediante qPCR utilizando ARN aislado de

queratinocitos epidérmicos de ratón (MEKs por sus siglas en inglés) tratados con E2 o E4 en una variedad de concentraciones, o E2/E4 + el antagonista ICI de ER por 24 horas. Datos de células derivadas de n=3 ratones independientes. * $p \leq 0.05$. Media + EEM.

Figura 23. Los experimentos en la línea celular THP1 inmune humana revelan actividad anti-inflamatoria tanto de E2 como de E4. Las células THP1 se diferenciaron a un fenotipo de macrófago mediante el tratamiento con monoazida de propidio (PMA por sus siglas en inglés) seguido por polarización a un fenotipo M1 o M2. Se midió la expresión del marcador TNF- α de M1 y del marcador CCL17 de M2 mediante qPCR utilizando ARN aislado de células polarizadas tratadas con E2 o E4 a concentraciones diferentes. n=3. Media + EEM.

Figura 24. Los marcadores proinflamatorios se reducen tras el tratamiento con E2 o E4 en M1-estimulado, L929 diferenciado, macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM por sus siglas en inglés). Se diferenciaron los BMDM utilizando medio de crecimiento L929 al 20%, y polarizado al fenotipo M1 utilizando 20ng/ml de IFN- γ , 10pg/ml de LPS por 6 o 24 horas. El co-tratamiento con E2 o E4 llevó a una fuerte tendencia a la reducción de la expresión de los marcadores M1 *iNOS*, *Tnf- α* e *IL1- β* (medido mediante qPCR) utilizando ARN aislado de las células tratadas. Datos de células agrupadas derivadas de n=3 ratones independientes. Media + EEM.

Figura 25. Los marcadores pro-inflamatorios se reducen tras el tratamiento con E2 o E4 en M1-estimulado, factor estimulante de colonia de macrófagos diferenciado (MCSF por sus siglas en inglés), macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM). Se diferenciaron los BMDM utilizando 30ng/ml de MCSF, y polarizados a M1 utilizando 100ng/ml de IFN- γ , 10pg/ml de LPS por 6 horas. A continuación, se co-trató las células con E2 o E4 a 10^{-7} M. Se midió la expresión de los marcadores M1 *iNOS*, *Tnf-*

α e *IL1- β* mediante qPCR utilizando ARN aislado de las células tratadas. Datos de las células agrupadas derivadas de n=3 ratones independientes. * $p \leq 0.05$. Media + EEM.

Figura 26. Los marcadores pro-inflamatorios se reducen tras el tratamiento con E2 o E4 en macrófagos peritoneales murinos polarizados M1. Se aisló los macrófagos peritoneales limpiamente y fueron pre-tratados inmediatamente con E2 o E4 a 10^{-7} M seguido de polarización al fenotipo pro-inflamatorio M1 utilizando 100ng/ml de IFN- γ , y 10pg/ml de LPS por 6 horas. Se midió la expresión de los marcadores M1 *iNOS*, *Tnf- α* e *ILI- β* mediante qPCR utilizando ARN aislado de las células tratadas. Datos de células derivadas de n=3 ratones independientes. ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$. Media + EEM.

Figura 27. El co-tratamiento de HDF con antagonistas específicos de ER sugiere que tanto ER α como ER β participan en la migración de fibroblastos promovida por E4. Se calculó el cierre del porcentaje después de 24 horas, tras el tratamiento con vehículo, E2, E4 o E2/E4 y el antagonista MPP específico de ER α o el antagonista PHTPP específico de ER β . Datos de dos donantes de fibroblastos independientes (n=6). * $p \leq 0.05$ vs E4. Media + EEM.

Figura 28. El co-tratamiento de los macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM) con antagonistas específicos de ER sugiere que tanto ER α como ER β participan en la actividad anti-inflamatoria promovida por E4. Los BMDM fueron aislados, diferenciados utilizando L929 GM al 20%, y polarizados al fenotipo M1 pro-inflamatorio utilizando 100ng/ml de IFN- γ , y 10pg/ml de LPS por 6 horas. Las células polarizadas M1 estimuladas con E2 y E4 (10^{-7} M) fueron co-tratadas con el antagonista específico de ER α o el antagonista PHTPP específico de ER β . Se midió la expresión del marcador *IL1- β* pro-inflamatorio mediante qPCR utilizando ARN aislado de las células

tratadas. Células de n=3 ratones independientes. **p≤0.01 vs E4. Media + EEM.

Figura 29. El co-tratamiento de BMDM con antagonistas específicos de ER sugiere que tanto ER α como ER β participan en la actividad anti-inflamatoria promovida por E4. Se diferenciaron los BMDM utilizando L929 GM al 20%, y polarizados a M1 utilizando 100ng/ml de IFN- γ , 10pg/ml de LPS por 6 horas. Las células polarizadas M1 se trataron con E2, E4, EstroGel[®] (EG), placebo AG23 o formulación activa AG23. *iNOS* fue medido mediante qPCR. Células de n=5-6 ratones independientes. *p≤0.05, **p≤0.01. Media + EEM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Tal como se utiliza en este documento, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes tanto singulares como plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto por", tal como se utilizan en este documento, son sinónimos de "incluido", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros, elementos o pasos del método adicionales no mencionados. Los términos también abarcan "que consiste en" y "que consiste esencialmente en", que gozan de significados bien establecidos en la terminología de patentes.

La recitación de rangos numéricos por criterios de valoración incluye todos los números y fracciones comprendidos dentro de los rangos respectivos, así como los criterios de valoración recitados. Esto se aplica a los rangos numéricos independientemente de si son introducidos por la expresión "de ... a ..." o la expresión "entre ... y ..." u otra expresión.

Los términos "alrededor de" o "aproximadamente" como se usa en este documento para referirse a un valor mensurable, como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, abarcan las variaciones del valor especificado y a partir de éste, como variaciones de $\pm 10\%$ o menos, preferiblemente $\pm 5\%$ o menos, más preferiblemente $\pm 1\%$ o menos, y aún más preferiblemente $\pm 0.1\%$ o menos del valor especificado y a partir de éste, en la medida en que dichas variaciones sean apropiadas para su realización en la invención que se divulga. Debe entenderse que el valor al cual se refiere el modificador "alrededor de" o "aproximadamente" también se divulga de forma específica y preferente.

Mientras que los términos "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más miembros o al menos uno de un grupo de miembros es claro por sí mismo, a modo de mayor ejemplificación, el término incluye entre otras cosas, una referencia a cualquiera de dichos miembros, o a cualquiera de dos o más de dichos miembros, como, p.ej., ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 o ≥ 7 etc. de dichos miembros, y hasta todos dichos miembros. En otro ejemplo, "uno o más" o "al menos uno" puede referirse a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más.

El análisis de los antecedentes de la invención en este documento se incluye para explicar el contexto de la invención. Esto no debe interpretarse como una admisión de que cualquiera de los materiales a los que se hace referencia fue publicado, conocido o formó parte del conocimiento general común en cualquier país desde la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones.

A lo largo de esta divulgación, se hace referencia a varias publicaciones, patentes y descripciones de patentes publicadas como una cita identificativa. Todos los documentos citados en la presente descripción se incorporan en este documento por referencia en su totalidad. En particular, las enseñanzas o

secciones de tales documentos a los que se hace referencia de manera específica en este documento se incorporan por referencia.

A menos que se defina en contrario, todos los términos utilizados al divulgar la invención, que incluye términos técnicos y científicos tienen el significado que es comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. A modo de orientación adicional, se incluye definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la invención. Cuando se definen términos específicos en relación con un aspecto particular de la invención o una realización particular de la invención, dicha connotación o significado se aplica a lo largo de esta descripción, p.ej., también en el contexto de otros aspectos o realizaciones de la invención, a menos que se defina en contrario. Por ejemplo, las realizaciones dirigidas a productos también son aplicables a las características correspondientes de los métodos y usos.

En los siguientes pasajes, se definen diferentes aspectos o realizaciones de la invención en mayor detalle. Cada aspecto o realización así definida puede combinarse con cualquier otro u otros aspectos o realizaciones a menos que se indique claramente lo contrario. En particular, cualquier característica indicada de ser preferida o ventajosa puede combinarse con cualquier otra característica o características indicadas de ser preferidas o ventajosas.

La referencia a lo largo de esta descripción a "una de las realizaciones", "una realización" significa que una función, estructura o característica particular descrita en relación con la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, apariciones de las frases "en una de las realizaciones" o "en una realización" en varios lugares a lo largo de esta descripción no necesariamente se

refieren todas a la misma realización. Además, las funciones, estructuras, características particulares pueden combinarse en cualquier forma conveniente, como sería evidente para un experto en la materia a partir de esta divulgación, en una o más realizaciones. Además, si bien algunas realizaciones que se describen en este documento incluyen algunas, pero no otras funciones incluidas en otras realizaciones, combinaciones de funciones de diferentes realizaciones están destinadas a estar dentro del alcance de la invención, y forman diversas realizaciones, como lo entenderían los expertos en la técnica. Por ejemplo, en las reivindicaciones que se anexan, se incluyen combinaciones alternativas de las realizaciones reivindicadas, como lo entenderían los expertos en la técnica.

La inclusión de un estrógeno en una composición farmacéutica para aplicación tópica se ha descrito en la técnica. Un ejemplo de una formulación tópica disponible comercialmente es el Estrogel®, que es un gel que comprende estradiol. El Estrogel® se indica en el tratamiento de síntomas vasomotores de moderados a graves y síntomas de atrofia vulvar y vaginal de moderados a graves debido a la menopausia. Aunque el Estrogel® tiene beneficios potenciales en la cicatrización de heridas, no se ha comercializado para esta indicación como tal. Además, es conocido que las formulaciones de estrógeno convencionales son sub-óptimas para su aplicación directa a individuos y se caracterizan por una considerable lista de efectos adversos que pueden estar relacionados con el uso de estradiol y/o con la exposición sistémica no intencional. Tales efectos adversos pueden incluir náuseas, vómitos, calambres estomacales, hinchazón, inflamación, aumento de peso, dolor de mamas, sensibilidad en las mamas, dolor de cabeza, prurito vaginal, flujo vaginal, regulación menstrual anormal, manchas, caída del cabello, etc. (cf. Mayo Clinic report on transdermal estradiol: Estradiol (Transdermal Route) Side Effects - Mayo Clinic). Por

lo tanto, las composiciones farmacéuticas conocidas van acompañadas de una cantidad considerable de efectos sistémicos no deseados para el individuo. Como se describe en el resumen de la presente divulgación, se proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un componente de estetrol y que tienen al menos propiedades de cicatrización de heridas similares a las composiciones farmacéuticas que han sido descritas en la técnica, pero presentan efectos sistémicos notablemente reducidos. Por ejemplo, mientras que las composiciones conocidas para la cicatrización de heridas que comprenden estradiol provocan un claro aumento del peso del útero que indica una respuesta sistémica al estradiol, las composiciones que comprenden un componente de estetrol aumentan el peso del útero en menor medida, con algunas composiciones que incluso no muestran prácticamente ningún efecto sobre el peso del útero, sin dejar de ser eficaces en la cicatrización de heridas. Esta observación sigue siendo válida cuando se incluye un potenciador de la permeabilidad. Esto permite la formulación de una composición farmacéutica que comprende una dosis de estrógeno relativamente baja. Las propiedades de cicatrización de heridas de tales dosis bajas de un componente de estetrol son además notables dado que el estetrol ha sido considerado históricamente un estrógeno débil en comparación con otros estrógenos como el estradiol. (Gérard y otros, J Endocrinol, 2015). Por lo tanto, tanto las composiciones como se describen en este documento como el uso médico para la cicatrización de heridas de componentes de estetrol no puede anticiparse ni preverse sobre la base de lo que se conoce en la técnica.

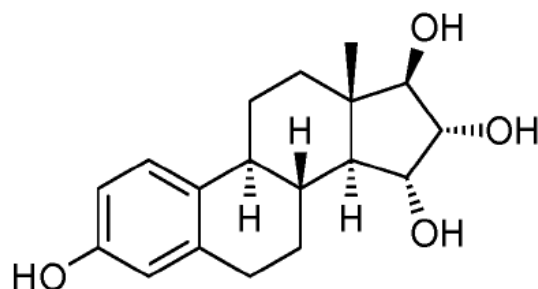
En vista de lo anterior, un primer aspecto de la invención está dirigido a una composición farmacéutica que comprende de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 0.18 (p/p) de un componente de estetrol.

El término "componente de estetrol", como se usa a lo largo de este documento, comprende sustancias seleccionadas del grupo que consiste de estetrol, ésteres de estetrol, ésteres de estetrol en donde el átomo de hidrógeno de al menos uno de los grupos hidroxilo ha sido sustituido por un radical acilo de un hidrocarburo carboxílico, ácido sulfónico o ácido sulfámico de 1-25 átomos de carbono, hidratos de estetrol tal como estetrol monohidrato; y combinaciones de los mismos. Se entiende que cuando se menciona "estetrol" a lo largo de cualquier sección de esta descripción, también se contempla cualquier componente conteniendo estetrol (p.ej., compuesto) y/o derivado de estetrol (como los mencionados anteriormente). Más preferiblemente, en el contexto de la presente divulgación, un componente de estetrol particularmente preferido, adecuado para la unidad de dosificación o para los usos cosméticos o médicos y para los métodos de tratamiento que se describen en este documento es el estetrol, incluidos sus hidratos. Más preferiblemente, dicho componente de estetrol es estetrol monohidrato.

El término "estetrol" como se usa en este documento se refiere a 1,3,5(10)-estratrieno-3,15alfa,16alfa,17beta-tetrol o 15alfa-hidroxiestriol así como hidratos de estetrol, p.ej. estetrol monohidrato. El "estetrol", o en corto "E4" es un estrógeno esteroide producido por el hígado fetal humano (PubChem CID: 27125). El estetrol puede ser descrito como un 3-hidroxi esteroide que corresponde a 17beta-estradiol en donde las posiciones 15 α y 16 β son sustituidas por dos grupos hidroxilo adicionales. Se sabe que el estetrol es un agonista del receptor de estógeno (Coelingh Bennink y otros, Estetrol review: profile and potential clinical applications, Climacteric, 2008). En los casos en donde el componente de estetrol que se describe en este documento indica estetrol, dicho estetrol puede ser estetrol endógeno. De manera alternativa, el estetrol puede ser sintetizado químicamente, sintetizado por el uso de enzimas

recombinantes (mutantes), o sintetizado mediante cualquier combinación de lo mismo. El estetrol puede estar indicado de manera alternativa en la técnica mediante su fórmula molecular: $C_{18}H_{24}O_4$, o por fórmula estructural (I):

Fórmula (I)



"(p/p)" o indicado de manera alternativa a lo largo de la técnica por términos como "peso por peso" o "peso a peso" se refiere a la contribución de una molécula o sustancia particular dentro de una composición o mezcla medida por su peso (p.ej., masa).

En realizaciones particulares, la composición comprende de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.18% (p/p) de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol. En realizaciones preferidas, la composición comprende de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 0.16% (p/p) de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol, preferiblemente de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.14% (p/p) de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.04% a aproximadamente 0.12% (p/p) de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.10% (p/p) de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.08% (p/p) de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol.

En realizaciones particulares alternativas, la composición comprende de aproximadamente 0.18% (p/p) o menos de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol. En realizaciones preferidas, la composición comprende de aproximadamente 0.16% (p/p) o menos de un componente de estetrol como por ejemplo, estetrol, preferiblemente de aproximadamente 0.14% (p/p) o menos de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.12% (p/p) o menos de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.10% (p/p) o menos de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0.08% (p/p) o menos de un componente de estetrol como por ejemplo estetrol.

Opcionalmente, la composición comprende de aproximadamente 0.04% a 1% (p/p) de estetrol. En ciertas realizaciones, la composición comprende de aproximadamente 0.05% a 0.5% (p/p) de estetrol. En otras realizaciones, la composición comprende de aproximadamente 0.06% a 0.5% (p/p) de estetrol.

En realizaciones preferidas, el estetrol está presente o es usado como un monohidrato. Por tanto, en realizaciones particulares la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.18% (p/p) de estetrol monohidrato. En realizaciones preferidas, la composición comprende de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 0.16% (p/p) de estetrol monohidrato, preferiblemente de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.14% (p/p) de estetrol monohidrato, más preferiblemente de aproximadamente 0.04% a aproximadamente 0.12% (p/p) de estetrol monohidrato, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.10% (p/p) de estetrol monohidrato, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.08% (p/p) de estetrol monohidrato.

En realizaciones particulares alternativas, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0.18% (p/p) o menos de estetrol monohidrato. En realizaciones preferidas, la composición comprende de aproximadamente 0.16% (p/p) o menos de estetrol monohidrato, preferiblemente de aproximadamente 0.14% (p/p) o menos de estetrol monohidrato, más preferiblemente de aproximadamente 0.12% (p/p) o menos de estetrol monohidrato, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.10% (p/p) o menos de estetrol monohidrato, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0.08% (p/p) o menos de estetrol monohidrato.

Las antedichas realizaciones no excluyen la presencia de componentes no estrogénicos del estetrol en la composición farmacéutica. También se prevé diferentes componentes de estetrol dentro de una única composición. En tales realizaciones, la composición puede, a modo de ilustración y no de limitación, comprender tanto estetrol, o más particularmente, estetrol monohidrato y un éster de estetrol.

Con "aplicación tópica" se entiende la aplicación sobre un lugar específico o en el cuerpo. En particular, se prevé la aplicación a superficies del cuerpo como la piel o membranas mucosas. Cuando se utiliza de manera tópica, normalmente se busca efectos locales, en especial efectos locales sobre la piel y membranas mucosas. Si bien la aplicación tópica también incluye aplicación a la vagina, la aplicación tópica se entiende preferiblemente como aplicación a la piel dentro del presente contexto.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende un potenciador de la permeabilidad que permite la permeación a través del estrato córneo. En el contexto de la presente invención, el término "potenciador de la permeabilidad" se usa indistintamente con términos que incluyen pero que no se limitan a "potenciador de la permeabilidad", "aumentador de la permeabilidad", "inductor de la permeabilidad", e incluso

“potenciador cutáneo”. Un experto entenderá que el término potenciador de la permeabilidad que se usa en la presente divulgación indica una molécula potenciadora de la permeabilidad como parte de un disolvente o sistema disolvente. Diferentes potenciadores de la permeabilidad han sido descritos en detalle en la técnica e incluye sin imitación los que se detallan en la base de datos CPE (Vasyuchenko y otros, *Pharmaceutics*, 2021). Más adelante se describe los potenciadores de la permeabilidad ilustrativos y no limitantes.

Son conocidas la composición y las diferentes capas arquitectónicas celulares de la piel. Un experto entiende que la piel humana puede ser considerada generalmente para comprender tres distintas capas; la epidermis, la dermis y la hipodermis. La epidermis es la capa superior de la piel que comprende principalmente queratinocitos, es decir, células epiteliales que proliferan y se diferencian para generar finalmente el estrato córneo (capa externa de células muertas de la piel). La epidermis forma una barrera para los patógenos del medio ambiente como bacterias, regula la cantidad de agua que es eliminada del cuerpo y juega un papel predominante en la cicatrización de heridas. La segunda capa de la piel, es decir, la dermis (alternativamente “corium” o “tejido conectivo de la piel”) está situada entre la hipodermis y epidermis y comprende principalmente fibroblastos (mesenquimales). La dermis está estrechamente conectada a la epidermis por una membrana basal, es decir, un tipo de matriz extracelular en forma de lámina. La dermis también es considerablemente más gruesa que la epidermis y los fibroblastos en la dermis producen la matriz extracelular (colágeno, glicosaminoglicanos, incluido el ácido hialurónico, fibras elásticas, ...). Los roles principales de la dermis son mantener el grosor y la elasticidad de la piel, mantener la hidratación de la piel (por la capacidad de retención de agua de los glicosaminoglicanos, incluido el ácido hialurónico) y

cicatrización de heridas, es decir, reformando y remodelando la matriz extracelular dañada. La capa más profunda de la piel se indica comúnmente como la "hipodermis (capa), anotada indistintamente en la técnica con términos como "tejido subcutáneo" e "hipodermis", "subcutis" y "fascia superficial".

Por lo tanto, un experto entiende que el "estrato córneo" al que se hace referencia en este documento se refiere a la capa externa de la epidermis que está compuesta por múltiples capas de queratinocitos diferenciados terminalmente compuestos principalmente por el material proteínico queratina. La composición, función y características del estrato córneo han sido descritos en mayor detalle en la técnica (p.ej., en Matsui and Amagai, Int Immunol, 2015). Generalmente se considera que la permeación de agentes farmacéuticamente activos a través de la piel está limitada por el estrato córneo. Por tanto, los potenciadores de la permeabilidad previstos en la presente invención ayudan la permeación de al menos el componente de estetrol a través del estrato córneo y/o costra de la herida. La permeación está particularmente facilitada en las heridas por quemaduras.

El término "Ingrediente farmacéuticamente activo" que es utilizado indistintamente a lo largo de la presente divulgación con "agente farmacéuticamente activo" debe interpretarse según la definición del término por la Organización Mundial de la Salud: "una sustancia utilizada en un producto farmacéutico terminado (FPP por sus siglas en inglés) con la intención de mostrar actividad farmacológica o de tener un efecto directo en el diagnóstico, curación, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades, o efecto directo en la restauración, corrección o modificación de funciones fisiológicas en los seres humanos".

Las composiciones descritas en este documento son especialmente adecuadas para su uso en cicatrización de heridas y pueden por

lo tanto denominarse indistintamente "composiciones farmacéuticas" en cualquier caso dado. Preferiblemente, las composiciones que se describen en este documento se usan para cicatrización tópica de heridas. La expresión "utilizada para cicatrización tópica de heridas" como se menciona en este documento se refiere al tratamiento de una o más heridas en un sujeto, en donde el área de la herida puede definirse por una determinada área de superficie. Además, la expresión indica el uso de las composiciones que se describen en este documento para el tratamiento de heridas de la piel de un sujeto. El término "cicatrización tópica de heridas" indica además administración localizada (es decir, aplicación) de la composición que se describe en este documento al área de la herida. La administración tópica también puede implicar el uso de medios de administración transdérmica como pero no limitada a parches transdérmicos como se explica más adelante en la presente divulgación.

Los términos "área de herida" y "tamaño de herida" como se usan en este documento se refieren a la medida física de la interrupción de la continuidad normal de las estructuras. El área de herida o tamaño de herida puede, por ejemplo, expresarse en cm cuadrados. Dependiendo del tamaño o área de la herida, la concentración de la composición a ser aplicada en dicha herida debe ajustarse para no exceder la dosis máxima tolerada. La composición puede en tal caso ser preparada específicamente para dicho sujeto o uno puede tener diferentes grados o concentrados pre-preparados. Para una herida más grande es aconsejable por lo tanto utilizar las composiciones según la invención en concentraciones más bajas, mientras que la aplicación en heridas más pequeñas permite utilizar concentraciones más altas. Si los resultados de los estudios en ratón se extrapolan a las condiciones en un humano, se puede calcular que la concentración en ratones de 0.06% (p/p) corresponde a 0.1 mg del componente

de estetrol en un hidrogel a ser aplicado a un humano. Por lo tanto, puede asumirse que la aplicación tópica de un componente de estetrol de aproximadamente 0.1 mg a un sujeto no tiene efectos sistémicos, por ejemplo, el engrosamiento del útero en un sujeto de sexo femenino. Las dosis más altas de 0.5% (p/p) en ratones pueden extrapolarse a 0.9 mg o aproximadamente 1 mg de estetrol que puede ser administrado tópicamente sin riesgo significativo de efecto sistémico, o al menos con menos efecto sistémico que el Estrogel® disponible comercialmente que comprende 0.06% de estradiol y que es aprobado reglamentariamente para aplicación tópica.

Los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" pueden usarse indistintamente en este documento, y denotan típica y preferiblemente humanos, pero también puede comprender referencia a animales no humanos, preferiblemente animales de sangre caliente, incluso más preferiblemente mamíferos, como por ejemplo, primates no humanos, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares. El término "animales no humanos" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, como primates no humanos, (en particular primates superiores), ovejas, perros, roedores (p.ej., ratón o rata), conejillos de indias, cabras, cerdos, gatos, conejos, vacas y no mamíferos como pollos, anfibios, reptiles, etc. En ciertas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. Los sujetos preferidos son sujetos humanos que incluyen todos sus géneros y categorías de edad. Se pretende que tanto los sujetos adultos, los sujetos recién nacidos y fetos estén comprendidos en el término "sujeto". Por lo tanto, se pretende que tanto los sujetos adultos como los recién nacidos estén comprendidos. Los ejemplos de sujetos incluyen humanos, perros, gatos, vacas, cabras, y ratones. Los sujetos preferidos en el contexto de la invención se definen más adelante.

En otro aspecto relacionado, la invención se refiere a un componente de estetrol para su uso en cicatrización de heridas, más particularmente cicatrización localizada o tópica de heridas. Por tanto, la presente invención prevé el uso de una cantidad efectiva de un componente de estetrol para su uso en cicatrización de heridas mediante la aplicación de un componente de estetrol a la piel o área de herida del sujeto. El término "una cantidad efectiva" se refiere a una cantidad necesaria para obtener un efecto fisiológico. El efecto fisiológico puede obtenerse por medio de una dosis o por dosis repetidas. En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un componente de estetrol en presencia de un potenciador de la permeabilidad que permite la permeación a través del estrato córneo para su uso en cicatrización de heridas. En otras realizaciones, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un componente de estetrol y a un potenciador de la permeabilidad para su uso en cicatrización de heridas. Preferiblemente, el componente de estetrol para su uso en cicatrización de heridas es estetrol, más preferiblemente estetrol monohidrato. En realizaciones alternativas, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un componente de estetrol junto con una segunda composición que comprende un potenciador de la permeabilidad para su uso en cicatrización de heridas. En tales realizaciones, el orden particular de administración de la primera y segunda composición al área de la herida (es decir lugar de la herida) no es particularmente limitante. Por tanto, las composiciones pueden aplicarse de forma secuencial o (casi) simultáneamente.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica es para su uso en cicatrización de heridas y comprende de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 5%(p/p), como de aproximadamente 0.08 a aproximadamente 1.2%(p/p), de

aproximadamente 0.09% a aproximadamente 1.1%(p/p), o de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%(p/p) de un componente de estetrol (como estetrol, preferiblemente estetrol monohidrato) y un potenciador de la permeabilidad, preferiblemente de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 2.5%(p/p) de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, más preferiblemente de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 2%(p/p) de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, más preferiblemente de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 1.5%(p/p) de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 1%(p/p) de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.75%(p/p) de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, incluso aún más preferiblemente de aproximadamente 0.04 a aproximadamente 0.5%(p/p) de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, más preferiblemente aproximadamente 0.06%(p/p) de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad.

En realizaciones alternativas, la composición farmacéutica es para su uso en cicatrización de heridas y comprende de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 5% o menos (p/p), tal como de aproximadamente 0.08 a aproximadamente 1.2%(p/p), de aproximadamente 0.09% a aproximadamente 1.1%(p/p), o de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%(p/p) de un componente de estetrol (como estetrol, preferiblemente estetrol monohidrato) y un potenciador de la permeabilidad, preferiblemente aproximadamente 2.5%(p/p) o menos de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, más preferiblemente aproximadamente 2%(p/p) o menos de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, más preferiblemente aproximadamente 1.5%(p/p) o menos de un

componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, aún más preferiblemente aproximadamente 1%(p/p) o menos de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, aún más preferiblemente 0.75%(p/p) o menos de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, incluso aún más preferiblemente aproximadamente 0.5%(p/p) o menos de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad, más preferiblemente aproximadamente 0.1%(p/p) o menos de un componente de estetrol y un potenciador de la permeabilidad.

Preferiblemente, la composición farmacéutica a la que se refiere en este documento es un hidrogel, o está comprendida en un hidrogel. Los geles son sistemas semi-sólidos en los cuales se solidifican los líquidos mediante formadores de esqueletos de gel. En un hidrogel, el líquido que forma el gel es agua o una solución acuosa. El término "hidrogel" como se usa en este documento hace referencia a una solución acuosa de ingredientes activos que se solidifica principalmente con sustancias hidrofílicas macromoleculares para formar un gel. Las sustancias hidrofílicas macromoleculares y por tanto los materiales poliméricos se hinchan al entrar en contacto con el agua, lo cual, dependiendo de las concentraciones, da como resultado soluciones con comportamiento de flujo pseudoplástico o estructuras plásticas que contienen un componente acuoso necesario. Por tanto, los geles hidrofílicos consisten en agua o soluciones acuosas que suelen gelificarse con compuestos macromolares hidrofílicos. Los geles contruidos con andamios macromolares hidrofílicos son generalmente tixotrópicos. A diferencia de las cremas, los geles son considerados como verdaderos sistemas monofásicos.

Los hidrogeles mejoran o restauran el equilibrio de humedad en el lecho de una herida equilibrando la hidratación con la absorción de fluido excesivo. Como se prevé en este documento,

los hidrogeles pueden comprender cualquier polímero adecuado o combinación de polímeros, como pero no limitado a polímeros hidrofílicos, ácido acrílico, acrilamida, y 2-hidroxietilmetacrilato. Los hidrogeles son particularmente formas preferidas de las composiciones divulgadas en este documento en virtud de su capacidad para proporcionar equilibrio de humedad al lecho de una herida equilibrando la hidratación con absorción de fluido excesivo. Los ejemplos de hidrogeles incluyen, pero no se limitan a hidrogeles sintéticos, hidrogeles sensibles a los estímulos, hidrogeles basados en (poli)péptidos, hidrogeles híbridos, e hidrogeles basados en ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés). Los métodos de producción de cada una de estas categorías de hidrogel han sido descritos en la técnica y son por tanto conocidos para un experto.

A modo de ilustración y no como limitación, los ejemplos de hidrogeles sintéticos incluyen hidrogeles de doble red. Los ejemplos también incluyen hidrogeles nanocompuestos. Los hidrogeles sensibles a los estímulos se caracterizan por su capacidad de sufrir cambios en la hinchazón que pueden estar mediados por estímulos externos (p.ej., pH, temperatura, fuerza iónica, tipo de disolvente, campo eléctrico, campo magnético, luz, y especies quelantes). Los ejemplos de hidrogeles sensibles a los estímulos incluyen sin limitación hidrogeles formados a partir de segmentos recombinantes de co-polipéptidos en bloque de proteínas estructurales naturales, como la elastina, seda, bloques peptídicos similares a la seda y la elastina, y copolímeros tribloque recombinantes de una o más secuencias polipeptídicas.

El término "hidrogeles híbridos" se usa en este documento para indicar hidrogeles que comprenden componentes de al menos dos clases distintas de moléculas, como por ejemplo polímeros

sintéticos y macromoléculas biológicas, interconectadas de manera covalente o no covalente.

En la formulación del gel como se describe en este documento, la presencia de algunos excipientes como glicol propileno, glicerol, Transcutol®, alcohol bencílico, y PEG400 pueden aumentar la solubilidad del estetrol. El uso de estos excipientes en la formulación del gel permite que el estetrol sea soluble y esté completamente disponible para permear a través de la membrana o, de manera similar, a través del estrato córneo y/o la costra de la herida y/o en heridas por quemaduras. Esto contribuye a un aumento de la velocidad de dispersión a través de la membrana o, de manera similar, a través del estrato córneo y/o la costra de la herida y/o en heridas por quemaduras tal como lo prevé la ley de dispersión de Fick, ya que se produce un gradiente de concentración de estetrol mayor al aumentar la solubilidad del estetrol entre los dos lados de la membrana.

El perfil de dispersión de la crema mostró una liberación más lenta de estetrol en el mismo tiempo en comparación con las formulaciones de gel. En una formulación de crema, es probable que el componente de estetrol esté dentro de la fase interna de la emulsión y que necesite dispersarse hacia la fase externa de la emulsión antes de poder dispersarse a través de la membrana de barrera o, de manera similar, a través del estrato córneo y/o la costra de la herida y/o en heridas por quemaduras. Sin embargo, el alto coeficiente de partición de la base de la crema evita la dispersión rápida del estetrol a lo largo de su gradiente de concentración. El proceso completo es más lento y la velocidad de liberación de estetrol disminuye dramáticamente.

Es de entenderse que cualquier referencia a "composición" y "composición farmacéutica" comprende cualquier hidrogel que se describe en este documento, y viceversa.

Preferiblemente, el hidrogel que se prevé en este documento comprende un potenciador de la permeabilidad que permite la permeación a través del estrato córneo. Más preferiblemente, el hidrogel al que se hace referencia en este documento es un hidrogel que contiene de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 10%(p/p) de un componente de estetrol como estetrol, preferiblemente estetrol monohidrato. Preferiblemente, el hidrogel al que se hace referencia en este documento es un hidrogel que comprende de aproximadamente 0.02% a aproximadamente 5%(p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente, el hidrogel al que se hace referencia en este documento es un hidrogel que comprende de aproximadamente 0.2% a aproximadamente 2.5%(p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente el hidrogel contiene de aproximadamente 0.03% a aproximadamente 0.75%(p/p) de un componente de estetrol, preferiblemente de aproximadamente 0.04% a aproximadamente 0.5%(p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.25%(p/p) de un componente de estetrol, tal como de aproximadamente 0.08 a aproximadamente 1.2%(p/p), de aproximadamente 0.09% a aproximadamente 1.1%(p/p), o de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%(p/p), más preferiblemente el hidrogel comprende de aproximadamente 0.06% de un componente de estetrol.

De manera alternativa, el hidrogel mencionado en este documento es un hidrogel que comprende aproximadamente 10%(p/p) o menos de un componente de estetrol. Preferiblemente, el hidrogel mencionado en este documento es un hidrogel que comprende aproximadamente 5%(p/p) o menos de un componente de estetrol, más preferiblemente, el hidrogel mencionado en este documento es un hidrogel que comprende aproximadamente 2.5%(p/p) o menos de un componente de estetrol, más preferiblemente el hidrogel comprende aproximadamente 0.75% (p/p) o menos de un componente de estetrol, preferiblemente aproximadamente 0.5%(p/p) o menos

de un componente de estetrol, más preferiblemente aproximadamente 0.25%(p/p) o menos de un componente de estetrol, más preferiblemente aproximadamente 0.1% o menos (p/p) de un componente de estetrol, más preferiblemente aproximadamente 0.08% o menos (p/p) de un componente de estetrol.

En realizaciones particulares en donde la composición (farmacéutica) es un hidrogel, dicho hidrogel se caracteriza por un favorable perfil de liberación, p.ej., cuando se le compara con otras formulaciones como pero sin limitarse a cremas. En realizaciones preferidas, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de al menos aproximadamente 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, al menos aproximadamente 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, preferiblemente al menos aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, más preferiblemente al menos aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, más preferiblemente al menos aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, más preferiblemente al menos aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dentro de 1 hora a través de una membrana isopore en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEF400:agua. En realizaciones alternativas, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente 200 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dentro de 1 hora a través de una membrana isopore en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua. Dependiendo de la superficie de la herida, la concentración del componente de estetrol puede necesitar ser reducida para que no resulte en una administración acumulativa de estetrol en cantidades muy altas. Esto puede ser calculado fácilmente por un médico o farmacéutico. En realizaciones alternativas preferidas, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una cantidad acumulativa media de componente de

estetrol liberada de aproximadamente 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dentro de 1 hora a través de una membrana isopore en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua. En otras realizaciones alternativas preferidas, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dentro de 1 hora a través de una membrana isopore en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua.

Preferiblemente, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de al menos aproximadamente 350 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, preferiblemente al menos aproximadamente 400 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, más preferiblemente al menos aproximadamente 450 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ dentro de 8 horas a través de una membrana isopore en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua.

Preferiblemente, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por un % medio de dosis aplicada del componente de estetrol en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua de al menos aproximadamente 15%, preferiblemente al menos aproximadamente 20% después de 1 hora y/o un % medio de dosis aplicada del componente de estetrol en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua de al menos aproximadamente 40%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos 80% después de 8 horas. En realizaciones alternativas, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por un % medio de dosis aplicada del componente de estetrol en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua de aproximadamente 15% a aproximadamente 30% después de 1 hora y/o un % medio de dosis aplicada del componente de estetrol en una solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua de aproximadamente 45% a aproximadamente 90% después de 8 horas.

En realizaciones muy preferidas, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una velocidad de liberación de componente de estetrol (es decir pendiente) de aproximadamente $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos $7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, a aproximadamente $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ y una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ después de 8 horas, y opcionalmente un porcentaje de cantidad de estetrol liberada de aproximadamente 75% a aproximadamente 95% a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua. Aún más preferiblemente, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una velocidad de liberación de componente de estetrol (es decir, pendiente) de aproximadamente $30 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ a aproximadamente $35 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ y una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente $75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $90 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ después de 8 horas, y opcionalmente un porcentaje de cantidad de estetrol liberada de aproximadamente 85% a aproximadamente 90% a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua. Más preferiblemente, el hidrogel que se describe en este documento se caracteriza por una velocidad de liberación de componente de estetrol (es decir, pendiente) de aproximadamente $33 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ a aproximadamente $34 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ y una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente $82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $83 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ después de 8 horas, y opcionalmente un porcentaje de una cantidad de estetrol liberada de aproximadamente 86% a aproximadamente 88% a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua.

En realizaciones en donde la composición es una crema, dicha crema puede caracterizarse por una velocidad de liberación de componente de estetrol (es decir, pendiente) de aproximadamente $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $7 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$, al menos aproximadamente $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ o de $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ a aproximadamente $75 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua. Preferiblemente, dicha crema puede caracterizarse por una velocidad de liberación de componente de estetrol (es decir, pendiente) de aproximadamente $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ a aproximadamente $55 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$ a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua.

La crema puede además caracterizarse por una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ después de 1 hora a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua. Preferiblemente, la crema puede caracterizarse por una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ después de 1 hora a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua. La crema puede además caracterizarse por una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $150 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ después de 8 horas a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua. Preferiblemente, la crema puede caracterizarse por una cantidad acumulativa media de componente de estetrol liberada de aproximadamente $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a aproximadamente $120 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ después de 8 horas a través de una membrana isopore en solución receptora de 40:30:30 v/v/v etanol:PEG400:agua.

Como es evidente para un experto, la presente divulgación comprende el uso de cada una de las formas particulares de la composición farmacéutica que se divulga en este documento para su uso en cicatrización de heridas. Por tanto, la presente invención también está dirigida a un hidrogel como se divulga en este documento para su uso en cicatrización de heridas.

Si bien un hidrogel es la forma preferida de la composición farmacéutica que se divulga a lo largo de esta divulgación, esto no excluye otras formulaciones tópicas conocidas en la técnica. Por lo tanto, las formulaciones adecuadas incluyen, pero no se limitan a emulsiones, suspensiones, ungüentos, pastas, lociones, geles (incluidos los hidrogeles), espumas, mousses, sprays y cremas. Cada uno de estos términos pretende corresponder a su significado generalmente aceptado. De manera similar, estas formulaciones tópicas pueden aplicarse directamente a la piel, o en combinación con un apósito, parche, vendaje, curita, tampón, el interior de un esparadrapo o similares para evitar que la formulación se desprenda de la piel y en algunas realizaciones para proteger la herida de influencias externas como la suciedad y los microorganismos.

La "emulsión" se refiere generalmente a cualquier mezcla de al menos dos líquidos que no son mezclables (es decir, inmiscibles, no mezclables) y por tanto en la cual se distribuye un primer líquido en pequeñas gotas (fase dispersa) a través de un segundo líquido (medio de dispersión). Por lo tanto, en ciertas realizaciones la composición farmacéutica que se describe en este documento es una emulsión aceite-en-agua o agua-en-aceite. Las emulsiones son ampliamente utilizadas en formulaciones para el cuidado de la piel y pueden clasificarse como cremas o lociones. En relación con esto, "suspensión" se refiere en general a una mezcla heterogénea que contiene sólidos dispersos en una fase líquida que no están disueltos y tienen un tamaño lo suficientemente grande como para permitir la sedimentación.

El término "crema" se refiere generalmente a una emulsión de agua-en-aceite donde una fase acuosa se dispersa en una fase oleosa, pero también puede ser una emulsión de aceite-en-agua donde un aceite se dispersa en una base acuosa. Generalmente, se acepta que las cremas se diferencian de las emulsiones en que estas últimas son suspensiones estables de pequeñas gotas inmiscibles de un fluido inmiscible con otra parte fluida de la emulsión, mientras que una crema se refiere a un subconjunto particular de emulsiones más viscosas que suelen incluir más componentes lipofílicos y/o surfactantes.

Una "loción" es una composición líquida de viscosidad baja a media. Por lo general, las lociones son menos viscosas que las cremas, pero en algunos casos la viscosidad de ambas puede ser similar. Una loción puede contener sustancias finamente pulverizadas que son insolubles en el medio de dispersión a través del uso de agentes de dispersión y suspensión. Alternativamente, las lociones pueden tener como fase dispersa sustancias líquidas inmiscibles con el vehículo y suelen dispersarse mediante agentes emulsionantes u otros estabilizadores adecuados. En una realización, la loción se presenta en forma de una emulsión con una viscosidad entre 100 y 1000 centistokes. La fluidez de las lociones permite una aplicación rápida y uniforme sobre una amplia área de superficie. Normalmente, las lociones se secan sobre la piel, dejando una capa delgada de sus componentes medicinales sobre la superficie de la piel.

Un "ungüento" se refiere, en términos generales, a una crema de aceite-en-agua más viscosa, es decir, a una sustancia semisólida que contiene una base de ungüento y, opcionalmente, uno o más ingredientes farmacéuticamente activos (en el contexto de la presente invención, un componente de estetrol). Ejemplos de bases de ungüento adecuadas incluyen las bases de hidrocarburos,

las bases de absorción, las bases removibles en agua y las bases hidrosolubles. Las "pastas" generalmente se diferencian de los ungüentos en que contienen un mayor porcentaje de sólidos. En general, las pastas son más absorbentes y menos grasosas en comparación con los ungüentos basados en un conjunto idéntico de ingredientes/excipientes.

El término "espuma", tal como se utiliza en este documento, se refiere a una dispersión de partículas gaseosas en un medio líquido. Como ejemplos de medios líquidos en una espuma se pueden mencionar emulsiones de aceite-en-agua, emulsiones de agua-en-aceite, etanol, agua, disolventes, aceite líquido, propilenglicol y glicerina. Un experto comprenderá que las espumas pueden generarse reduciendo la tensión superficial del líquido que se mezcla con (una) sustancia(s) gaseosa(s), lo que ocasiona la formación de burbujas. La aceptación de las espumas se debe a su fácil aplicación en grandes áreas de la piel, ausencia de una película aceitosa o grasosa y a su rápida absorción en la piel. El término "mousse" se refiere a una sustancia muy similar a una espuma, pero se usa comúnmente para referirse a sustancias menos acuosas. El término "spray" se refiere a la solución que contiene el fármaco que se introduce en un dispositivo apto para pulverizar la solución que contiene el fármaco y se libera en forma de niebla mediante presión.

Como se indicó anteriormente, cualquiera de las composiciones farmacéuticas, como, pero no limitados a, hidrogeles descritos en este documento, puede comprender un potenciador de la permeabilidad. Preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende una molécula que permite la permeabilidad a través del estrato córneo (es decir, una molécula potenciadora de la permeabilidad) y un disolvente o sistema disolvente. Opcionalmente, el potenciador de la permeabilidad está presente en la composición, tal como, pero

no limitados a los hidrogeles descritos en este documento, en una cantidad de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 60% (p/p), preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% (p/p), más preferiblemente de una cantidad de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 45% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 40% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de 10% a aproximadamente 30% (p/p) o, alternativamente en una cantidad de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5% (p/p). Opcionalmente, la molécula potenciadora de la permeabilidad está presente en la composición tal como, pero no limitada a los hidrogeles divulgados en este documento en una cantidad de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 25% (p/p), preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 15% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 7.5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de 3.5% a aproximadamente 5% (p/p). Opcionalmente, el disolvente (sistema) está presente en la composición, tal como, pero no limitado a los hidrogeles divulgados en este documento en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 60% (p/p), preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 50% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10% a aproximadamente 40% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 15% a aproximadamente 30% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de 18% a aproximadamente 25% (p/p).

El potenciador de la permeabilidad descrito en este documento no se limita particularmente para la invención y, por lo tanto, puede comprender o consistir de una molécula seleccionada del grupo que consiste de suberina, lignina, cutina, incluyendo dimetilsulfóxido, etanol, propilenglicol, glicerina,

propiletilenglicoles, urea, dimetilacetamida, laurilsulfato de sodio, poloxámeros, spans, tweens, lecitina, terpenos y combinaciones de los mismos. Las moléculas potenciadoras de la permeabilidad preferidas en el contexto de la presente invención incluyen etanol, éteres, alcoholes bencílicos, ácidos grasos y sus ésteres, o cualquier combinación de los mismos. Las moléculas potenciadoras de la permeabilidad particularmente preferidas en el contexto de la presente invención incluyen Transcutol®, alcohol bencílico y cualquier combinación de los mismos. El alcohol bencílico ($C_6H_5CH_2OH$) puede denominarse indistintamente en la técnica como "fenilmetanol", "fenilcarbinol" y "bencenometanol". Transcutol® es un nombre comercial comúnmente aceptado para el 2-(2-etoxietoxi)etanol, también denominado indistintamente en la técnica como éter monoetílico dietilenglicol ($C_6H_{14}O_3$). Opcionalmente, la composición farmacéutica descrita en este documento comprende un potenciador de la permeabilidad, de aproximadamente un 1% a aproximadamente 20% de Transcutol® (p/p), preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 10% de Transcutol® (p/p), más preferiblemente de aproximadamente 3% a aproximadamente 8% de Transcutol® (p/p), y más preferiblemente de aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de Transcutol® (p/p).

Los potenciadores de la permeabilidad de la presente invención comprenden una molécula potenciadora de la permeabilidad y un disolvente o sistema disolvente. Los disolventes preferidos del potenciador de la permeabilidad incluyen, pero no se limitan a polietilenglicoles (PEG), propilenglicol (PG) y combinaciones de los mismos. El término "polietilenglicol" puede designarse indistintamente con términos como, pero no limitados a óxido de polietileno o poli(oxietileno), poli(óxido de etileno), y el polioxietileno se han descrito detalladamente en la técnica y, por lo tanto, son conocidos por un experto que comprenda que el polietilenglicol se caracteriza por la fórmula química

$\text{H}-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, donde n es un número entero. Los polietilenglicoles son compuestos de poliéter derivados del petróleo. Los PEG preferidos son aquellos con un peso molecular de aproximadamente 150 g/mol a aproximadamente 5000 g/mol, más preferiblemente de entre aproximadamente 200 g/mol a aproximadamente 2500 g/mol, aún más preferiblemente entre aproximadamente 250 g/mol a aproximadamente 1000 g/mol, más preferiblemente entre aproximadamente 300 g/mol a aproximadamente 600 g/mol. Por lo tanto, el PEG mencionado en este documento puede seleccionarse del grupo que consiste de: PEG200, PEG300, PEG400, PEG500, PEG600 y cualquier combinación de los mismos. Más preferiblemente el potenciador de la permeabilidad comprende, como disolvente o parte del disolvente, un PEG que tiene un peso molecular de aproximadamente 400 g/mol, tal como, pero no limitado a PEG400. El propilenglicol es comúnmente denominado en la técnica como propano-1,2-diol, α -propilenglicol, 1,2-propanodiol, 1,2-dihidroxipropano. El propilenglicol se caracteriza por la fórmula química $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$.

Preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende de aproximadamente 5% a aproximadamente 50% (p/p), preferiblemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 35% (p/p) o de aproximadamente 10% a aproximadamente 45% (p/p) de PEG, preferiblemente PEG400, y/o de aproximadamente 10% a aproximadamente 35% (p/p) de PG. Más preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% (p/p) de PEG, preferiblemente PEG400, y/o de aproximadamente 12% a aproximadamente 30% (p/p) de PG. Más preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende de aproximadamente 12% a aproximadamente 25% (p/p) de PEG, preferiblemente PEG400, y/o de aproximadamente 15% a aproximadamente 25% (p/p) de PG. Más preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende de aproximadamente 14%

a aproximadamente 23% (p/p) de PEG, preferiblemente PEG400, y/o de aproximadamente 16% a aproximadamente 23% (p/p) de PG. Más preferiblemente, el potenciador de la permeabilidad comprende de aproximadamente 16% a aproximadamente 22% (p/p) de PEG, preferiblemente PEG400, tal como de aproximadamente 18% a aproximadamente 22% (p/p) de PEG o de aproximadamente 16% a aproximadamente 20% (p/p) de PEG, y/o de aproximadamente 18% a aproximadamente 22% (p/p) de PG.

Opcionalmente, la composición farmacéutica (la cual es opcionalmente un hidrogel) comprende alcohol bencílico. El término "alcohol bencílico" será interpretado de acuerdo a la interpretación común en la técnica, y por lo tanto indica un alcohol aromático caracterizado por la formula química $C_6H_5CH_2OH$. Si está presente, la cantidad de alcohol bencílico en la composición no es particularmente limitante. Sin embargo, preferiblemente la cantidad de alcohol bencílico es de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% (p/p), más preferiblemente de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% (p/p), más preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 3% (p/p), aún más preferiblemente de aproximadamente 1.5% a aproximadamente 2.5% (p/p).

Opcionalmente, la composición farmacéutica (que puede ser un hidrogel) comprende un espesante. Un "espesante" puede indicarse alternativamente mediante términos como, pero no limitados a "agente espesante" y "agente de viscosidad". En el contexto de la presente invención, "espesante" se refiere a cualquier sustancia o molécula que, al añadirse a una composición líquida o semisólida, aumenta la viscosidad y/o la textura de dicha composición. Por lo tanto, si está presente, el espesante puede seleccionarse del grupo que consiste de: polímeros de ácido carboxílico, polímeros de poliacrilato reticulado, polímeros de poliacrilamida, polisacáridos, polímeros dibloque, polímeros

tribloque, gomas y cualquier combinación de los mismos. En realizaciones en donde el espesante es o comprende un polisacárido, dicho polisacárido puede seleccionarse del grupo que consiste de: celulosa, derivados de celulosa, carboximetilcelulosa, acetato propionato carboxilato de celulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxietil etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil metilcelulosa, metil hidroxietilcelulosa, celulosa hidroxialquilada, lignina, cutina, suberina, celulosa microcristalina, sulfato de celulosa sódica, escleroglucanos y cualquier combinación de los mismos. Las gomas adecuadas que pueden actuar como espesantes incluyen acacia, agar, algina, ácido algínico, alcohol cetílico, alginato de amonio, amilopectina, alginato de calcio, carragenina de calcio, carnitina, carragenina, dextrina, gelatina, goma gellan, goma guar, cloruro de guar hidroxipropiltrimonio, hectorita, ácido hialurónico, sílice hidratada, hidroxipropilquitosano, hidroxipropil guar, goma karaya, alga marina, goma de algarrobo, goma natto, alginato de potasio, carragenina de potasio, alginato de propilenglicol, goma de esclerocio, carboximetildextrano de sodio, carragenina de sodio, goma tragacanto, goma xantana y cualquier combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en este documento (que opcionalmente es un hidrogel) comprende un espesante, como se describe en este documento, en una cantidad de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 25% (p/p), preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 20% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.4% a aproximadamente 15%, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 10% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.75 % a aproximadamente 5% (p/p), o en una cantidad de aproximadamente 0.3 % a aproximadamente 3% (p/p). Los espesantes preferidos en el contexto de la presente

invención incluyen, pero no se limitan a espesantes seleccionados del grupo que consiste de: hidroxietilcelulosa (HEC), carboximetilcelulosa (CMC), polímero acrílico reticulado de alto peso molecular, copolímero tribloque no iónico, o cualquier combinación de los mismos. Los espesantes más preferidos en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a hidroxietilcelulosas, polímeros acrílicos reticulados de alto peso molecular, copolímeros tribloque no iónicos, y cualquier combinación de los mismos. Un polímero acrílico reticulado de alto peso molecular preferido es el Carbómero, conocido indistintamente en la técnica por el nombre comercial Carbopol®. Se contemplan tanto homopolímeros de Carbopol® (es decir, ácido acrílico reticulado con alilo sacarosa o alilo pentaeritritol), copolímeros de Carbopol® (ácido acrílico y acrilato de alquilo C10-C30 reticulados con alilo pentaeritritol), interpolímeros de Carbopol® (homopolímero de carbómero o copolímero que contiene un copolímero en bloque de polietilenglicol y un éster de ácido alquílico de cadena larga). Un Carbopol® particularmente preferido en el contexto de la presente invención es el Carbopol® 980, alternativamente indicado en la técnica como "Homopolímero de Carbómero Tipo C USP NF", que es un homopolímero de ácido acrílico reticulado con alilo sacarosa o alilo pentaeritritol en un codisolvente de ciclohexano y acetato de etilo, con una viscosidad de 40 000 a 60 000 cP. Una hidroxietilcelulosa preferida es la HEC250 HHX. Un copolímero tribloque no iónico preferido es un copolímero tribloque no iónico con una masa molecular de aproximadamente 1800 g/mol y aproximadamente 4000 g/mol, y un contenido de polioxietileno de aproximadamente 70% a aproximadamente 80%. Los copolímeros tribloque no iónicos más preferidos incluyen el poloxámero 188, el poloxámero 407 o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, el espesante es o comprende HEC y está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de

aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% (p/p), preferiblemente en una cantidad de 0.2% a aproximadamente 7.5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.75% a aproximadamente 2.5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 2% (p/p). En ciertas realizaciones, el espesante es o comprende Carbopol® y está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% (p/p), preferiblemente en una cantidad de 0.2% a aproximadamente 7.5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.75% a aproximadamente 2.5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.75% a aproximadamente 1.5% (p/p). En realizaciones alternativas, el Carbopol® está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1% (p/p). En ciertas realizaciones, el espesante es o comprende poloxámero 188 y está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 30% (p/p), preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 15% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 10% (p/p). En ciertas realizaciones, el espesante es o comprende poloxámero 407 y está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 30% (p/p), preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 25% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10% a aproximadamente 20% (p/p).

En ciertas realizaciones, el espesante es o comprende CMC y está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% (p/p), preferiblemente en una cantidad de 0.2% a aproximadamente 7.5%

(p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 0.75% a aproximadamente 2.5% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 2% (p/p) o aproximadamente 1.5% (p/p).

Opcionalmente, la composición farmacéutica (que es opcionalmente un hidrogel) comprende un conservante. En realizaciones particulares, la composición comprende un conservante en una cantidad de 0.5% a 20% (p/p), preferiblemente en una cantidad de 1% a aproximadamente 10% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 3% (p/p). El conservante exacto no está limitado particularmente para la invención y puede por lo tanto ser seleccionado del grupo que consiste de: lisozima, nisina, conservantes de amonio cuaternario, parabenos, fenoxietanol, alcohol bencílico, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, conservantes naturales y cualquier combinación de los mismos. Un conservante preferido en el contexto de la invención es el alcohol bencílico.

Opcionalmente, la composición farmacéutica (que puede ser un hidrogel) comprende un emoliente. El término "emoliente" como se usa a lo largo de la presente divulgación se refiere a un material útil para prevenir y/o tratar una sequedad de la piel, así como proporcionar una protección extra de la piel. El emoliente particular no está particularmente limitado para la invención y puede por lo tanto seleccionarse del grupo que consiste de: glicerol, alcoholes acetílicos, alcohol estearílico, ácido esteárico, palmitato de isopropilo, escualeno, lanolina, glicerina, vaselina, petróleo y cualquier combinación de los mismos. Un emoliente particularmente preferido en el contexto de la presente invención es glicerol. El emoliente puede estar presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 30% (p/p),

preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 25%, más preferiblemente en una cantidad de 7.5% a aproximadamente 20% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 8% a aproximadamente 12% (p/p). En otras realizaciones, el emoliente puede ser glicerol que está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 2.5% a aproximadamente 30% (p/p), preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 25% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de 7.5% a aproximadamente 20% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 8% a aproximadamente 12% (p/p), más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente 10% (p/p).

Como se describe en detalle a lo largo de la presente divulgación, cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede comprender una cierta cantidad de componentes (es decir, agentes farmacéuticamente activos y/o excipientes) además del componente de estetrol. En cualquiera de las realizaciones de la invención, se puede añadir un disolvente para alcanzar ciertas concentraciones de dichos componentes. En otras realizaciones, se utiliza una solución acuosa para complementar la composición. El término "solución acuosa" se refiere a cualquier solución que comprenda agua o en la que el disolvente sea agua. Adicionalmente, la "solución acuosa" se utiliza para describir soluciones que presentan características comunes con el agua o las soluciones acuosas, sin limitarse a características como apariencia, olor, color, sabor, viscosidad, pH, absorbancia o estado físico a temperaturas específicas. En estas realizaciones, la solución acuosa puede ser agua. En otras realizaciones alternativas, se utiliza una solución no acuosa para complementar la composición. En otras realizaciones alternativas, se utiliza una mezcla de una solución no acuosa y una solución acuosa para complementar la composición.

Como se define en este documento, el pH de una composición, solución, o formulación puede medirse utilizando varios métodos conocidos por un experto en la técnica. Se puede utilizar indicadores de pH que se decoloran por la absorción o liberación de iones H^+ , donde su color resultante es indicativo de un determinado valor de pH. Alternativamente, puede utilizarse los metros de pH que miden la diferencia en la potencia eléctrica entre un electrodo de pH y un electrodo de referencia. La diferencia en la potencia eléctrica está relacionada a la acidez o pH de la solución.

Considerando lo anterior, una composición farmacéutica ejemplar de acuerdo a la invención comprende además del componente de estetrol en cualquiera de las concentraciones enumeradas en este documento:

- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 60% (p/p) de un potenciador de la permeabilidad;
- de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 20% (p/p) de un espesante;
- opcionalmente un conservante y/o un emoliente;
- agua hasta 100% (p/p).

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica consiste esencialmente de, o consiste de un potenciador de la permeabilidad, un espesante, un conservante, y un emoliente (además del componente de estetrol). En realizaciones preferidas, la composición de acuerdo a la invención comprende además del componente de estetrol:

- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10% (p/p) de una molécula potenciadora de la permeabilidad, preferiblemente de aproximadamente 0.25% a aproximadamente 8% (p/p) de una molécula potenciadora de la permeabilidad;

- de aproximadamente 10% a aproximadamente 60% (p/p) de un disolvente potenciador de la permeabilidad;
- de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 20% (p/p) de un espesante, preferiblemente de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 10% (p/p) de un espesante, más preferiblemente de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 5% (p/p) de un espesante, más preferiblemente de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 3% (p/p) de un espesante;
- opcionalmente un conservante y/o un emoliente;
- agua hasta 100% (p/p).

En otras realizaciones preferidas adicionales, la composición farmacéutica según la invención comprende, además del componente de estetrol en cualquiera de las concentraciones enumeradas en este documento:

- de aproximadamente 1% a aproximadamente 7.5% (p/p) de una molécula potenciadora de la permeabilidad, preferiblemente de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5% (p/p) de la molécula potenciadora de la permeabilidad;
- de aproximadamente 15% a aproximadamente 45% (p/p) de un disolvente potenciador de la permeabilidad;
- de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 20% (p/p) de un espesante, preferiblemente de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 10% (p/p) de un espesante, más preferiblemente de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 5% (p/p) de un espesante, más preferiblemente de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 3% (p/p) de un espesante;
- opcionalmente un conservante y/o un emoliente;
- agua hasta 100% (p/p).

En una realización particular, la composición farmacéutica (opcionalmente un hidrogel) comprende, consiste esencialmente de, o consiste de, además del componente de estetrol en cualquiera de las concentraciones listados en el presente documento:

- de aproximadamente 8% a aproximadamente 40%, preferiblemente de aproximadamente 16% a aproximadamente 20%, más preferiblemente aproximadamente 18% (p/p) de PEG400;
- de aproximadamente 9% a aproximadamente 44%, preferiblemente de aproximadamente 18% a aproximadamente 22%, más preferiblemente aproximadamente 20% (p/p) de PG;
- de aproximadamente 4% a aproximadamente 24%, preferiblemente de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%, más preferiblemente aproximadamente 10% (p/p) de glicerol;
- de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 4%, preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 2%, más preferiblemente aproximadamente 1.5% (p/p) de HEC; y
- de aproximadamente 0.75% a aproximadamente 1.25%, preferiblemente de aproximadamente 1.5% a aproximadamente 2.5%, más preferiblemente aproximadamente 2% (p/p) de alcohol bencílico.

En una realización particular, la composición farmacéutica (opcionalmente un hidrogel) comprende, consiste esencialmente de, o consiste de, además del componente de estetrol en cualquiera de las concentraciones listadas en este documento:

- de aproximadamente 9% a aproximadamente 44%, preferiblemente de aproximadamente 18 a aproximadamente 22%, más preferiblemente aproximadamente 20% (p/p) de PEG400;

- de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 2%, preferiblemente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%, más preferiblemente aproximadamente 0.5% (p/p) de Carbopol®; y
- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 15%, 2% a aproximadamente 12%, preferiblemente de aproximadamente 4% a aproximadamente 6%, más preferiblemente aproximadamente 5% (p/p) de Transcutol®.

En una realización particular, la composición farmacéutica (opcionalmente un hidrogel) comprende, consiste esencialmente de, o consiste de, además del componente de estetrol en cualquiera de las concentraciones listadas en el presente documento:

- de aproximadamente 10% a aproximadamente 55%, preferiblemente de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, más preferiblemente de aproximadamente 40% a 45% (p/p) de PEG400;
- de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 2%, preferiblemente de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%, más preferiblemente aproximadamente 0.5% (p/p) de Carbopol®; y
- de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 15%, 0.2% a aproximadamente 10%, preferiblemente de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5%, más preferiblemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 2.5% (p/p) de Transcutol®.

La composición farmacéutica descrita en este documento, tal como, pero no limitada al hidrogel descrito en este documento está destinada a usarse como medicamento, tanto en el contexto terapéutico como profiláctico. Más concretamente, la composición descrita en este documento, tal como, pero no limitado al hidrogel descrito en este documento, está destinada a su uso

médico en la cicatrización de heridas. Dicho de otro modo, la invención se refiere al uso de una composición como un hidrogel, como se describe en este documento, para la fabricación de un medicamento para la cicatrización de heridas, preferiblemente para la cicatrización tópica de heridas. Dicho aún de otra manera, la presente invención se refiere a métodos para el tratamiento de heridas, preferiblemente a métodos de tratamiento tópico de heridas, que comprenden la administración de cualquiera de las composiciones o hidrogeles descritos en este documento a una herida (zona) de un sujeto. En el contexto de la presente invención, la composición como el hidrogel descrito en este documento, se utiliza como formulación tópica, es decir, un medio de tratamiento local para heridas que se aplica en la zona afectada.

Tal como se utiliza a lo largo de la presente divulgación, los términos "terapia" o "tratamiento" se refieren al alivio o la disminución medible de uno o más síntomas o marcadores medibles de una condición patológica, en el contexto de la presente invención, una o más heridas. Los términos abarcan tanto el tratamiento terapéutico de una herida ya desarrollada (es decir, una herida establecida), como las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo del tratamiento es prevenir la aparición y/o reaparición, el desarrollo y la progresión de heridas en un sujeto, es decir, en la piel de un sujeto. A modo de ilustración y limitación, un uso preventivo de la composición farmacéutica descrita en este documento puede ser la administración en una zona de la piel que parezca frágil en un sujeto de edad avanzada para prevenir las úlceras de decúbito. Un ejemplo alternativo puede ser la aplicación en una zona de la piel de un sujeto que se convertirá en un sitio de inserción quirúrgica en un futuro previsible. La disminución medible incluye cualquier disminución estadísticamente significativa en un marcador de inflamación medible, el área de la herida, y/o

la profundidad de la herida y/o el ancho de la herida. El término estadísticamente significativo, tal como se utiliza en este documento, se refiere a valores p inferiores a 0.05, que es un punto de corte comúnmente aceptado en el análisis estadístico, como lo apreciará un experto. Más adelante se describen con más detalle las indicaciones más específicas de la cicatrización de una herida. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados del uso médico (es decir, el tratamiento) pueden incluir, sin limitación, el alivio del dolor y/o la incomodidad, la mejora de uno o más marcadores biológicos, la disminución de la extensión de la herida, la estabilización (es decir, que no empeore) del estado de la herida, la aceleración de la progresión de la cicatrización de la herida, la mejora de la calidad de vida del paciente y similares.

Un experto es consciente de que, a fin de lograr un tratamiento terapéutico efectivo, se necesita administrar una dosis efectiva terapéuticamente a dicho sujeto. Por lo tanto, en el contexto de la presente divulgación "una cantidad efectiva" se refiere a una cantidad necesaria para obtener un efecto fisiológico. Puede lograrse el efecto fisiológico por una única dosis o por múltiples dosis. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "dosis terapéuticamente efectiva" indica una cantidad de componente de estetrol que, cuando se administra, produce una respuesta clínica positiva con respecto al tratamiento de un sujeto afectado por una o más heridas. De manera similar, una "cantidad profilácticamente efectiva" o "dosis profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad del componente de estetrol que inhibe o retrasa el comienzo de la herida o la progresión de la herida. Un experto es consciente de que los términos "cantidad", "número" y "nivel" son sinónimos y tiene un significado bien definido en la técnica y entiende que estos en el contexto de la presente solicitud se refieren a una cuantificación relativa de una parte del componente de

estetrol de una composición farmacéutica tal como, pero no limitada a un hidrogel, o cuando se indica se refiere a una cuantificación absoluta de un componente de estetrol que se considera una cantidad efectiva para las aplicaciones descritas en este documento tras su aplicación en la piel de un sujeto.

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas e hidrogeles descritos en este documento son para su uso en el tratamiento de heridas agudas. La causa de la herida aguda no está particularmente limitada para la invención, y por lo tanto incluye las heridas causadas por lesiones y heridas inducidas quirúrgicamente. La causa de la lesión no se limita para la invención y por lo tanto abarca tanto lesiones accidentales como lesiones ocasionadas por malas intenciones (es decir, lesiones de combate). Los ejemplos no limitantes de heridas agudas incluyen abrasiones (es decir, piel raspada o frotada), incisiones (es decir, heridas de corte limpio), laceraciones (es decir, heridas desgarradas y/o irregulares), punciones (es decir, heridas que tienen una abertura relativamente pequeña producida por un objeto con una punta relativamente estrecha) y avulsiones (herida de piel tirada o desgarrada).

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas e hidrogeles descritos en este documento se usan para el tratamiento de heridas por quemadura. Un experto comprende que una "herida por quemadura" se refiere a un tipo particular de lesión tisular causada por contacto con calor, flama, químicos, electricidad, o radiación. Las quemaduras de primer grado se caracterizan principalmente por enrojecimiento; las quemaduras de segundo grado se caracterizan por la presencia de uno o más puntos con ampollas (es decir, la vesicación); las quemaduras de tercer grado se caracterizan por la presencia de necrosis. Las quemaduras de primer y segundo grado se refieren comúnmente en la técnica como quemaduras de espesor parcial (es decir, destrucción de tejido a través de la epidermis que se extiende

hasta la dermis, pero no a través de ella), mientras que las quemaduras de tercer grado se denominan comúnmente quemaduras de espesor total (es decir, destrucción caracterizada por una extensión completa a través de la dermis).

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas e hidrogeles descritos en este documento se usan para el tratamiento de heridas crónicas. Las "heridas crónicas" como se mencionan en este documento se refieren a cualquier herida que no logra, o no ha logrado, pasar por un proceso estándar de cicatrización de heridas. De esta manera, las heridas pueden ser categorizadas clínicamente como agudas o crónicas, según su tiempo de cicatrización. Particularmente, las heridas quirúrgicas pueden convertirse en heridas crónicas y se mencionan como heridas quirúrgicas que no cicatrizan por segunda intención. El término "heridas crónicas" puede usarse indistintamente con términos sinónimos como, pero no limitado a "herida ardua de cicatrizar", "herida difícil de cicatrizar", "herida que no cicatriza" y "herida compleja". Las heridas crónicas se han caracterizado en detalle en la técnica (es decir, en Vanwijck, Bull Mem Acad R Med Belg, 2001). El proceso de cicatrización en heridas crónicas puede verse alterado por diversos factores que prolongan una o más etapas de las fases de cicatrización de heridas. Ejemplos no limitados incluyen, entre otros, infección, hipoxia tisular, necrosis, exudado y niveles excesivos de citocinas inflamatorias. Las características comúnmente observadas de las heridas crónicas incluyen una fase inflamatoria prolongada o incontrolada, infecciones persistentes, formación de biopelículas microbianas resistentes a los fármacos y la incapacidad de las células dérmicas y/o epidérmicas para responder a los estímulos reparadores.

El término "inflamación", tal como se utiliza en este documento, se refiere en general al proceso fisiológico mediante el cual los tejidos vascularizados responden a una lesión. De igual

manera, el término "procesos inflamatorios" se refiere a un proceso en el que mediadores inflamatorios solubles cooperan con componentes celulares para confinar y eliminar cualquier agente causante de malestar. El término "mediadores inflamatorios" se refiere en general a cualquier mediador molecular del proceso inflamatorio. Los mediadores inflamatorios son capaces de actuar tanto en localmente en el sitio del daño tisular y/o infección, como en sitios más distantes. Ciertos mediadores inflamatorios son activados por el proceso inflamatorio, mientras que otros mediadores inflamatorios se producen o liberan de fuentes celulares tras una respuesta a la inflamación o tras la activación por otros mediadores inflamatorios. Ejemplos de mediadores inflamatorios de la respuesta inflamatoria incluye, pero no se limitan a proteasas de plasma, complemento, cinina, proteínas de la coagulación, proteínas fibrinolíticas, mediadores lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas, péptidos, aminas y citocinas proinflamatorias.

Los términos como "inflamación de la piel" o "inflamación cutánea" utilizados en este documento deben interpretarse según el significado comúnmente aceptado en el estado de la técnica y, por lo tanto, indican cualquier respuesta inmunitaria local de la piel. La causa de la inflamación cutánea suele ser la aparición de una lesión, como una herida. La inflamación cutánea puede considerarse por lo tanto el resultado de las interacciones celulares en la piel de un sujeto, con células inmunes siguen siendo el tipo celular más importante. La inflamación cutánea mencionada en este documento indica la inflamación "estándar" observada en una herida, pero también indica una inflamación excesiva que excede los límites normales de inflamación, y puede ser la consecuencia de una infección bacteriana o fúngica en el sitio de la herida, o una respuesta defectuosa del huésped (es decir, como en la diabetes). Ejemplos

no limitativos de bacterias que pueden estar involucradas en la infección de heridas incluyen, sin limitación, *Staphylococcus aureus*, Coagulase-negative staphylococci, *Corynebacteria*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter cloacae*, Enterococci, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella oxytoca*, *Kocuria kristinae* y *Pseudomonas stutzeri*. Ejemplos no limitativos de hongos que pueden estar involucrados en la infección de heridas incluyen, sin limitación, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Aspergillus niger*.

Una bacteria de interés particular en el contexto de la presente invención es la *Klebsiella pneumoniae*, que se sabe que actúa como un patógeno de heridas en lugares de heridas infectadas, tal como, pero no limitadas a heridas agudas (incluidas heridas quirúrgicas, de lesiones y de combate), quemaduras y úlceras crónicas en la pierna (Crompton y otros, Lab Invest, 2016). En la técnica, la *Klebsiella pneumoniae* ha sido asociada con una reducción de la re-epitelialización, un aumento de la proliferación, una respuesta inflamatoria elevada y una alteración de la deposición de la matriz de la herida. Los inventores han descubierto que la composición tópica descrita en este documento es especialmente adecuada para reducir la inflamación en una herida infectada por *Klebsiella pneumoniae*, y en heridas con riesgo de infección por *Klebsiella pneumoniae*.

Ejemplos no limitativos de heridas crónicas incluyen úlceras vasculares, úlceras de presión, y úlceras diabéticas. Las úlceras vasculares abarcan úlceras arteriales y venosas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la herida crónica es una herida seleccionada del grupo que consiste de: úlceras arteriales, úlceras venosas, úlceras por presión, úlceras diabéticas y

combinaciones de las mismas. El término "úlceras venosas", tal como se utiliza en este documento, se debe a un aumento de la presión venosa ocasionada por deficiencias valvulares venosas. Los cambios en la permeabilidad de la pared de los vasos sanguíneos, inducidos por la presión, provocan la fuga de fibrina y otros componentes plasmáticos hacia la zona perivascular, teniendo dicha acumulación de fibrina un efecto negativo en la cicatrización de heridas. La síntesis de colágeno es regulada a la baja por la fibrina, lo que resulta en la formación de un manguito de fibrina pericapilar que crea una barrera para la función vascular normal y restringe los factores de crecimiento derivados de la sangre. El término "úlceras arteriales" se refiere a heridas crónicas resultantes de una insuficiencia arterial, que puede ser ocasionada por aterosclerosis o embolia, lo que provoca un estrechamiento de la luz arterial e isquemia, impidiendo la cicatrización oportuna de lesiones menores. Las "úlceras por presión" se desarrollan como resultado de la presión prolongada no aliviada y de la fuerza de cizallamiento aplicada a la piel y al tejido muscular subyacente, lo que provoca una disminución de la tensión de oxígeno, lesiones por isquemia de reperfusión y necrosis tisular. Finalmente, las "úlceras diabéticas" surgen como una consecuencia del envejecimiento y la diabetes. La diabetes puede adicionalmente agravar las patologías vasculares, que a su vez pueden agravar las insuficiencias arteriales, las insuficiencias venosas, y/o úlceras por presión. Otras anomalías que conducen al desarrollo de úlceras diabéticas en pacientes diabéticos incluyen neuropatía (a menudo vinculada a deterioro vascular), deficiencias del metabolismo muscular y ciertas patologías microvasculares ocasionadas por hiperglucemia. Las patologías macroscópicas observadas en heridas crónicas, particularmente diabéticas, generalmente incluyen anomalías fenotípicas celulares, tal como, pero no limitadas a bajo mitogénico, bajo

potencial motogénico y una incapacidad para responder a factores ambientales.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica (que puede ser un hidrogel) descrita en este documento se utiliza en la cicatrización de heridas de sujetos que se caracterizan por una cicatrización deficiente de herida. La cicatrización deficiente de herida puede surgir debido a una patología subyacente como se describe a lo largo de la presente divulgación y/o una infección de la herida. La infección es una consecuencia común de la cicatrización retardada de la herida. Las bacterias vivas (y las toxinas bacterianas resultantes) inducen respuestas inflamatorias excesivas y daño tisular. Las posibles consecuencias de las infecciones bacterianas de las heridas incluyen la aparición de abscesos, celulitis, osteomielitis o pérdida de extremidades (es decir, en pacientes diabéticos). Además, las células inflamatorias reclutadas en el lugar de la herida tras su infección producen proteasas capaces de degradar la matriz extracelular y los factores de crecimiento presentes en el lugar de la herida. Una parte considerable de bacterias que colonizan la herida son capaces de formar biopelículas, lo que a su vez aumenta la supervivencia bacteriana y la producción aumentada de factores de virulencia. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el sujeto se caracteriza por una herida que comprende una biopelícula.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se utiliza para tratar heridas de sujetos que son considerados en riesgo de desarrollar heridas crónicas, o de haber desarrollado al menos una herida crónica en un momento anterior en el tiempo.

En realizaciones en donde el sujeto se caracteriza por la cicatrización deficiente de herida, dicha cicatrización deficiente de herida ocurre al menos aproximadamente 10% más lento, preferiblemente al menos 20% más lento, preferiblemente

al menos aproximadamente 30% más lento, preferiblemente al menos aproximadamente 40% más lento, preferiblemente al menos 50% más lento, preferiblemente al menos 60% más lento, preferiblemente al menos 70% más lento, preferiblemente al menos 80% más lento, preferiblemente al menos 90% más lento, cuando se compara en una cicatrización de herida en un sujeto que no se considera o se sospecha que tenga una cicatrización deficiente de herida (es decir, un sujeto que se considera saludable o generalmente saludable).

La manifestación particular de la cicatrización deficiente de herida y la causa de la misma no está limitada particularmente para la invención. Por lo tanto, en ciertas realizaciones una fase de cicatrización de herida puede ser deficiente en el sujeto seleccionado del grupo de fases de reparación de herida que consiste de: hemostasia (coagulación de la sangre), inflamación, proliferación (crecimiento de tejido nuevo) y maduración (remodelación tisular), o cualquier combinación de las mismas. El proceso de la cicatrización deficiente de herida puede caracterizarse adicionalmente por la ocurrencia de infecciones, hipoxia, tejido necrótico, exudado (filtración de células y fluido de una herida), niveles excesivos de citoquinas inflamatorias, y cualquier combinación de las mismas.

Opcionalmente, el sujeto se caracteriza por una cicatrización deficiente de herida debido a la coagulación de sangre deficiente o ausente. Inmediatamente luego de una lesión en sujetos saludables, las plaquetas se adhieren a los vasos sanguíneos dañados, inician una reacción de liberación y una reacción hemostática. Esto produce una cascada de coagulación sanguínea que evita el sangrado excesivo y proporciona protección provisional para el área herida. Las plaquetas sanguíneas se han descrito para liberar numerosos factores de crecimiento, citoquinas, y otro superviviente o agentes inductores de apoptosis. Los componentes cruciales de la

reacción de liberación de plaquetas incluyen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés) y los factores de crecimiento transformantes Al y 2 (TGF- Al y TGF- 2), que atraerán células inflamatorias (es decir, leucocitos, neutrófilos y macrófagos).

Opcionalmente, el sujeto se caracteriza por una cicatrización deficiente de herida debido a una fase inflamatoria de cicatrización deficiente de herida. En sujetos saludables, la fase inflamatoria se inicia en respuesta al daño capilar, lo que conduce a la formación de una matriz provisional de coágulo sanguíneo que comprende, entre otros componentes, fibrina y fibronectina. Dicha matriz provisional rellena el área de la herida y desencadena la afluencia de células efectoras. Las plaquetas presentes en el coágulo liberan múltiples citocinas que reclutan células inflamatorias (p. ej., neutrófilos, monocitos y macrófagos, entre otros), fibroblastos y células endoteliales.

Opcionalmente, el sujeto se caracteriza por una cicatrización deficiente de herida debido a una fase de proliferación defectiva. En sujetos saludables, la fase de proliferación se caracteriza por una angiogénesis activa, creando así nuevos capilares que permiten el aporte de nutrientes al lugar de la herida y favorecen la proliferación de fibroblastos. Estos fibroblastos sintetizan y depositan componentes de la matriz extracelular (ECM) que reemplazan la matriz provisional. Dichos fibroblastos se caracterizan además por propiedades contráctiles mediadas por la actina del músculo liso organizada en haces de microfilamentos o fibras de estrés.

Opcionalmente, el sujeto se caracteriza por una cicatrización deficiente de herida debido a una fase de remodelación deficiente. En sujetos saludables, la fase final de cicatrización implica la remodelación gradual del tejido de

granulación y la re-epitelialización. Las enzimas proteolíticas, como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y sus inhibidores (TIMPs, inhibidores tisulares de metaloproteinasas) desempeñan un papel clave en la fase de remodelación. Durante la re-epitelialización, la fibronectina y el colágeno tipo III, los principales componentes del tejido de granulación (es decir, el nuevo tejido del estroma), son sustituidos gradualmente por colágeno tipo I y complementados con elastina. La elastina contribuye a la elasticidad de la piel y está inicialmente ausente en el tejido de granulación. Finalmente, la densidad celular en la herida se normaliza mediante la apoptosis de las células vasculares y los fibroblastos.

La proliferación del borde de la herida forma parte del proceso de re-epitelialización de herida, el último que indica el proceso de recubrimiento (es decir, repavimentación, provisión) con nuevo epitelio. En las heridas de la piel, se ha documentado que la re-epitelialización progresa desde los márgenes circundantes de la herida (es decir, los bordes de la herida) hacia el centro de la herida. La re-epitelialización forma parte de la fase de proliferación y generalmente se inicia aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas después de la lesión por la activación de los queratinocitos debido al reclutamiento de neutrófilos, monocitos y macrófagos en el lugar de la herida, como se detalló anteriormente. Los queratinocitos activados se caracterizan por cambios en el citoesqueleto y los receptores de la superficie celular de las células. Además, los queratinocitos activados son hiperproliferativos y producen componentes de la unión dermoepidérmica. Por ejemplo, los queratinocitos activados producen metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9), que degrada la unión dermoepidérmica y permite a dichos queratinocitos su migración sobre la herida. La migración de queratinocitos es un evento temprano en la re-epitelialización de la herida. Un estudio posterior de los queratinocitos

activados en heridas permitió observar una lámina epitelial cohesiva móvil en el borde de la herida que migra hacia el centro de la herida. Se ha propuesto diferentes mecanismos para el proceso de migración de queratinocitos sobre el lecho de la herida, cada uno de ellos concebido y comprendido en el contexto de la presente invención.

Opcionalmente, la cicatrización deficiente de herida puede observarse y/o hacerse evidente mediante una menor migración del borde de la herida. El término "borde de la herida", en el presente documento, se refiere a la circunferencia exterior del área de la herida, es decir, la parte del área de la herida que es adyacente a la zona de tejido no lesionado de la piel de un sujeto. Un experto en la técnica es capaz de observar y/o medir el área de la herida y, en consecuencia, el borde de la herida. Dichas observaciones y/o mediciones pueden realizarse en múltiples momentos en el tiempo para determinar si la herida del sujeto cicatriza a un ritmo "normal" (es decir, un ritmo dentro de los límites de lo que se considera común en sujetos sanos) o si ocurre cualquier retraso en el inicio o una disminución en el ritmo de cicatrización. Opcionalmente, en ausencia de cualquier tratamiento, la cicatrización deficiente de herida en un sujeto con cicatrización deficiente de herida se manifiesta por una migración reducida del borde de la herida de al menos 25%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75%, o más preferiblemente al menos 100% en comparación con un sujeto saludable.

En realizaciones particulares, las composiciones e hidrogeles de los aspectos anteriores se utilizan para mejorar la re-epitelialización del lugar de la herida. En el presente contexto, la re-epitelialización mejorada puede referirse al proceso general de re-epitelialización, pero también a cierta mejora en un aspecto específico de la misma. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la mejora de la cicatrización de herida

tras el tratamiento con la composición descrita en este documento puede mejorar un proceso seleccionado del grupo que consiste de: mejora de la re-epitelialización del lugar de la herida, aumento de la proliferación de células en el lugar de la herida, reducción de la respuesta inflamatoria en o dentro del lugar de la herida, mejora de la deposición de matriz en los lugares de la herida, re-epitelialización mediada por folículos pilosos, re-epitelialización en heridas de espesor parcial de abajo a arriba, y cualquier combinación de los mismos.

La re-epitelialización mejorada puede caracterizarse por una producción aumentada y/o sujeta de matriz provisional. En estas realizaciones, la cantidad de matriz provisional producida puede aumentarse sobre por al menos 10%, preferiblemente al menos 25%, preferiblemente al menos 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 100%, y/o la producción de dicha matriz provisional puede sujetarse por al menos 10%, preferiblemente al menos aproximadamente 25%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 100%, en comparación con un sujeto no tratado con la composición (opcionalmente hidrogel) descrita en este documento.

Como alternativa o además de la producción aumentada y/o sujeta de matriz provisional, la re-epitelialización mejorada puede caracterizarse por una activación aumentada y/o sujeta (es decir, la proliferación) y/o la migración de queratinocitos. En estas realizaciones, la cantidad de queratinocitos activados puede aumentar en al menos aproximadamente 10%, preferiblemente al menos aproximadamente 25%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 100%, y/o la migración de queratinocitos puede aumentar en al menos aproximadamente 10%, preferiblemente al menos aproximadamente

25%, preferiblemente al menos aproximadamente 50%, preferiblemente al menos aproximadamente 75%, más preferiblemente al menos aproximadamente 100%, en comparación con un sujeto no tratado con la composición (opcionalmente hidrogel) descrita en este documento.

En realizaciones particulares, las composiciones e hidrogeles de los aspectos anteriores se utilizan para aumentar la proliferación de células el lugar de la herida de un sujeto. La proliferación de células puede incluir, sin limitaciones, la proliferación de células endoteliales, fibroblastos y/o queratinocitos. En ciertas realizaciones, la proliferación de células seleccionadas del grupo de células que consiste en células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos y cualquier combinación de los mismos aumenta en al menos 10%, preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, aún más preferiblemente en al menos 75%, más preferiblemente en al menos 100%, en comparación con la proliferación de células en el lugar de la herida en un sujeto no tratado con la composición descrita en este documento.

En realizaciones particulares, la composición descrita en este documento se utiliza para reducir la respuesta inflamatoria en el lugar de la herida de un sujeto. En dicha realización, la composición descrita en este documento se utiliza para reducir la cantidad de una o más moléculas pro-inflamatorias y/o aumentar la cantidad de una o más moléculas anti-inflamatorias en el lugar de la herida de un sujeto. Los ejemplos no limitantes de moléculas pro-inflamatorias contempladas en este documento incluyen, sin limitación, interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IF- γ), interleucina 12 (IL-12), histamina, serotonina, neuropéptidos, proteasas plasmáticas, complemento, cininas, proteínas de coagulación, proteínas fibrinolíticas, mediadores

lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas (PAF). En ciertas realizaciones, la composición (opcionalmente un hidrogel) como se describe en este documento se usa para reducir la cantidad de una o más moléculas pro-inflamatorias seleccionadas del grupo que consiste de interleucina-1 beta (IL1- β), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IF- γ), interleucina 12 (IL-12), histamina, serotonina, neuropéptidos, proteasas plasmáticas, complemento, cininas, proteínas de coagulación, proteínas fibrinolíticas, mediadores lipídicos, prostaglandinas, leucotrienos y factor activador de plaquetas (PAF) que se produce en el lugar de la herida en al menos 10%, preferiblemente en al menos 25%, más preferiblemente en al menos 50%, aún más preferiblemente en al menos 75%, más preferiblemente en aproximadamente 100% en comparación con el nivel de dicha o más moléculas pro-inflamatorias presentes en el lugar de la herida de un sujeto que no es tratado con la composición descrita en este documento. Preferiblemente, el uso o tratamiento médico produce una mejora en el perfil de macrófagos y neutrófilos, lo que indica una menor inflamación local de la herida en comparación con las heridas no tratadas. En una realización particular, el tratamiento según la invención disminuye el número de células inflamatorias tales como, pero no limitadas a macrófagos y neutrófilos en la herida. Por lo tanto, en realizaciones particulares, la administración tópica de las composiciones según la invención promueve un fenotipo pro-resolución de la herida, con una menor expresión del marcador M1 y un aumento de la expresión del marcador M2. En algunas realizaciones, el número de células inmunitarias, tanto innatas como adquiridas, se reduce tras la administración de las composiciones de la invención. Típicamente, en otras realizaciones, se puede observar efectos beneficiosos sobre la función de otras células inmunitarias, como las células

dendríticas, las células de Langerhans y los mastocitos, cuando se administran las composiciones descritas en este documento.

En realizaciones preferidas, el uso de la composición (p. ej., un hidrogel) que comprende el componente de estetrol da lugar a mejora de los parámetros histológicos de cicatrización en comparación con heridas no tratadas con ninguna composición de cicatrización de herida. Más preferiblemente, el uso de la composición que comprende el componente de estetrol da lugar a la mejora de los parámetros histológicos de cicatrización en comparación con heridas no tratadas con una composición de cicatrización de heridas que no comprenda el componente de estetrol. Opcionalmente, los parámetros histológicos de cicatrización sin un parámetro histológico cutáneo seleccionado del grupo que consiste de: cierre epidérmico, diferenciación epidérmica, migración epidérmica, formación de tejido de granulación e hiperplasia epidérmica, formación de tejido de granulación y matriz, inflamación, y remodelación de la matriz en fase tardía, los cuales pueden evaluarse histológicamente respectivamente mediante la presencia de epidermis recientemente formada, marcadores de diferenciación epidérmica espinosa y/o granular, células migratorias, células proliferantes, deposición de fibras de colágeno, marcadores de células inmunitarias, niveles de proteasas en la herida y composición de la matriz. Cada uno de estos parámetros se ha descrito en detalle en la técnica (p. ej., en Gupta y Kumar, *Plast Aesthet Res*, 2015). Los parámetros histológicos alternativos que pueden derivarse de una o más observaciones incluyen, pero no se limitan a la longitud de la zona de re-epitelialización, la distancia entre los bordes de la herida, la profundidad de la herida, el ancho de la herida, el espesor del tejido conectivo y el espesor de la dermis natural en los bordes de la herida, la orientación de la matriz dérmica, la celularidad de la herida y la vascularización de la herida.

En realizaciones preferidas, la composición descrita en este documento puede utilizarse para mejorar la incidencia del cierre completo de heridas en un sujeto, que opcionalmente es un sujeto que se caracteriza por una cicatrización deficiente de herida. El cierre completo de la herida indica que la superficie de la piel está completamente cerrada, es decir, completamente recubierta con epitelio nuevo. En dichas realizaciones, la incidencia del cierre completo de herida mediante el uso de la composición que comprende un componente de estetrol aumenta en al menos 25%, preferiblemente en al menos 50%, más preferiblemente en al menos 75%, más preferiblemente en al menos 100% en comparación con heridas no tratadas con la composición o basada en la historia de cicatrización de herida del sujeto.

En realizaciones preferidas, la composición descrita en este documento puede utilizarse para acelerar el tiempo de logro de cierre de una herida en un sujeto, que opcionalmente en un sujeto que se caracteriza por una cicatrización deficiente de herida. En dichas realizaciones, el tiempo para lograr el cierre de una herida en un sujeto se reduce en al menos 25%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente más del 80%, en comparación con heridas no tratadas con la composición, o según el historial de cicatrización de herida del sujeto. Un experto comprenderá que ciertos parámetros descritos en detalle a lo largo de la presente divulgación, tal como, pero no limitados a cierto tiempo necesario para lograr el cierre completo de la herida, dependen, entre otros factores, del tamaño de la herida.

En realizaciones preferidas, la composición descrita en este documento puede utilizarse para facilitar el cierre de heridas quirúrgicas en un sujeto que, opcionalmente es un sujeto que se caracteriza por una cicatrización deficiente de herida. En dichas realizaciones, la composición descrita en este documento puede aumentar la velocidad del cierre de heridas quirúrgicas

y/o aumentar la probabilidad de que un sujeto logre el cierre de herida con un área y/o profundidad superior del área y/o profundidad de heridas que podrían cicatrizar en dicho sujeto sin el uso de la composición que comprende el componente de estetrol. En algunas realizaciones, se mejora la calidad de la cicatrización, especialmente en una herida infectada.

Los términos "formulación" y "composición" pueden usarse indistintamente en el presente documento. En cualquiera de las realizaciones relativas a las composiciones descritas en el presente documento, es evidente que dichas composiciones pueden comprender uno o más portadores farmacéutica o cosméticamente aceptables (es decir, excipientes) que no se describen en detalle a lo largo de la presente divulgación. El término "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, es consistente con la técnica y significa compatible con los demás ingredientes de una composición farmacéutica o cosmética y no perjudicial para el receptor de la misma. En una realización particularmente preferida de la invención, la composición (farmacéutica) según la invención está diseñada para administración diaria, es decir, representa una unidad de dosificación diaria. Los excipientes que pueden usarse en la composición farmacéutica no están particularmente limitados y, por lo tanto, pueden ser uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste de: excipientes de un ingrediente farmacéutico activo, excipientes aglutinantes, excipientes portadores, excipientes coprocesados, excipientes del sistema de recubrimiento, excipientes de liberación controlada, excipientes diluyentes, excipientes desintegrantes, excipientes de inhalación de polvo seco, excipientes del sistema efervescente, excipientes emulsionantes, excipientes lipídicos, excipientes lubricantes, excipientes de liberación modificada, excipientes potenciadores de la penetración, excipientes potenciadores de la permeabilidad, excipientes modificadores del

pH, excipientes plastificantes, excipientes conservantes, excipientes solubilizantes, excipientes disolventes, excipientes de liberación sostenida, excipientes edulcorantes, excipientes saborizantes, excipientes espesantes, excipientes modificadores de la viscosidad, excipientes de relleno, excipientes de compactación, excipientes de granulación en seco, excipientes de extrusión de termofusible, excipientes de granulación húmeda, excipientes de agente de liberación rápida, excipientes de biodisponibilidad aumentada, excipientes de dispersión, excipientes que mejoran la solubilidad, excipientes estabilizadores, excipientes para el llenado de cápsulas, o cualquier combinación de los mismos. Un experto sabe que el uso de dichos medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es una práctica común, por lo que la incorporación de estos excipientes es bien conocida en la técnica. Es evidente que todos los ingredientes utilizados deben ser atóxicos en la concentración contenida en la composición farmacéutica final y no deben interferir negativamente con la actividad del componente de estetrol, dicho componente de estetrol preferiblemente está presente en la composición farmacéutica como ingrediente predominante farmacéuticamente activo. En ciertas realizaciones, se añade a la composición farmacéutica más de un excipiente que un experto clasificaría como perteneciente al mismo grupo de excipientes. En otras realizaciones, se añade a la composición farmacéutica más de un excipiente, perteneciendo cada uno a un grupo diferente. En ciertas realizaciones, los excipientes pueden cumplir más de una función y/o ser clasificados por un experto como pertenecientes a diferentes grupos o clases de excipientes.

Como se indicó anteriormente, los detalles del sujeto afectado por una herida no son particularmente limitantes en el contexto de la presente invención. Los sujetos preferidos son los ancianos. "Anciano" se refiere a un sujeto de edad avanzada, es

decir, la edad cercana o superior a la esperanza de vida de un sujeto. Un anciano se define por una edad de al menos 60 años, preferiblemente al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, y más preferiblemente al menos 85 años. En realizaciones alternativas, el sujeto se selecciona del grupo que consiste de: bebés (es decir, sujetos jóvenes), adolescentes y adultos. En ciertas realizaciones descritas en este documento, el sujeto se diagnostica o se considera en estado paliativo.

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente invención (que opcionalmente pueden ser hidrogeles) pueden comprender otros componentes activos para la piel capaces de proporcionar un beneficio para el cuidado de la piel. Este beneficio del cuidado de la piel puede incluir, pero no se limita a beneficios relacionados con la apariencia cosmética de la piel. El componente adicional activo para la piel puede proporcionar un beneficio inmediato y de corta duración (es decir, agudo), y/o un beneficio a largo plazo y duradero (es decir, crónico).

Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente invención (que opcionalmente pueden ser hidrogeles) pueden comprender al menos un ingrediente adicional farmacéuticamente activo, además del componente de estetrol. En realizaciones particulares, el al menos un ingrediente adicional farmacéuticamente activo se selecciona del grupo que consiste de: agentes anti-inflamatorios, agentes analgésicos y agentes anti-infecciosos. El ingrediente anti-inflamatorio puede ser un ingrediente anti-inflamatorio esteroideo, un ingrediente anti-inflamatorio no esteroideo o una combinación de estos. El ingrediente analgésico (es decir, un ingrediente capaz de inducir alivio del dolor) puede ser un analgésico no opioide o un analgésico opioide. Los agentes anti-infecciosos adecuados incluyen, pero no se limitan a antibióticos.

En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente invención (que opcionalmente pueden ser hidrogeles) se utilizan para la cicatrización de heridas en un contexto de injertos de piel. En dichas realizaciones, las composiciones descritas en este documento pueden combinarse con técnicas de trasplante de piel, tal como, pero no se limitan a las que se basan en terapia con células madre, piel de bioingeniería, equivalentes de piel, sustitutos de piel, piel sintética o combinaciones de las mismas. En realizaciones particulares, las composiciones, tal como se utilizan en este documento, se utilizan para la cicatrización de heridas después de un trasplante de piel considerado necesario debido a lesiones extensas en un área considerable de la piel de un sujeto, tal como, pero no limitada al trasplante de piel en un contexto de heridas por quemaduras. También se contempla en este documento la cicatrización de heridas de una zona donante de injerto de piel.

La composición farmacéutica (que opcionalmente es un hidrogel), como se describe en este documento, se administra (es decir, se aplica) en el lugar de la herida. La composición puede aplicarse mediante vertido, goteo, pulverización, frotamiento o cualquier otro medio adecuado. Opcionalmente, la composición se administra una sola vez en el lugar de la herida. Alternativamente, la composición se administra en múltiples momentos en el tiempo en el lugar de la herida, preferiblemente en puntos de tiempo sustancialmente intercalados con regularidad. En ciertas realizaciones, la composición se administra diariamente en el lugar de la herida. Opcionalmente, la composición se administra y se mantiene (es decir, no se retira del lugar de la herida) durante un período de tiempo prolongado correspondiente a al menos 30 minutos, preferiblemente al menos 1 hora, y más preferiblemente al menos 2 horas, más preferiblemente al menos 4 horas, más preferiblemente al menos 8 horas, más

preferiblemente al menos 1 día, más preferiblemente al menos 1 semana, más preferiblemente al menos 1 mes. En estas realizaciones, se entiende que la herida está expuesta continuamente a la composición durante el tiempo indicado.

Los términos "continuo"/"continuamente", tal como se utilizan en este documento, significan que los componentes se administran a intervalos relativamente regulares, sin interrupciones (terapéuticamente) significativas. Naturalmente, pueden producirse pequeñas interrupciones que no afecten la eficacia general del presente método, de hecho, estas anomalías están contempladas en la presente invención.

La composición farmacéutica (que opcionalmente es un hidrogel), como se describe en este documento, puede formar parte, es decir, estar comprendida en cualquier medio adecuado para su aplicación en la piel y/o lugar de la herida de un sujeto, preferiblemente sobre o cerca del lugar de la herida para administrar un ingrediente farmacéuticamente activo a la piel (y/o al lugar de la herida). Alternativamente, la composición, como se describe en este documento, puede aplicarse a cualquier medio adecuado para su aplicación en la piel y/o lugar de la herida de un sujeto por dicho sujeto, otro sujeto o un profesional médico experto antes de su aplicación de la composición a la piel o lugar de la herida del sujeto (es decir, la composición se utiliza junto con el medio de aplicación a la piel).

Preferiblemente, la composición farmacéutica se aplica a la piel del sujeto mediante un apósito. Se han descrito numerosos tipos de apósitos en la técnica e incluye, sin limitación, apósitos de gasa, apósitos de tul, apósitos de alginato, apósitos de poliuretano, apósitos de película, apósitos de pasta de polisacáridos, apósitos granulados, apósitos de espuma, apósitos de silicona, apósitos de armazón de polímero sintético, apósitos hidrocoloides, apósitos oclusivos o combinaciones de estos. El

apósito puede ser adhesivo o no adhesivo. El término "apósito oclusivo", tal como se utiliza en este documento, se refiere a un apósito que impide el contacto con el aire y/o las bacterias y que retiene uno o más de los siguientes elementos: humedad, calor, fluidos corporales y medicamentos. Un experto es capaz de seleccionar un apósito cicatrizante de herida adecuado a usarse en una herida específica, y dicha selección puede realizarse en función de parámetros tal como, pero no limitado al tipo de herida, el tamaño de la herida, y la progresión de cicatrización de la herida.

Opcionalmente, el apósito es de hidrogel. Los apósitos de hidrogel están compuestos en una gran extensión de agua en una red de fibras que mantiene la integridad del gel polimérico. El agua del apósito se libera para mantener un nivel adecuado de humedad en la herida. Ejemplos de apósitos de hidrogel incluyen, sin limitación, Tegagel® e Intrasite®.

Se ha descrito en la técnica métodos y protocolos para producir cualquiera de los apósitos mencionados. El componente de estetrol puede incorporarse en/al apósito durante su fabricación, pero también puede aplicarse a un apósito prefabricado. A modo de ejemplo y no limitación, un apósito prefabricado o una parte del mismo puede impregnarse con el componente de estetrol. Alternativamente, un apósito prefabricado o una parte del mismo puede recubrirse con el componente de estetrol.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica (que opcionalmente es un hidrogel) está compuesta por un sustituto de piel (es decir, un sustituto dérmico o de piel). Un sustituto de piel proporciona una biomatriz tridimensional que cumple las funciones de una capa dérmica cutánea, capaz de cubrir temporal o permanentemente heridas abiertas. El material de dicho sustituto de piel no está particularmente limitado y, por lo

tanto, puede comprender materiales biológicos, materiales sintéticos o combinaciones de estos. Ejemplos no limitativos de material biológico incluyen, sin limitación, piel humana o porcina, y submucosa intestinal humana o porcina. El sustituto biológico de la piel puede comprender diferentes componentes, incluidos, pero no limitados a colágeno, glicosaminoglicano, fibronectina, ácido hialurónico, elastina y cualquier combinación de los mismos.

Alternativamente, la composición farmacéutica puede estar comprendida en cualquier otro medio adecuado para su aplicación al tejido cutáneo de un sujeto y, por lo tanto, puede estar comprendida en medios tales como, pero no limitados a vendajes, curitas, parches y esparadrapo.

Si bien la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que numerosas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica en vista de la descripción anterior. Por consiguiente, se pretende abarcar todas estas alternativas, modificaciones y variaciones, tal como se indica a continuación, en el espíritu y el amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los aspectos y realizaciones divulgados en el presente documento de la invención se sustentan además con los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Procesos de la producción

Formulaciones de gel acuoso

Lotes AG23, AG24, AG25, AG26

- i. Se pesó el agua (primera adición) en un Duran (recipiente 1).

- ii. La muestra del paso (i) se colocó en un agitador de placa caliente a 800 rpm formando un vórtice.
- iii. El polímero (Carbopol®) se pesó en una navecilla y se dispersó en el contenido del paso (ii), manteniendo el vórtice. La muestra se mantuvo en agitación durante al menos una hora para permitir la dispersión del polímero.
- iv. Se registró el peso de la dispersión de polímero del paso (iii).
- v. La muestra del paso (iv) se esterilizó en autoclave en condiciones estándar ($121^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 2×10^5 Pa, 15 min).
- vi. Una vez enfriada la muestra esterilizada en autoclave, se volvió a pesar la muestra del paso (v) y se añadió agua adicional para compensar la pérdida de volátiles por evaporación.
- vii. Los disolventes (PEG 400, Transcutol® P (éter monoetílico de dietilenglicol)) se pesaron en un recipiente aparte.
- viii. Se pesó estetrol monohidrato en el contenido del paso (vii) y se agitó a 500 rpm durante 2.5 horas (agitador magnético de placa calefactora a temperatura ambiente del laboratorio) para disolver el fármaco.
- ix. En la campana de flujo laminar de bioseguridad, el contenido del paso (viii) se filtró a través de múltiples filtros estériles Spartan (celulosa regenerada) de $0,2 \mu\text{m}$ en múltiples viales de esterilización en autoclave de 20 ml, esto se hizo para evitar la contaminación del volumen en caso de rotura de un filtro.
- x. El contenido del paso (ix) se combinó y se pesó en un recipiente Duran de pre esterilización en autoclave.

- xi. El contenido del paso (x) se vertió en el contenido del paso (vi) y se mezcló con un agitador de varilla y una espátula; la velocidad y el tiempo de mezcla se registraron en el cuaderno específico del laboratorio.
- xii. Se utilizó agua (aproximadamente el 4 % de la cantidad total) para enjuagar el recipiente del paso (x) y se vertió en el recipiente 1.
- xiii. La formulación se dejó reposar al menos durante la noche.
- xiv. El pH de la muestra se ajustó entre el pH objetivo, 6-6.5, con solución de hidróxido de sodio y se pesó con agua.
- xv. Cabe destacar que los pasos de fabricación (ix) a (xiv) se realizaron en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar.

Lotes AG30, AG22 (Carbopol® 980)

- i. Se pesó el agua (primera adición) en un recipiente Duran de 150 mL (recipiente 1).
- ii. La muestra del paso (i) se colocó en un agitador de placa caliente a 800 rpm, formando un vórtice.
- iii. Se pesó el polímero (Carbopol® 980) mediante una navecilla de pesaje y se dispersó en el contenido del paso (ii), manteniendo el vórtice. La muestra se dejó en agitación durante al menos una hora para permitir la dispersión del polímero.
- iv. Se registró el peso de la dispersión del polímero del paso (iii).

- v. Se pesó PEG 400 y glicerol y se añadieron al contenido del paso (iv).
- vi. La muestra del paso (v) se esterilizó en autoclave a condiciones estándar ($121^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 2×10^5 Pa, 15 min).
- vii. Una vez que la muestra de esterilización en autoclave se enfrió, se volvió a pesar la muestra del paso (v) y se agregó agua adicional para compensar la pérdida de volátiles por evaporación.
- viii. Los disolventes (propilenglicol (PG), Transcutol® P) se pesaron en un Duran de 100 mL.
- ix. Se pesó estetrol monohidrato en el contenido del paso (viii) y se agitó a 500 rpm (agitador magnético de placa calefactora a temperatura ambiente del laboratorio).
- x. En la campana de flujo laminar de bioseguridad, el contenido del paso (ix) se filtró a través de múltiples filtros estériles Spartan de $0.2 \mu\text{m}$ en múltiples viales de esterilización en autoclave de 20 mL para evitar la contaminación del volumen en caso de rotura de un filtro.
- xi. El contenido del paso (x) se combinó y se pesó en un Duran de 100 mL previamente esterilizado en autoclave.
- xii. Se vertió hidróxido de sodio al 18 % (previamente filtrado a través de un filtro estéril Spartan de $0.2 \mu\text{m}$) en el contenido del paso (xi) y se mezcló.
- xiii. El contenido del paso (xii) se vertió rápidamente en el contenido del paso (vii) y se mezcló con una espátula.
- xiv. Se utilizó agua (aprox. 4 % de la cantidad total) para enjuagar el recipiente del paso (x) y se vertió en el recipiente 1.

- xv. La muestra espesada se dejó reposar durante al menos una noche.
- xvi. Se midió el pH de la muestra y se añadió el agua estéril restante, junto con una solución de hidróxido de sodio (también previamente esterilizada con un filtro Spartan de 0.2 μ m) para ajustar el pH a 7-7.5 cuando fuera necesario.

Cabe destacar que los pasos de fabricación (x) a (xvi) se realizaron en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar.

Lote AG27 (poloxamero)

- i. El agua (primera adición) se pesó en un Duran de 150 mL y se enfrió en un refrigerador mantenido a 2 - 8 °C durante 20 minutos.
- ii. La muestra del paso (i) se colocó en un agitador de placa caliente y los poloxámeros (P407 seguido de P188) se pesaron y añadieron en un vórtex a 800 rpm.
- iii. La muestra del paso (ii) se agitó con un agitador de varilla durante 6 horas a 200 rpm hasta que el poloxámero se disolvió en el baño de agua mantenido a 2-8°C.
- iv. En un recipiente aparte, se pesaron juntos PEG 400, alcohol bencílico (BA) y PG.
- v. Se pesó el estetrol monohidrato y se añadió al contenido del paso (iv) y se dejó agitando durante la noche en un agitador de placa caliente a 500 rpm.
- vi. Una vez disuelto el fármaco, se pesó la cantidad necesaria de solución del paso (v) en el primer recipiente que

contenía la solución de poloxámero. La muestra se dejó en un agitador magnético durante la noche a 300 rpm.

vii. La muestra del paso (vi) se ajustó al pH a 7-7.5.

Lotes AG28 (Hidroxietilcelulosa (HEC)), AG29 (Carboximetilcelulosa (CMC))

- i. El sistema de disolventes para la formulación se preparó pesando todos los disolventes, excepto agua/tampón únicamente para los sistemas activos.
- ii. El fármaco se añadió a los sistemas disolventes para las formulaciones activas y se mantuvo en agitación a 500 rpm durante la noche.
- iii. Tras la disolución del fármaco, mientras el Duran está en agitación, se añadió la solución agua/tampón de pH 7.0 al sistema disolvente.
- iv. Se pesó una cantidad adecuada de premezcla en un Duran de 150 mL aparte.
- v. El polímero se dispersó formando un vórtice agitando a 800 rpm y la formulación se dejó en agitación durante la noche a 500 rpm.
- vi. Para AG28, el pH se ajustó a pH 7-7.5; no fue necesario ajustar el pH para AG29, ya que contiene tampón fosfato-fosfato de pH 7.0.

Lote AG15 (poloxámero)

- i. Se pesó el agua (primera adición) en un Duran de 150 mL y se enfrió en un refrigerador a una temperatura de 2-8°C durante 20 minutos.

- ii. La muestra del paso (i) se colocó en un agitador de placa caliente y se pesaron y añadieron poloxámeros (P407 seguido de P188) en un vórtex a 800 rpm.
- iii. La muestra del paso (ii) se agitó con un agitador de varilla durante 6 horas a 200 rpm hasta que el poloxámero se disolvió en el baño de agua mantenido a 2-8°C.
- iv. En un recipiente aparte, se pesaron juntos PEG400, BA y PG.
- v. Se pesó el estetrol y se añadió al contenido del paso (iv) y se dejó agitando durante la noche en un agitador de placa caliente a 500 rpm. Este paso se omitió para la fabricación del placebo.
- vi. Una vez disuelto el fármaco, se pesó la cantidad necesaria de solución del paso (v) en el primer recipiente que contenía la solución de poloxámero. La muestra se dejó en un agitador magnético durante toda la noche a 300 rpm.
- vii. La muestra del paso (vi) se ajustó a un pH de 7-7.5.

Lote AG17

- i. Se pesó el agua (primera adición) en un Duran de 150 mL (recipiente 1).
- ii. La muestra del paso (i) se colocó en un agitador de placa caliente a 800 rpm, formando un vórtice.
- iii. Se pesó el polímero (Carbopol®) mediante una navecilla de pesaje y se dispersó en el contenido del paso (ii), manteniendo el vórtice. La muestra se dejó en agitación durante al menos una hora para permitir la dispersión del polímero.

- iv. Se registró el peso de la dispersión del polímero en el paso (iii).
- v. La muestra del paso (iv) se utilizó en autoclave a condiciones estándar ($121^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 2×10^5 Pa, 15 min).
- vi. Una vez enfriada la muestra esterilizada en autoclave, se volvió a pesar la muestra del paso (v) y se añadió agua adicional para compensar la pérdida de volátiles por evaporación.
- vii. El alcohol bencílico, el PEG 400 y el PG se pesaron en un Duran de 100 ml aparte.
- viii. Se pesó el estetrol monohidrato en el contenido del paso (vii) y se agitó a 500 rpm durante la noche (agitador magnético de placa calefactora a temperatura ambiente del laboratorio) para disolver el fármaco. Este paso se omitió en la formulación del placebo.
- ix. Se vertió hidróxido de sodio al 18% (1.38 g) en el contenido del paso (vi) y se mezcló.
- x. El contenido del paso (ix) se vertió rápidamente en el contenido del paso (vi) y se mezcló con una espátula.
- xi. Se enjuagó el recipiente del paso (ix) con agua (4.5 g) y se vertió en el recipiente 1.
- xii. La muestra, que había espesado, se dejó reposar al menos durante la noche.
- xiii. Se midió el pH de la muestra y se añadió gradualmente el agua restante mientras se continuaba midiendo el pH.

Lotes AG18 (HEC), AG19 (CMC)

- i. Los sistemas disolventes para las formulaciones de placebo y activas se prepararon pesando todos los disolventes, excepto agua/tampón únicamente para los sistemas activos.
- ii. El fármaco se añadió a los sistemas disolventes para las formulaciones activas y se mantuvo en agitación a 500 rpm durante la noche.
- iii. Tras la disolución del fármaco, mientras el Duran estaba en agitación, se añadió la solución agua/tampón de pH 7.0 al sistema disolvente.
- iv. Se pesó una cantidad adecuada de premezcla en un Duran de 150 ml aparte.

El polímero se dispersó mientras se formaba un vórtice agitando a 800 rpm y la formulación se mantuvo en agitación durante la noche a 500 rpm.

- v. Para AG18, el pH se ajustó a pH 7-7.5, no fue necesario ajustar el pH para AG19, ya que contenía tampón fosfato-fosfato pH 7.0.

Lotes AG20, AG23

- i. Se siguieron los pasos (i) - (vi) del AG17.
- ii. Los disolventes (PEG 400, Transcutol® P) se pesaron en un recipiente aparte (100 mL).
- iii. Se pesó el estetrol monohidrato en el contenido del paso (ii) y se agitó a 500 rpm durante 2.5 horas (agitador magnético de placa calefactora a temperatura ambiente de laboratorio) para disolver el fármaco. Este paso se omitió en la formulación del placebo.

- iv. En la campana de flujo laminar de bioseguridad, el contenido del paso (iii) se filtró a través de múltiples filtros estériles Spartan (celulosa regenerada) de 0.2 μm en múltiples viales de esterilización en autoclave de 20 mL, esto se hizo para evitar la contaminación del volumen en caso de rotura de un filtro. Cabe destacar que inicialmente las muestras se filtrarían a través del filtro del sistema de botellas Nalgene (PES), con la ayuda de una bomba de vacío, pero los filtros se rompieron, por lo que se utilizaron filtros de jeringa Spartan.
- v. El contenido del paso (iv) se combinó y se pesó en un Duran de 100 mL de pre-esterilización en autoclave.
- vi. El contenido del paso (v) se vertió en el contenido del paso (i) y se mezcló con una espátula.
- vii. Se enjuagó el recipiente del paso (v) con agua (4.5 g) y se vertió en el recipiente 1.
- viii. Dado que la formulación no espesó, se dejó reposar durante al menos una noche.
- ix. El pH de la muestra se ajustó entre 6 - 6.5 con solución de hidróxido de sodio y se pesó con agua. Cabe destacar que inicialmente se realizó un proceso con hidróxido de sodio al 18%, sin embargo, Carbopol® se aglutinó o no se hidrató. Además, el objetivo original pH era de 7-7.5, sin embargo, se observó precipitación del polímero por encima de pH 6.5, se repitieron las muestras y se dejaron entre pH 6 - 6.5 para evitar este problema.

Cabe señalar que los pasos de fabricación (iv) a (ix) se realizaron bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar.

Lotes AG21, AG22

- i. Se siguieron los pasos (i) a (vi) de AG17.
- ii. Los disolventes (PEG 400, PG, Trans P) se pesaron en un Duran de 100 ml.
- iii. Se pesó el estetrol monohidrato en el contenido del paso (i) y se agitó a 500 rpm (agitador magnético de placa calefactora a temperatura ambiente del laboratorio). El fármaco se disolvió en 2.5 horas tras la agitación para AG22 y durante la noche para AG21. Este paso se omitió para las formulaciones de placebo.
- iv. En la campana de flujo laminar de bioseguridad, el contenido del paso (viii) se filtró a través de múltiples filtros estériles Spartan de 0.2 μm en múltiples viales de esterilización en autoclave de 20 mL para evitar la contaminación del volumen en caso de rotura de un filtro.
- v. El contenido del paso (ix) se combinó y se pesó en un Duran de 100 mL de pre-esterilización en autoclave.
- vi. Se vertió hidróxido de sodio al 18% (1.38 g) (previamente filtrado a través de un filtro esteril Spartan de 0.2 μm) en el contenido del paso (x) y se mezcló.
- vii. El contenido del paso (xi) se vertió rápidamente en el contenido del paso (vi) y se mezcló con una espátula.
- viii. Se enjuagó el recipiente del paso (x) con agua (4.5 g) y se vertió en el recipiente 1.

- ix. La muestra espesó y se dejó reposar durante al menos una noche.
- x. Se midió el pH de la muestra y se añadió el agua estéril restante, junto con una solución de hidróxido de sodio (también previamente esterilizada a través de un filtro Spartan de 0.2 μm) para ajustar el pH a 7-7.5 cuando fuera necesario.

Cabe destacar que los pasos de fabricación (ix) a (xv) se realizaron bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar.

Tabla 1: Composiciones (% p/p) de formulaciones de gel acuoso de estetrol monohidrato (E4).

[illegible]

Cremas***Lotes CR01, CR05, CR12***

- i. Los sistemas de placebo y de disolvente activo se prepararon pesando todos los disolventes, excepto agua/tampón únicamente para los sistemas activos.
- ii. El fármaco se añadió a los sistemas disolventes para las cremas activas y se mantuvo en agitación a 500 rpm durante la noche.
- iii. Una vez disuelto completamente el fármaco, mientras el recipiente (Duran) estaba en agitación, se añadió la solución agua/tampón de pH 7.0 al sistema disolvente.
- iv. Luego, se prepararon las fases oleosas. Para CR01, la fase oleosa se colocó en un baño de agua a 75°C hasta su fusión.
- v. Para CR05 y CR12, las fases oleosas se colocaron en el horno durante 2 horas a 160°C (para simular el proceso de esterilización). Una vez enfriadas a temperatura ambiente, y resolidificadas, se colocaron en un baño de agua (75°C) hasta que se fundieron de nuevo.
- vi. Antes de procesar las cremas activas y de placebo, se pesó la cantidad requerida de la pre-mezcla del sistema disolvente en un Duran aparte.
- vii. Se colocó el Duran con la pre-mezcla en el baño de agua junto con el cabezal homogeneizador durante 5 minutos.
- viii. Para CR01 y CR12, las cremas se procesaron mediante un Ultra-Turrax equipado con un cabezal dispersante de 25G a 10,000 rpm durante 2 minutos.

- ix. Para CR05, durante la homogeneización, la crema se homogeneizó a 5000 rpm, durante 5 minutos, para evitar que se desbordara.
- x. Después del procesamiento, las cremas se revolvieron a mano con una espátula de metal hasta que la crema alcanzó la temperatura ambiente.
- xi. Se dejaron macerar durante la noche.
- xii. Las formulaciones se ajustaron a un pH de 7-7.5.

Lotes CR10, CR13, CR14, CR15, CR16

- i. Los sistemas de placebo y de disolvente activo se prepararon pesando todos los disolventes, excepto agua/tampón únicamente para los sistemas activos.
- ii. El fármaco se añadió a los sistemas disolventes para las cremas activas y se mantuvo en agitación a 500 rpm durante la noche.
- iii. Una vez disuelto completamente el fármaco, mientras el Duran se encontraba en agitación, se añadió la solución agua/tampón de pH 7.0 al sistema disolvente.
- iv. Las fases oleosas de CR13, CR14 y CR15 se colocaron en el horno durante 2 horas a 160°C (esterilizadas) y se dejaron re-solidificar a temperatura ambiente.
- v. Las fases acuosas se esterilizaron mediante filtración utilizando filtros de jeringa de PES estériles de 0.2 µm.
- vi. La cantidad necesaria de fase acuosa se pesó en un Duran de 250 mL que fue pre-esterilizado en autoclave.

- vii. Las fases oleosas se colocaron en un baño de agua a 75°C hasta su fusión.
- viii. Las fases acuosas se colocaron en el baño de agua junto con el cabezal homogeneizador para equilibrarse durante 5 minutos.
- ix. Para cada crema, se añadió la fase oleosa a la fase acuosa respectiva y se homogeneizó utilizando un Ultra-turrax equipado con un cabezal dispersante de 25G a 10,000 rpm durante 2 minutos.
- x. Después del procesamiento, las cremas se revolvieron a mano con una espátula de metal hasta que la crema alcanzó la temperatura ambiente.
- xi. Se dejaron macerar durante la noche.
- xii. Las formulaciones se ajustaron a un pH de 7-7.5

Se debe tener en cuenta que los pasos de fabricación (v) a (xii) se realizaron en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar y los recipientes estériles solo se abrieron en la campana de flujo laminar estéril.

Tabla 2: Composiciones (% p/p) de formulaciones de crema de estetrol monohidrato (E4).

[illegible]

Ejemplo 2. Experimento de liberación in vitro 1

Tras el desarrollo del método y un experimento de prueba de liberación in vitro (IVRT por sus siglas en inglés) preliminar a pequeña escala, se realizó un experimento IVRT a gran escala utilizando 10 formulaciones de prueba descritas en el Ejemplo 1. Las condiciones experimentales utilizadas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Condiciones experimentales para la IVRT a gran escala.

Parámetro	Condiciones experimentales
Número de formulaciones	10
Réplicas	n=6 activos; n=1 en blanco
Membrana	isopore
Solución receptora	40:30:30 v/v/v Etanol: PEG400: Agua
Volumen de muestreo RS	1.0 mL
Cantidad de dosis	0.3 gramos
Velocidad de agitación	50 rpm
Puntos de tiempo de muestreo	t = 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 minutos
Temperatura de la membrana	32° ± 1°C

El experimento de liberación in vitro a gran escala se realizó utilizando las condiciones experimentales desarrolladas durante el desarrollo del método y los experimentos de viabilidad. Los resultados de todas las formulaciones de gel y de crema probadas se muestran en la Figura 1, y los resultados tabulados en la Tabla 4.

Formulaciones de gel acuoso

Las velocidades de liberación de las formulaciones de gel acuoso se presentan en la Figura 2 y la Tabla 4. Las formulaciones AG18, AG19 y AG23 resultaron en las velocidades de liberación más altas (161-221 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$), seguidas de AG21 (51 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$), con AG22 (estéril), AG22 (esterilizan en autoclave) y AG15 resultando en las velocidades de liberación más bajas (3-10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$). Como tendencia general, las velocidades de liberación observadas se correlacionan con la

concentración de IFA (API por sus siglas en inglés), y las formulaciones con las velocidades de liberación más altas (AG18, AG19 y AG23) que también contienen la mayor concentración de estetrol monohidrato (0.50% p/p).

Se observó que los geles acuosos con las velocidades de liberación más bajas (AG21, AG22 (estéril), AG22 [esterilización en autoclave] y AG15) liberaban inmediatamente una gran cantidad del IFA dosificado (aprox. 50% o mayor liberación en $t=0.5$ hr) en la solución receptora. Debido a la gran liberación del IFA, no se logró una liberación del fármaco en estado estacionario lineal ($r^2 < 0.9$) en muchas de las formulaciones. Por lo tanto, no se realizaron conclusiones ni comparaciones estadísticas con las formulaciones de gel acuoso.

Formulaciones de crema

Las velocidades de liberación de las formulaciones de crema se presentan en la Figura 3 y se complementan con la tabla 4. CR16 (0.50% p/p) resultó en la velocidad de liberación más alta, seguido de CR14 (0.35% p/p) y finalmente CR01 (0.24% p/p), con velocidades de liberación promedio que oscilaron entre 32-53 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$. Siguiendo la misma tendencia que los geles acuosos, las velocidades de liberación se correlacionaron con la concentración de IFA presente en la formulación, observándose la velocidad de liberación más alta en la formulación con la mayor carga de fármaco (CR16, que contiene 0.50% de IFA y resultando en una velocidad de liberación de 52.20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$). El análisis estadístico unidireccional de la liberación promedio del fármaco ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$) de las formulaciones de crema se realizó mediante Tukey-Kramer ($n=6$). No hubo diferencias estadísticas entre las velocidades de liberación de CR14 y CR16 ($p>0.05$), mientras

que se observó que la velocidad de liberación de CR01 tenía una velocidad de liberación significativamente menor ($p < 0.05$).

Tabla 4. Velocidad promedio de liberación de estetrol monohidrato ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$) entre los puntos de tiempo experimentales de 1 y 8 h de 10 formulaciones a través de una membrana Isopore® en solución receptora 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400: agua.

Velocidad de Liberación de IFA (pendiente; $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$)				Linealidad (r^2)		
Formulación	n	Promedio	Desviación estándar	n	Promedio	Desviación estándar
AG22 (estéril)	6	3.85	2.33	6	0.74	0.09
AG22 (esterilización en autoclave)	6	5.54	4.36	6	0.77	0.13
AG15	6	9.97	4.75	6	0.75	0.25
AG21	6	50.75	27.27	6	0.90	0.06
AG19	6	161.01	24.52	6	1.00	0.00
AG23 (estéril)	6	195.69	20.22	6	1.00	0.00
AG18	6	220.93	6.96	6	0.98	0.02
CR01	6	30.41	3.41	6	0.98	0.02
CR14	6	48.51	4.18	6	0.99	0.00
CR16	6	52.20	6.34	6	0.99	0.01

Ejemplo 3. Experimento de liberación in vitro 2

Tras los resultados del primer experimento de liberación in vitro (Ejemplo 2), se realizó un segundo experimento de IVRT utilizando las 4 formulaciones y los parámetros experimentales descritos en la Tabla 5.

Tabla 5: Parámetros y formulaciones del estudio IVRT empleados en el experimento de liberación del fármaco in vitro 2.

Parámetros de IVRT	Condiciones experimentales
Número de formulaciones	Cuatro: AG23 (0.50% ACT) AG24 (0.50% ACT) AG25 (0.22% ACT) AG26 (0.06% ACT)
Réplicas	n=6 por activo
Membrana	Isopore®
Solución receptora	40:30:30 v/v/v Etanol: PEG400: agua
Volumen de muestreo RS	1.0 mL
Cantidad de dosis	0.3 gramos
Velocidad de agitación	50 rpm
Puntos de tiempo de muestreo	0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 min
Temperatura de la membrana	32 ± 1°C

El segundo experimento de liberación in vitro a gran escala se realizó utilizando los parámetros experimentales detallados en la Tabla 5 y cuatro formulaciones de gel acuoso. Los resultados de todas las formulaciones probadas se muestran en las Figuras 4 y 5, en los resultados tabulados en las Tablas 6 y 7.

El propósito de esta parte del estudio fue determinar el efecto de la actividad termodinámica en la velocidad de liberación del estetrol monohidrato de las formulaciones comparando una formulación no optimizada (AG23 0.5% (p/p) IFA) con formulaciones optimizadas en una variedad de concentraciones IFA (AG24 0.5% (p/p), AG25 0.22% (p/p) y AG26 0.06% (p/p)).

Al considerar estas 4 formulaciones en términos de porcentaje de liberación de dosis aplicada de IFA (Tabla 17), se liberó $87.95 \pm 10.88\%$ de IFA de la formulación AG26 (0.06% (p/p) IFA) después de 8 h, lo que fue significativamente mayor ($p, 0.05$) que de las otras 3 formulaciones que no fueron estadísticamente diferentes entre sí ($p > 0.05$) ($61.51 \pm 4.91\%$ AG25 (0.22% (p/p) IFA), $60.67 \pm 4.86\%$ AG24 (0.5% (p/p) IFA) y $56.88 \pm 5.90\%$ AG23 (0.5% (p/p) IFA)).

Considerando el porcentaje de las velocidades de liberación de la dosis aplicada a lo largo del tiempo (pendiente), se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre la formulación AG26 y las otras tres formulaciones (AG23, AG24 y AG25). No se

observaron diferencias estadísticamente significativas entre AG23, AG24 y AG25. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Tukey-Kramer ($n = 5-6$).

Durante el presente estudio, la formulación AG23 mostró una velocidad de liberación de aprox. $167 \pm 13 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$, en comparación con $195 \pm 20 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ del primer experimento de IVRT a gran escala. La formulación AG24 tuvo la mayor velocidad de liberación (aprox. $182 \pm 8 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) en el presente estudio, seguida de AG23, AG25 (aprox. $81 \pm 5 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) y, finalmente, AG26 (aprox. $34 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$). La velocidad de liberación de cada formulación es significativamente diferente ($p < 0.05$) de la siguiente, la cual en el caso de AG23 y AG24, ambas con un contenido de 0.5% (p/p) de estetrol monohidrato, podría deberse a problemas con la dosificación de AG23 o a la variabilidad entre lotes en comparación con el lote de AG23 utilizado en el experimento anterior (cuya velocidad de liberación fue mucho más cercana a la observada aquí para AG24), o simplemente a una diferencia de formulación entre AG23 y AG24. En las otras dos formulaciones, la diferencia en la velocidad de liberación es la esperada debido al menor contenido de IFA en estas formulaciones (AG23 y AG24 0.5% p/p, AG25 0.22% (p/p) y AG26 0.06% p/p).

Para evaluar las diferencias entre las formulaciones de gel acuoso como se informó anteriormente, se realizó un análisis estadístico unidireccional utilizando Tukey-Kramer ($n = 5 - 6$).

Tabla 6: La velocidad promedio de liberación de estetrol monohidrato ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$) entre los puntos de tiempo experimentales de 1 y 8 h de formulaciones de gel acuoso a través de una membrana isopore en solución receptora 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400: agua.

Velocidad de Liberación de IFA (pendiente; $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\sqrt{\text{h}}$)				Linealidad (r^2)		
Formulación	n	Promedio	Desviación estándar	n	Promedio	Desviación estándar
AG24 (0.50%)	5*	182.02	7.69	5	1.00	0.01
AG23 (0.50%)	5*	167.19	13.43	5	1.00	0.00
AG25 (0.22%)	6	81.32	5.13	6	1.00	0.00
AG26 (0.06%)	6	33.61	3.05	6	0.98	0.02
AG23**	6	195.69	20.22	6	1.00	0.00

* Se eliminó una única réplica identificada como valor atípico mediante la prueba Q de Dixon.

**Datos del experimento 1 de IVRT a gran escala

Tabla 7: Estetrol monohidrato acumulado ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y porcentaje de dosis aplicada liberada en el punto de tiempo experimental de 8 horas de formulaciones de gel acuoso a través de una membrana isopore en solución receptora 40:30:30 v/v/v etanol: PEG400: agua.

Cantidad Acumulativa de IFA liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)					Porcentaje de IFA aplicado liberado	
Formulación	n	Promedio	Desviación estándar	n	Promedio	Desviación estándar
AG24	5*	495.91	39.72	5	60.67%	4.86%
AG23	5*	440.72	45.69	5	56.88%	5.90%
AG25	6	220.43	17.58	6	61.51%	4.91%
AG26	6	82.95	10.36	6	87.16%	10.88%

* Se eliminó una única réplica identificada como valor atípico mediante la prueba Q de Dixon.

Ejemplo 4. Protocolo de tratamiento con LPS in vivo (modelo de cicatrización retardada de heridas)

El modelo de cicatrización retardada de heridas inducida por LPS in vivo se reprodujo como se describió previamente (Crompton R, Williams H, Ansell D, Campbell L, Holden K, Cruickshank S, Hardman MJ. El estrógeno promueve la cicatrización en un modelo bacteriano de LPS de reparación retardada de heridas cutáneas. Lab Invest. 2016 Abr;96(4):439-49.).

Los ratones hembra de tipo silvestre (C57BL/6J) de 8 semanas de edad se dividieron en seis grupos (6 animales por grupo experimental):

- Control doble placebo (sin LPS, tratamiento placebo),
- Control de LPS (LPS, tratamiento placebo),
- LPS con EstroGel tópico (gel de estradiol, contiene 0.06% de 17β -estradiol como hemihidrato en un gel hidroalcohólico),
- LPS con AG24 tópico (E4 al 0.5%),
- LPS con AG25 tópico (E4 al 0.22%),
- LPS con AG26 tópico (E4 al 0.06%).

El día anterior a la herida (día -1), todos los animales fueron pesados y anestesiados con oxígeno e isoflurano (velocidad de flujo de 1.25-2L con 2-2.5% de isoflurano, dependiendo de los signos clínicos). Se afeitó a los animales y se prepararon las áreas dorsales. Se marcaron las posiciones de la herida (2 heridas) en el dorso de cada animal. Los animales recibieron una primera inyección subcutánea de 2 μ g de LPS derivado de *K. pneumoniae* diluido en DPBS (1 μ g por herida; Sigma Aldrich, UK: L4268) en el sitio de la herida, excepto el grupo doble placebo que recibió solo DPBS. Luego se aplicó una capa delgada de EstroGel, AG24, AG25, AG26 o placebo al dorso de cada animal, medida como un total de 60 μ l (30 μ l/herida). Los animales se recuperaron en una cámara de calentamiento y luego se alojaron individualmente en jaulas frescas que contenían almohadilla alfa, agua de ósmosis inversa, alimento, papilla y una casa. El día 0 (24 horas después de la primera anestesia), los ratones fueron anestesiados nuevamente y se limpió la piel dorsal con toallitas de clorhexidina. Se crearon dos escisiones dorsales de 6 mm. Se inyectó subcutáneamente 2 μ g de LPS (1 μ g por herida) en el lugar de la herida como se indicó anteriormente, excepto en los ratones con doble placebo que

fueron inyectados con DPBS. Luego se aplicó EstroGel, AG24, AG25, AG26 o AG23 como Placebo en una capa delgada sobre la parte superior de la herida (60 μ l en total; 30 μ l /herida), teniendo cuidado de no dañar la "ampolla LPS". Se administró buprenorfina (0.1 mg/kg), un analgésico, posoperatoriamente mediante inyección subcutánea en el pescuezo y se tomaron imágenes de cada animal. Los ratones se recuperaron en una cámara de calentamiento y se devolvieron a su alojamiento individual. Se realizaron observaciones posoperatoriamente.

Los días 1, 2, 3 y 4, para los grupos tratados, se volvió a aplicar EstroGel tópico, AG24, AG25, AG26 o placebo en una capa delgada sobre la parte superior de las heridas (60 μ l en total; 30 μ l/herida) durante las observaciones.

El día 5, los ratones fueron sacrificados humanitariamente mediante un aumento de la concentración de CO₂ y una dislocación cervical.

Se extrajeron los úteros y se pesaron.

Se recogió piel sin herida (NS por sus siglas en inglés) del sitio de tratamiento en el momento de la herida (día 0), se procesó para análisis histológico y se congeló rápidamente. El tejido de la herida se recogió cinco días después de la herida (día 5). Las heridas se dividieron por la mitad, la mitad inferior de cada herida se fijó para análisis histológico y la mitad superior se congeló rápidamente.

Para realizar el análisis inmunohistoquímico (IHC por sus siglas en inglés) e histológico, las muestras de tejido se fijaron en formol tamponado al 10% y se incluyeron en cera de parafina para su segmentación. Las secciones de tejido se desparafinaron en xileno y se rehidrataron mediante un gradiente de etanol antes de realizar la tinción con hematoxilina y eosina, y la IHC para células inmunitarias.

Para el aislamiento y cultivo de macrófagos peritoneales murinos, la cavidad peritoneal de ratones eutanasiados se llenó con 5 ml de PBS helado suplementado con 3% FBS y 1% antibiótico-antimicótico. El líquido que contenía las células se extrajo con una aguja y una jeringa y las células se sembraron en placas de 12 pocillos a 1×10^6 células/ml en medio de crecimiento RPMI suplementado con 10% FBS y 1% penicilina/estreptomicina. Las células se dejaron durante la noche para permitir que los macrófagos se adhirieran y luego se lavaron dos veces para eliminar cualquier célula no adherente. Las células se cultivaron durante 24 horas más y luego se polarizaron a un estado M1 o M2. Los macrófagos M1 se indujeron utilizando 100 ng/ml de IFN- γ y 1 μ g/ml de LPS. Para los macrófagos M2, se utilizó 20 μ g/ml de anti-IFN- γ y 10 ng/ml de IL4.

Para el aislamiento de ARN y la PCR cuantitativa en tiempo real, los macrófagos murinos se recogieron en Trizol y el ARN se aisló utilizando un kit de aislamiento de ARN Trizol plus (Invitrogen, Thermo Fisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se transcribió de forma inversa a ADNc utilizando la transcriptasa inversa GoScript (Promega). La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando una mezcla maestra 2 $\times$ Takyon SYBR Green y un termociclador CFX Connect. Para evaluar el grado de polarización M1 y M2 de los macrófagos peritoneales de los diferentes grupos de tratamiento, se utilizó cebadores para los genes de ratón *Il-1 β* , *Tnf- α* , *iNos*, *Arg1*, *Fizz1* e *Ym1*. Se utilizó cebadores para GAPDH para normalizar los datos. La expresión génica relativa se estableció frente al grupo control M0 PBS+PBO a menos que se indique lo contrario.

La importancia estadística se evaluó utilizando ANOVA unidireccional con análisis post hoc de Tukey o prueba t pareada según correspondiera.

De la Figura 6 se desprende que la aplicación de EstroGel® promovió el aumento de peso uterino y los cambios hipertróficos. La aplicación tópica de E4 afecta el peso uterino de forma dosis-dependiente, AG26 no mostró ningún efecto y AG24 indujo el aumento de peso uterino. Los datos confirman que la aplicación tópica de formulaciones de E4 de baja concentración (AG26) en heridas abiertas durante 6 días, a diferencia de EstroGel® (E2) y formulaciones de E4 de alta concentración (AG24, AG25), no produjo efectos secundarios sistémicos. Estos se reflejan en el aumento de peso uterino. A continuación, evaluamos el cierre de la herida de muestras histológicas. Las secciones histológicas se sometieron a inmunohistoquímica K14 para visualizar la epidermis recién formada. El grado de re-epitelialización se determinó dividiendo la longitud de la neoepidermis por la distancia entre los márgenes de la herida, multiplicado por 100.

Como era de esperar, las heridas tratadas con LPS y placebo mostraron un retraso >30% en la re-epitelialización, en comparación con las heridas tratadas sin LPS (Figura 7). Los cuatro tratamientos activos (EstroGel®, AG24, AG25 y AG26) promovieron la re-epitelialización. Curiosamente, se observó una mayor magnitud de promoción e importancia estadística en las heridas tratadas con EstroGel® o AG26, donde la re-epitelialización se acercó a la observada en el grupo control tratado sin LPS. El grupo de tratamiento con AG25 no alcanzó la importancia estadística en comparación con el grupo con LPS/PBO.

Con base en los datos representados en las Figuras 6 y 7, concluimos que la formulación de AG26 de aplicación tópica puede mejorar especialmente la cicatrización de heridas sin presentar efectos sistémicos como el aumento del peso uterino. Esto es indicativo del rango de dosificación preferido si se quiere evitar por completo los efectos sistémicos. Sin embargo,

en algunos casos, puede contemplarse una dosificación mayor en base de un riesgo/beneficio favorable para el sujeto en cuestión.

Se realizó inmunohistoquímica para evaluar el efecto de los tratamientos activos (EstroGel®, AG24, AG25 y AG26) en el número de células inmunitarias locales de la herida. Los niveles de neutrófilos de la herida aumentaron sustancialmente en las heridas tratadas con LPS/PBO en comparación con las heridas sin LPS/PBO (Figura 8). El tratamiento con AG24 y AG26 redujo significativamente el número de neutrófilos de la herida, en la misma medida que el EstroGel®. AG25 fue ligeramente menos eficaz en la reducción de la inflamación de la herida, pero aún así altamente significativo. Se observaron efectos muy similares de los geles que contenían E2 y E4 con respecto al número de macrófagos de la herida (Figura 9). Una vez más, AG25 fue ligeramente menos eficaz. Curiosamente, EstroGel® y AG26 revirtieron completamente el efecto del LPS sobre los macrófagos, restaurando los niveles de macrófagos de la herida equivalentes al grupo sin LPS/PBO (Figura 9).

Para complementar el análisis inmunohistoquímico, se aisló el ARN del tejido de la herida y se realizó una qPCR para evaluar los marcadores específicos del fenotipo de polarización M1 y M2 (Figura 10). Todos los tratamientos mostraron una tendencia hacia una menor expresión del marcador M1 en comparación con el control LPS/PBO. Curiosamente, la magnitud del efecto fue mayor en los grupos con EstroGel® y AG26 (alcanzando la importancia estadística para el tratamiento con IL1- β y AG26). Por el contrario, los marcadores M2 *Fizz1* e *Ym1* aumentaron en todos los grupos de tratamiento, sin embargo, en este caso, el efecto de AG26 fue el menos pronunciado de las tres formulaciones de AG analizadas. Estos datos indican que el E4 atenúa la inflamación y promueve un entorno de la herida M2 (pro-cicatrización).

Finalmente, para explorar más el posible efecto sistémico del tratamiento tópico con E2 o E4, se evaluó el fenotipo de los macrófagos peritoneales aislados de cada grupo experimental de ratones al finalizar el estudio. Específicamente, los macrófagos de cada grupo se aislaron por separado mediante lavado peritoneal, se cultivaron y se polarizaron hacia un fenotipo M1 o M2 (como en el ejemplo 7). Se aisló el ARN y se realizó qPCR para cuantificar los niveles relativos de *Tnf- α* e *iNOS* (marcadores M1), y *Arg1* e *Ym1* (marcadores M2; Figura 11).

Se observó que los macrófagos aislados del grupo LPS/PBO mostraron una mayor expresión del marcador M1 al polarizarse al fenotipo M1 o M2 in vitro. Por el contrario, el grupo LPS/PBO mostró una menor inducción del marcador M2 en respuesta a la estimulación con M2 in vitro. En particular, el grupo M0 LPS/PBO no mostró una expresión alterada de los marcadores M1 o M2 en comparación con el grupo control. En conclusión, el LPS tópico prepara a los macrófagos peritoneales para una respuesta pro-inflamatoria exagerada.

En los ratones tratados con LPS que recibieron tratamiento tópico con EstroGel® o formulaciones de E4 (AG24, AG25, AG26), estos efectos se revirtieron (Figura 11). Por ejemplo, el tratamiento con la formulación E4 revirtió por completo la elevada expresión preparada de LPS de *Tnf- α* tanto en las células polarizadas in vitro M1 como M2. Se observó una reducción estadísticamente significativa de la expresión tras el tratamiento con AG24, AG25 y AG26. Este efecto anti-inflamatorio fue ligeramente mayor con AG24 (la formulación con la mayor concentración de E4), especialmente al considerarla junto con la expresión *iNOS* (Figura 11).

Las cuatro formulaciones aumentaron la expresión de los marcadores M2, *Arg1* e *Ym1*, en células polarizadas M2 en

comparación con las células derivadas de los ratones tratados con LPS/PBO (Figura 11). Este efecto fue más pronunciado en los macrófagos aislados del grupo tratado con EstroGel®, donde los niveles de los marcadores M2 en células polarizadas M2 superaron a los de los ratones control (tratados sin LPS). Curiosamente, de las tres formulaciones de E4 analizadas, AG26 (la concentración más baja de E4) presentó el mayor aumento en la expresión de los marcadores M2, aunque AG25 y AG24 también fueron eficaces.

Ejemplo 5. Protocolo de tratamiento con LPS in vivo (modelo de cicatrización retardada de heridas): comparación de diferentes formulaciones y variación de la duración del tratamiento.

El protocolo de tratamiento con LPS in vivo (modelo de cicatrización retardada de heridas) presentado en el ejemplo 4 se ha repetido con los siguientes grupos de animales:

- Grupo doble placebo (control sin tratamiento),
- Control de LPS (LPS, tratamiento placebo),
- LPS con EstroGel tópico (gel de estradiol, contiene 0.06% de 17 β -estradiol como hemihidrato en un gel hidroalcohólico), administración repetida durante 4 días,
- LPS con AG26 tópico (E4 al 0.06%), administración única,
- LPS con AG26 tópico (E4 al 0.06%), administración repetida durante 4 días,
- LPS con AG28 tópico (E4 al 0.06%), administración única,
- LPS con AG28 tópico (E4 al 0.06%), administración repetida durante 4 días.

Solo el día 0 (administración única) o los días -1, 0, 1 y 2 (administración repetida), se aplicó EstroGel tópico, AG26, AG28 o el placebo correspondiente en una capa delgada sobre la parte superior de las heridas (60 μ l en total; 30 μ l/herida) durante las observaciones.

El día 3, los ratones fueron sacrificados de forma humanitaria mediante el aumento de la concentración de CO₂ y la dislocación cervical. Los úteros, así como las muestras de tejido con y sin heridas, se procesaron como se describe en el ejemplo 4. A diferencia de EstroGel, la aplicación tópica de AG26 y AG28 no afectó al peso uterino (Figura 12).

A continuación, evaluamos el cierre de la herida de las muestras histológicas (Figura 13). Las secciones histológicas se sometieron a inmunohistoquímica K14 para visualizar la epidermis recientemente formada. Los tres tratamientos activos (EstroGel®, AG26 y AG28) promovieron la re-epitelialización tras la administración repetida durante 4 días. AG28 no alcanzó la importancia estadística en comparación con el grupo tratado con AG28 PBO. Curiosamente, se observó una mayor magnitud de promoción e importancia estadística en las heridas tratadas con AG26 en comparación con EstroGel®, donde la re-epitelialización abarcó la observada en el grupo control tratado sin LPS.

Tanto AG26 como AG28 (4 aplicaciones) aceleraron la cicatrización de heridas en comparación con el placebo al aumentar la re-epitelialización en un modelo de ratón con cicatrización retardada de heridas (Figura 13).

AG26 y AG28 son formulaciones tópicas que pueden mejorar la cicatrización de heridas después de una sola aplicación sin tener efectos sistémicos.

Ejemplo 6. Cicatrización de heridas en ratones db/db

Se pesarán ratones hembra db/db de 8 semanas de edad con diabetes y los animales se dividirán en seis grupos (6 animales por grupo experimental):

- Placebo tópico (control),

- EstroGel® tópico (gel de estradiol, contiene 0.06% de 17 β -estradiol como hemihidrato en un gel hidroalcohólico),
- AG24 tópico (E4 al 0.5%),
- AG25 tópico (E4 al 0.22%),
- AG26 tópico (E4 al 0.06%),
- AG28 tópico (E4 al 0.06%).

Los ratones serán anestesiados con oxígeno e isoflurano (flujo de 1.25-2L con 2-2.5% de isoflurano, dependiendo de los signos clínicos), se les afeitará y se limpiará la piel dorsal con toallitas de clorhexidina. Se realizarán dos escisiones dorsales de 6 mm. Luego se aplicará una capa delgada de EstroGel®, AG24, AG25, AG26, AG28 o placebo sobre la parte superior de la herida (60 μ L en total, 30 μ L por herida). Se administrará buprenorfina (0.1 mg/kg) posoperatoriamente mediante inyección subcutánea en el pescuezo y se tomarán imágenes de cada animal. Los ratones serán recuperados en una cabina de calentamiento y devueltos a su alojamiento individual. Se realizarán observaciones posoperatorias.

Diariamente, se volverá a aplicar una capa delgada de EstroGel® tópico, AG24, AG25, AG26, AG28 o placebo sobre la parte superior de las heridas (60 μ L en total; 30 μ L por herida) durante las observaciones. Se tomarán imágenes de las heridas los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 14 para su análisis planimétrico.

El día 14, se sacrificarán los ratones y se dividirá el tejido de la herida por la mitad, la mitad inferior de cada herida se procesará para histología en cera (se colocará en un casete con fijador). Se extraerá cuidadosamente el útero para permitir que los pesos del útero sean documentados.

Se espera que la aplicación de EstroGel® promueva el aumento del peso uterino y cambios hipertróficos. Se espera que la

aplicación tópica de E4 afecte el peso uterino de forma dosis-dependiente, ya que AG26 y AG28 no muestran ningún efecto, y AG24 induce aumento del peso uterino.

Se espera que EstroGel®, AG24, AG25, AG26 y AG28 aceleren la cicatrización de heridas en comparación con el placebo al aumentar la re-epitelialización en un modelo de ratones diabéticos con cicatrización de heridas.

Podemos concluir que AG26 y AG28 son formulaciones tópicas que pueden mejorar la cicatrización de heridas sin tener efectos sistémicos.

Ejemplo 7. Efectos del estetrol en ensayos in vitro relevantes para heridas

Se realizaron ensayos in vitro para determinar la dosis efectiva de E4 en los tipos de células relevantes para las heridas (fibroblastos, queratinocitos y células inmunitarias), lo que permitió seleccionar la dosis de E4 para estudios de formulación clínica. En segundo lugar, se ha establecido una comprensión mecanicista de los efectos de E4 en las funciones celulares relacionadas con la herida.

1.0. Métodos

1.1. Células humanas y murinas

Se aislaron fibroblastos dérmicos humanos primarios (HDF) de piel abdominal o de pierna. Se adquirieron queratinocitos epidérmicos humanos normales neonatales primarios (NHEK) (Lonza). Se aislaron fibroblastos dérmicos murinos (MDF), queratinocitos epidérmicos murinos (MEK), macrófagos peritoneales murinos y médula ósea murina de ratones C57/B16 (p), NDb (Lepr+/-) o Db (Lepr-/-).

1.2. Cultivo de fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos

Los fibroblastos se aislaron y cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS inactivado por calor, 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de anfotericina B. Al menos 4 días antes de realizar los ensayos, las células se cambiaron a DMEM suplementado con 5% de FBS desprovisto de carbón.

Los HEK neonatales se cultivaron en EpiLife suplementado con 15% de suplementos para el crecimiento de queratinocitos humanos (HKGS) y 1 % de penicilina/estreptomicina. Los MEK se cultivaron en medio basal CnT suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de anfotericina B.

1.3. Ensayos en Heridas por Raspado

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron para formar una monocapa confluyente, y luego se rasparon con una punta de pipeta de 1 ml. Los pocillos se trataron con E2, E4 y/o varios agonistas y antagonistas de los receptores de estrógeno. Las soluciones madre de E2, E4 y PHTPP se disolvieron en etanol (EtOH) de modo que la concentración final de EtOH en el medio de crecimiento (GM por sus siglas en inglés) no excediera el 0.1%. ICI, PHPTT, MPP, PPT y DPN se disolvieron en DMSO de modo que la concentración final de DMSO en el GM no excediera el 0.05%. Se incluyó un control de vehículo que contenía la concentración equivalente de EtOH y/o DMSO, además de un control negativo sin tratar. Todos los tratamientos se diluyeron a concentraciones de trabajo en medios suplementados con FBS al 2% desprovisto de carbón. Para visualizar los raspados en el criterio de valoración definido, las células se tiñeron con violeta de cristal y se obtuvieron imágenes en un microscopio brightfield Nikon E400. El cierre del raspado se determinó de múltiples mediciones independientes por pocillo.

1.4. Cultivo de células THP1

Las células THP1 se mantuvieron en medio de crecimiento RPMI suplementado con 10% de FBS inactivado por calor y 1% de penicilina/estreptomicina. Las células se sembraron en placas de 12 o 6 pocillos a 2×10^5 células/ml y se trataron con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) para inducir la diferenciación a macrófagos. Las células se cultivaron durante 24 horas en medio de crecimiento completo sin PMA, seguido de una privación de suero de 6 horas antes de la polarización. Las células se polarizaron a macrófagos M1 utilizando 20 ng/ml de IFN- γ y 10 pg/ml de LPS (de *E. coli*) durante 6 o 24 horas y se recolectaron para el aislamiento de ARN o citometría de flujo.

1.5. Aislamiento y Cultivo de Macrófagos Derivados de Médula Ósea Murina

Los huesos se lavaron con DMEM suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de anfotericina B. Se sembraron células de médula ósea en placas de 12 o 6 pocillos a 1×10^6 células/ml en DMEM suplementado con 10% de FBS y 10% de medio acondicionado con L929 para inducir la diferenciación. Tras 7-10 días, los macrófagos diferenciados se trataron con 10^{-7} M de E2 o E4 en medio de crecimiento sin suero durante 16 horas y se polarizaron a células de tipo M1 utilizando 100ng/ml de IFN- γ y 1 μ g/ml de LPS. Tras 6 o 24 horas de polarización, se recogieron células para el aislamiento de ARN o la citometría de flujo.

1.6. Aislamiento y Cultivo de Macrófagos Peritoneales Murinos

Se aislaron macrófagos peritoneales de ratones C57/Bl6 mediante lavado peritoneal. La cavidad peritoneal de los ratones eutanasiados se llenó con 5 ml de PBS helado suplementado con 3% de FBS. El líquido de lavado que contenía células se extrajo con una aguja y una jeringa, y las células

se sembraron en placas de 12 o 6 pocillos a 1×10^6 células/ml en medio de crecimiento RPMI suplementado con 10% de FBS desprovisto de carbón y 1% de penicilina/estreptomicina. Se trataron con 10^{-7} M de E2 o E4 en medio de crecimiento sin suero durante 16 horas y se polarizaron a células de tipo M1 utilizando 100 ng/ml de IFN- γ y 1 μ g/ml de LPS. Tras 6 o 24 horas de polarización, se recogieron células para el aislamiento de ARN o la citometría de flujo.

1.7. Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real

Después de los tratamientos, los macrófagos humanos y murinos se recogieron en Trizol y el ARN se aisló utilizando el kit de aislamiento de ARN Trizol plus (Invitrogen, Thermo Fisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN se transcribió de forma inversa a ADNc utilizando la transcriptasa inversa GoScript (Promega). La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo utilizando una mezcla maestra 2 $\times$ Takyon SYBR Green y un termociclador CFX Connect. Los cebadores para ER α y ER β se utilizaron para explorar los cambios en la expresión de ER después del tratamiento de MEK y MDF con E2 y E4. Para investigar el efecto de E2 y E4 en la diferenciación de MEK y la expresión de proteínas de ECM por MDF, se utilizaron cebadores para Snail, queratina-1 y fibronectina, colágeno I, MMP-2 y MMP-9. Los cebadores para *iNOS*, *IL-1 β* y *Tnf- α* o *Ccl17* se utilizaron para evaluar el estado de polarización M1/M2. Se utilizaron cebadores para GAPDH para normalizar los datos. La expresión de genes relativa se estableció en los controles del vehículo o en la expresión de M0, a menos que se indique lo contrario.

1.8. Análisis estadístico

La importancia estadística se evaluó utilizando ANOVA unidireccional con análisis post hoc de Tukey o prueba t pareada según correspondiera.

2.0. Queratinocitos y fibroblastos

2.1. Tanto E2 como E4 promueven la migración de fibroblastos dérmicos humanos (HDF).

Se realizaron ensayos de raspado para cuantificar el efecto de E2 y E4 a concentraciones variables sobre la migración de HDF (Figura 14). El tratamiento con 10^{-8}M y 10^{-7}M de E2 provocó un cierre del raspado significativamente más rápido en comparación con el control del vehículo (157% y 141%, respectivamente). A la concentración más alta de E2 probada (10^{-6}M) y a las dos concentraciones más bajas de E2 10^{-8}M y 10^{-9}M , no se observó diferencia en el cierre. El tratamiento con E4 también condujo a un cierre del raspado significativamente más rápido en comparación con el control del vehículo a 10^{-8}M , 10^{-7}M y 10^{-6}M (152%, 147% y 142%, respectivamente). Por lo tanto, tanto E2 como E4 estimularon óptimamente el cierre de la herida por raspado de fibroblastos a 10^{-8}M , observándose la mayor magnitud de estimulación después del tratamiento con E2.

A continuación, se realizó un experimento adicional utilizando HDF para a) confirmar aún más los efectos de E2 y E4 en fibroblastos de un quinto donante y b) explorar el efecto relativo de incluir CS-FBS en los medios de cultivo celular. Se realizaron tres conjuntos idénticos de ensayos de raspado (comparando el vehículo con el tratamiento con E2 o E4 a 10^{-7}M) en DMEM que contenía 2% de CS-FBS, 0% de FBS o 2% de FBS (sin CS). Curiosamente, en los tres casos se observó una tendencia en la que tanto E2 como E4 promovieron el cierre del raspado, con la mayor promoción después del tratamiento con E4 (Figura 15). Como se esperaba, el grupo FBS (sin CS) mostró un cierre más rápido en todos los tratamientos, sin embargo, el efecto relativo de E2 y E4 fue menos evidente en este grupo.

2.2. Tanto E2 como E4 promueven la migración de fibroblastos dérmicos murinos (MDF).

Para demostrar aún más los efectos beneficiosos del E4 y fundamentar las consideraciones de dosificación para futuros estudios in vivo en modelos de ratones, realizamos ensayos de raspado in vitro en los fibroblastos dérmicos murinos (MDF). Los efectos biológicos de los compuestos estrogénicos se han demostrado ampliamente en modelos murinos, y se preveo el cambio a células aisladas de una cepa endogámica de ratón para reducir la variabilidad del modelo en comparación con el uso de células aisladas de donantes humanos.

Al igual que en los HDF, el tratamiento de los MDF con E2 o E4 aumentó significativamente el cierre de raspado en comparación con el tratamiento control de vehículo (Figuras 16 y 17). En células de un solo ratón, la magnitud del efecto del tratamiento con E4 fue menor que la del tratamiento con E2, sin embargo, el rango efectivo pareció ser más amplio (importancia a 3 concentraciones para E4 frente a 2 concentraciones para E2; Figura 16). Al añadir datos de 2 ratones adicionales y comparar células de bajo y alto paso, se reveló una magnitud del efecto ligeramente mayor para E4 que para E2 (Figura 17). Además, los efectos beneficiosos tanto de E2 como de E4 fueron mayores en células de alto paso, de acuerdo con las expectativas clínicas.

2.3. El tratamiento con E2 y E4 aumenta la expresión de ER de fibroblastos, mientras que E4 promueve la expresión de fibronectina e inhibe la actividad de MMP.

Los fibroblastos murinos cultivados in vitro se trataron con E2, E4, DPN o PPT a 10^{-7} M. Como se informó previamente, el tratamiento con E2 aumentó la expresión tanto de ER α como de ER β , mientras que el tratamiento con agonistas de ER aumentaba preferiblemente la expresión de su respectivo receptor (p. ej., PPT aumentaba la expresión de ER α y DPN aumentaba la de ER β ; Figura 18). Todos los tratamientos también mostraron una

fuerte tendencia hacia el aumento de la expresión de MMP2 y MMP9 (Figura 18). A continuación, se realizó una zimografía en sobrenadantes celulares de HDFs tratados con E2 o E4, para evaluar el efecto de E2 y E4 en la actividad de MMP derivada de células. A través de células de 3 donantes independientes, tanto E2 como E4 redujeron significativamente la actividad de MMP2 frente al control (Figura 19). La magnitud del efecto (y la importancia estadística) fue mayor en las células tratadas con E4. No se detectó actividad de MMP9 en ningún grupo de tratamiento. Finalmente, exploramos el efecto de E2 y E4 en la expresión de genes de la matriz extracelular en fibroblastos murinos, específicamente colágeno 1 (*Col1a1*) y fibronectina (*Fn1*) (Figura 20). En células derivadas de ratones del tipo silvestre, no se observó ningún efecto tras el tratamiento. Sin embargo, al tratar células derivadas de ratones diabéticos (db/db) con E2 o E4, se observó una tendencia hacia un aumento de la expresión tanto de *Col1a1* como de *Fn1* (Figura 20). Este aumento de la expresión alcanzó importancia estadística para la fibronectina (*Fn1*) solo en células derivadas de db/db tratadas con E4.

2.4. E2 y E4 promueven la migración de queratinocitos epidérmicos y modulan la expresión de genes epidérmicos relevantes para la herida.

Los efectos de E2 y E4 en la migración de queratinocitos se evaluaron utilizando queratinocitos epidérmicos humanos normales primarios (NHEKs). Los experimentos se realizaron en un rango de medios de crecimiento (con concentraciones variables de suplemento de crecimiento de queratinocitos humanos (HKGS)). Los datos se muestran para células cultivadas tanto en suplementación de HKGS al 15% como al 30% (Figura 21). En ambas condiciones, E2 y E4 en el rango de 10^{-7} / 10^{-8} M mostraron una fuerte tendencia a un cierre más rápido de la herida. Curiosamente, esto solo alcanzó importancia

estadística para 10^{-7}M de E2 y 10^{-7}M de E4 en 15% HKGS, con una magnitud de efecto ligeramente mayor y superior importancia estadística observada para E4.

A continuación, cambiamos a queratinocitos epidérmicos de ratón primarios (MEKs) para explorar el efecto de E2 y E4 en la expresión de genes de MEK relevante para la herida. Aunque no estadísticamente significativo, observamos una fuerte tendencia hacia la inducción de $\text{ER}\alpha$ y $\text{ER}\beta$ en células tratadas con E2 y E2 (particularmente a 10^{-7}M ; Figura 22). En consonancia con los efectos beneficiosos documentados de E2, observamos una inducción estadísticamente significativa del marcador EMT, Snail, después del tratamiento con E2 o E4 a 10^{-7}M . Por el contrario, el marcador de diferenciación Keratin 1 (*Krt1*) mostró una tendencia hacia la regulación a la baja con el tratamiento con E2 y E4. Colectivamente, estos datos sugieren un cambio a un fenotipo pro-cicatrización menos diferenciado después del tratamiento con E2 o E4. En general, los efectos observados de E2 y E4 en la expresión de genes se revirtieron con el co-tratamiento con el antagonista ICI de ER.

2.5. E2 y E4 muestran actividad anti-inflamatoria in vitro.

Los efectos anti-inflamatorios relativos de E2 y E4 se evaluaron in vitro. Primero, se utilizó la línea celular monocítica humana THP1 para filtrar diversas concentraciones de E2 y E4. Las células THP1 se diferenciaron a un fenotipo de macrófago mediante el tratamiento con PMA, seguido de la polarización a un fenotipo M1 o M2 (Figura 23). La polarización exitosa se confirmó mediante el perfil de la expresión del marcador M1 ($\text{TNF-}\alpha$) y el marcador M2 (CCL17). Se evaluaron los efectos del co-tratamiento con un rango de concentraciones de E2 o E4. En este caso, el tratamiento con E2 o E4 resultó en una fuerte tendencia hacia la reducción de la expresión de

Tnf- α en células polarizadas M1 y el aumento de la expresión de CCL17 en células polarizadas M2 (Figura 23).

Para los experimentos de seguimiento, se aislaron monocitos derivados de médula ósea murina, se diferenciaron (medio L929) y se polarizaron a un fenotipo M1 pro-inflamatorio (IFN- γ y LPS; durante 6 o 24 horas), y se co-trataron con E2 o E4 a la concentración óptima identificada en células THP1 (10^{-7} ; Figura 24). Hubo una tendencia hacia la disminución de la expresión de un rango de marcadores M1 (*iNOS*, *IL1- β* y *Tnf- α*), en presencia de E2 y E4, en comparación con el tratamiento con vehículo. Se observaron efectos similares en células polarizadas durante 6 o 24 horas (Figura 24). Luego se realizaron experimentos con monocitos derivados de médula ósea murina diferenciados a macrófagos con 30 ng/ml de MCSF, en comparación con el medio acondicionado L929. Los macrófagos estimulados con MCSF mostraron un nivel mucho mayor de expresión del marcador M1, cuando se polarizaron a M1 (en comparación con M0). Nuevamente, un rango de marcadores M1 (*iNOS*, *IL1- β* y *Tnf- α*) mostraron una fuerte tendencia hacia la reducción de la expresión en presencia de E2 y E4, en comparación con el tratamiento con vehículo (Figura 25). Cabe señalar que tanto E2 como E4 condujeron a una reducción estadísticamente significativa en el marcador M1 *iNOS* en los BMDM diferenciados con MSCF. En general, los efectos anti-inflamatorios observados de E4 fueron ligeramente superiores a los de E2.

Finalmente, se evaluaron los efectos anti-inflamatorios de E2 y E4 en macrófagos peritoneales murinos recién aislados. A diferencia del protocolo BMDM, los macrófagos peritoneales ya diferenciados se pre-trataron inmediatamente con E2 (10^{-7} M) o E4 (10^{-7} M), seguido de polarización de M1 utilizando IFN- γ y LPS durante 6 horas. En los macrófagos peritoneales, los marcadores M1 (*iNOS*, *IL1- β* y *Tnf- α*) también mostraron una

fuerte tendencia hacia la reducción de la expresión en presencia de E2 y E4, en comparación con el tratamiento con vehículo (Figura 26). Nótese que el nivel general de expresión del marcador fue mayor en estas células. La reducción mediada por E4 en *IL1- β* alcanzó importancia estadística. Los efectos anti-inflamatorios observados de E4 fueron ampliamente similares a los observados para E2.

2.6. Evaluación preliminar de los efectos específicos del ER sobre fibroblastos y células inmunitarias.

Los efectos relativos específicos del RE sobre E4 se evaluaron in vitro utilizando co-tratamiento con antagonistas altamente específicos para ER α (MPP) o ER β (PHTPP). Estudios preliminares sugieren que los efectos de E4 tanto en la migración de HDF (Figura 27) como en la polarización de BMDM (Figura 28) podrían estar mediados por ER α . Específicamente, el co-tratamiento con el antagonista de ER α MPP, parece bloquear el cierre del raspado inducido por E4 y la reducción de *IL1- β* mediada por E4, mientras que el mismo antagonista de ER α tuvo una influencia limitada en los efectos de E2. Dada la variabilidad relativamente alta, estos estudios deberían repetirse con más réplicas para confirmar los efectos observados.

2.7. Evaluación preliminar de la actividad de las formulaciones in vitro.

Para generar confianza inicial en el potencial cicatrizante de heridas de los geles formulados, realizamos una evaluación in vitro de la formulación de gel AG23 activo (ACT) y placebo (PBO), junto con EstroGel® (EG; Figura 29). Una vez más, el tratamiento con E2 y E4 amortiguó significativamente el fenotipo de las células M1, al igual que el tratamiento con EstroGel® que contiene E2. El placebo AG23 no tuvo efecto sobre la expresión relativa de *iNOS*, mientras que el AG23 ACT (conteniendo E4) redujo significativamente la expresión de

iNOS en comparación con el AG23 PBO. Estos datos respaldan la evaluación adicional de la formulación de gel con E4 en heridas humanas ex vivo.

3.0. Resumen de los Hallazgos

Se diseñaron experimentos para explorar los efectos relativos de E4 en aspectos celulares definidos de la cicatrización de heridas. Se realizó una serie de estudios in vitro usando fibroblastos, queratinocitos y células inmunitarias. Fundamentalmente, estos estudios in vitro se realizaron en células humanas y murinas, combinando la relevancia clínica de las células humanas con la validación entre especies en células murinas para respaldar el seguimiento de los estudios in vivo.

Fibroblastos. Se ha demostrado que el E4 promueve la migración de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) y murinos (MDF). En ambos casos, la concentración óptima de E4 se situó entre 10^{-7} y 10^{-8} M, similar en gran medida a la concentración óptima de E2. Cabe señalar que, en cada caso, la eficacia relativa de E2 y E4 también fue similar. En el MDS, informamos que los efectos sobre la migración fueron mayores en células de alto paso (que pueden imitar el entorno de una herida crónica). En los MDF, el tratamiento con E2 o E4 aumentó directamente la expresión celular de $ER\alpha$ y $ER\beta$. En los HDSF, el tratamiento con E4 inhibió la actividad de MMP2 en los sobrenadantes celulares, y parecía hacerlo en mayor medida que con E2. Una evaluación preliminar sugiere que $ER\alpha$ es importante para mediar los efectos de E4 sobre la migración del HDF.

Queratinocitos. Los queratinocitos epidérmicos de ratón (MEKs) también cerraron una herida por raspado con mayor rapidez al ser tratados con E4 o E2. De nuevo, la concentración óptima de E2 y E4 fue equivalente (10^{-7} M), con los efectos observados dependientes de la composición del medio de crecimiento celular. Al igual que con los fibroblastos, el tratamiento

tanto con E2 como con E4 indujo la expresión de MEK en ER α y ER β (aunque el efecto no alcanzó importancia estadística). Se demostró que el tratamiento con E2 y E4 induce la expresión del marcador de EMT Snail e inhibe el marcador de diferenciación queratina 1, ambas características de una respuesta celular pro-cicatrizante.

Actividad anti-inflamatoria. Se ha demostrado que E4 y E2 ejercen efectos anti-inflamatorios pro-cicatrizantes en macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDM), macrófagos peritoneales de ratón y células humanas THP-1. En células THP-1, E4 disminuyó la expresión de TNF- α (marcador M1) en células polarizadas M1 y aumentó la expresión de CCL17 (marcador M2) en células polarizadas M2. Tanto en los BMDM murinos como en macrófagos peritoneales, E4 redujo de forma consistente la expresión de un panel de marcadores M1 en células polarizadas M1. Este efecto se demostró tanto a las 6 como a las 24 horas postpolarización y utilizando células obtenidas con tres métodos independientes de diferenciación, L929 GM o MCSF (BMDM), o in vivo (macrófagos peritoneales aislados). En cada caso, la magnitud del efecto observado con E4 coincidió ampliamente con la observada utilizando E2. La evaluación preliminar sugiere que ER α es importante para mediar los efectos anti-inflamatorios de E4 en los BMDM. Estudios piloto revelaron una expresión reducida del marcador M1 después del tratamiento con la formulación E4 AG23.

4.0. Referencias

Campbell L, Emmerson E, Davies F, y otros. El estrógeno promueve la cicatrización de heridas cutáneas a través del receptor de estrógeno beta, independientemente de sus actividades antiinflamatoria. J Exp Med. 2010;207(9):1825-1833. doi:10.1084/jem.20100500

Grupo Colaborativo sobre Factores Hormonales en el Cáncer de Mama. Tipo y momento de la terapia hormonal menopáusica y riesgo de cáncer de mama: metaanálisis de la evidencia epidemiológica mundial en participantes individuales. The Lancet. 2019;394(10204):1159-1168. doi:10.1016/S0140-6736(19)31709-X

Roth GS, Harman SM, Lamberg SI. Regulación Ovárica Alterada de la Cicatrización de Heridas durante el Envejecimiento. Actas de la Sociedad de Biología y Medicina Experimental. 1981;166(1):17-23. doi:10.3181/00379727-166-41017

Thornton MJ. Estrógenos y envejecimiento cutáneo. Dermatoendocrinol. 2013;5(2):264-270. doi:10.4161/derm.23872

Ejemplo 8. Preparación de formulaciones de gel acuoso para estudios de estabilidad.

La Tabla 8 enumera los hidrogeles que fueron preparados para los estudios de estabilidad. La preparación se realizó como se describe para AG24 en el Ejemplo 1.

Tabla 8: Composiciones (%p/p) de formulaciones de gel acuoso de estetrol (E4) preparadas para estudios de estabilidad.

Formulación	1	2	3	4	5
Estetrol (E4)	0.06	0.40	0.50	0.06	0.50
PEG 400	43.95	43.95	43.95	43.95	43.95
Transcutol® P	1.00	1.00	1.00	2.50	2.50
Agua (1ª adición)	48	48	48	48	48
Carbopol® 980	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
hidróxido de sodio	Ajustar a pH 6-6.5				
Agua (2da adición)	q.s. 100%				
TOTAL	100				