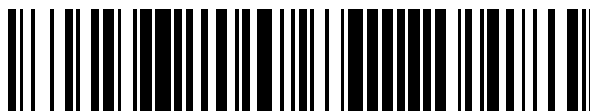


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 397**

51 Int. Cl.:

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 33/38 (2006.01)

A61K 9/12 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2011 PCT/IB2011/054923**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12066447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2011 E 11799117 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2640401**

54 Título: **Composiciones con actividad antibacteriana y de curación de heridas**

30 Prioridad:

19.11.2010 IT PD20100349

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2016

73 Titular/es:

**FIDIA FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Ponte della Fabbrica 3/A
35031 Abano Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**GENNARI, GIOVANNI;
MENON, GIAMPAOLO y
PANFILO, SUSI**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 588 397 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones con actividad antibacteriana y de curación de heridas

Campo de la invención

- La presente invención se refiere a una composición a base de plata y ácido hialurónico, a una formulación farmacéutica que comprende dicha composición, a su uso en el tratamiento de lesiones cutáneas y heridas y a un aparato que comprende dicha composición.

Antecedentes de la invención

- Las lesiones cutáneas agudas o crónicas de diverso origen se tratan mediante la aplicación de dispositivos médicos para ayudar a la cicatrización de heridas, favorecer la revascularización, absorber el exudado y, en su caso, ejercer una acción antibacteriana /antimicrobiana.

Normalmente, el exudado es la consecuencia del aumento de permeabilidad de los capilares en el tejido inflamatorio. El exudado tiene la tarea de limitar el proceso patológico, evitando la difusión de microorganismos y bloqueando la acción de posibles antígenos peligrosos mediante un mecanismo inmunitario.

- Por el contrario, en las lesiones crónicas el exudado se produce de una manera anormal y determina un bloqueo del proceso de reparación de tejidos por la destrucción de las proteínas de la matriz extracelular y de los factores de crecimiento, y por la inhibición de la proliferación celular. Clínicamente, la hiperexudación puede determinar la maceración de la piel perilesional y favorecer la infección, en particular, por las especies bacterianas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* y por hongos, tales como *Candida albicans*.
- Además, la hiperproducción de exudado da como resultado la necesidad de sustitución continua de los vendajes para heridas. En estas situaciones, ni la incomodidad sentida por el paciente que ve a su calidad de vida empeorada por la constante necesidad de atención médica ni el consiguiente aumento de los costos sanitarios debe subestimarse.

- Hoy en día, numerosos dispositivos que contienen agentes antibacterianos están disponibles en el mercado y tienen características diferentes dependiendo de la aplicación a la que se destinan. Entre otros, espumas, adhesivos o no, a base de poliuretano e hidrocoloide (Contreet®) o a base de hidrofibra (Aquacel Ag); redes de multicapa de polietileno (Acticoat®). Deben mencionarse gasas que contienen polvos absorbentes. Estos productos se caracterizan por un soporte polimérico absorbente y un metal, en especial plata. Las propiedades antibacterianas de la plata son bien conocidas (Fraser, J. F. *et al.* *ANZ J. Surg.* 2004, 74, 139-212) y en general están relacionadas con la forma oxidada de plata iónica. La plata inhibe la síntesis de proteínas estructurales que componen la pared bacteriana evitando su formación, y se une a las proteínas enzimáticas de ADN bacteriano, lo que altera su funcionalidad. Sin embargo, dichos enlaces se producen de una manera inespecífica, es decir la plata actúa tanto sobre las células bacterianas presentes en la herida como en torno a las células cutáneas/dérmicas, lo que produce toxicidad de la plata para el paciente herido. De hecho, la plata inhibe la proliferación de los queratinocitos y los fibroblastos (componentes fundamentales de la dermis y epidermis), lo que ralentiza la regeneración del lecho de la herida sobre la que se aplica, y esto es perjudicial para completar la curación de la lesión, de tal manera que a partir de los resultados de algunas pruebas *in vitro* en cultivos de queratinocitos, algunos van tan lejos como recomendar evitar la aplicación de dispositivos a base de plata (Lam, P. K. *et al.* *Br. J. Biomed. Sci.*, 2004, 61, 125-127). Además, la plata es un agente de sensibilización, sobre todo cuando se aplica durante períodos largos, tal y como ocurre en el caso de las úlceras de decúbito, quemaduras o heridas de curación lenta en general ("*Chronic exposure to Silver or Silver salts, Industrial Hygiene and Toxicology*" de Patty, Vol. 2, G. D. Clayton, F. E. Clayton, Eds. Wiley-Interscience, Nueva York, 3ª Ed., 1981, págs. 1881-1894).

El ácido hialurónico (AH) es un heteropolisacárido, es decir, un polímero, que puede tener una amplia gama de pesos moleculares, generalmente correlacionados con diferentes efectos biológicos.

- La multiplicidad de efectos biológicos del AH es bien conocida, y está vinculada esencialmente a su naturaleza química.

- Las fracciones de alto P.M. (del orden de millones de Daltons) tienen muy alta viscosidad y encuentran aplicación específica en la cirugía ocular y también en los casos particulares de relleno de tejidos blandos, tanto para fines quirúrgicos como dermatocósméticos; el efecto sobre la cicatrización de heridas, en cambio, es muy controvertido de tal modo que algunos autores han demostrado efectos muy positivos sobre la proliferación celular por AH de alto P.M. medio, mientras que otros han puesto de relieve exactamente el efecto opuesto.

- Se utilizan normalmente fracciones de peso molecular intermedio (500-750 kDa) (Brun *et al.* *Osteoarthritis Cartilage*, 2003, 11, 208-16) como viscosocomplementos en artrosis y enfermedades de las articulaciones en general. Debido a que pueden generar soluciones con viscosidad que es muy similar a la del líquido sinovial, de hecho, estas fracciones ejercen una acción de lubricación mecánica. Por último, el AH de bajo peso molecular (AH oligomérico,

generalmente significa que tiene P.M. medio comprendido entre 1 y 10 kDa) tiene notable acción angiogénica; por lo tanto, favorece especialmente la revascularización de los tejidos en los que se aplica, favoreciendo la cicatrización de heridas. Además, el AH de bajo peso molecular tiene la capacidad conocida de estimulación de la movilidad celular y de activación de la migración de fibroblastos, que es obviamente de gran importancia para los procesos de

5 reparación (West *et al.*, *Science*, 1985, 228, 1324-6; Deed *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1997, 71, 251-6). Por estas razones, el AH de bajo peso molecular se emplea como un componente de numerosos productos y dispositivos con acción de cicatrización de heridas.

El documento WO9635720 se refiere a una composición que comprende sales de plata de ésteres de ácido hialurónico y varios metales incluida la plata, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio que oscila

10 entre 30.000 y 760.000 Dalton.

El documento WO8705517 describe composiciones que comprenden ácido hialurónico y varios metales incluida la plata, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio que oscila entre 50.000 y 13.000.000 Dalton.

El documento DE 102007044583 describe la utilización de una composición que comprende anticuerpo hialurónico y plata coloidal sin especificar el P.M. del ácido hialurónico.

15 El documento WO2010127647 describe un tratamiento con composiciones que comprende oxígeno activo en un gel de hidrocoloide enriquecido con ozono, seguido opcionalmente de un tratamiento con una composición de ácido hialurónico y plata coloidal. No se especifica el P.M. del ácido hialurónico en las composiciones descritas en la técnica anterior.

El documento WO0218448 se refiere a composiciones que comprenden un derivado de ácido hialurónico, específicamente el compuesto percarboxilado obtenido por oxidación del ácido hialurónico con TMPO e hipoclorito

20 sódico en presencia de bromuro sódico.

Barbucci R. *et al.* "Cu²⁺ and Ag⁺ complexes with a hyaluronane based hydrogel" *Journal of Materials Chemistry*, the Royal Society of Chemistry, Cambridge GB, vol. 12, n° 1, Octubre 2002 páginas 3084-3092 describe complejos de iones de cobre o plata con un hidrogel a base de ácido hialurónico reticulado con 1,3-diaminopropano. Esta

25 referencia también describe que los complejos que contienen una cantidad muy baja de antígeno (superior a 0,0042 mg Ag/mg de gel) son citotóxicos.

Journal of Biomedical Materials Research parte A 15 de Sep. 2009 LNKD. Pubmed: 18671256, vol. 90, n° 4, 15 de septiembre, 2009 páginas 1177-1185 se refiere al efecto biológico del ácido hialurónico sobre fibroblastos humanos. Esa referencia indica el ácido hialurónico en el intervalo de P.M. 500-1.200 kDa adecuado para la proliferación de

30 fibroblastos. En esta referencia se recomienda ácido hialurónico artificial, modificado (p. ej. incorporado en un hidrogel) para favorecer la propagación y proliferación, como ácido hialurónico natural de bajo P.M. No favorecería suficientemente las uniones celulares de los fibroblastos.

Investigative Ophtalmology and Visual Science Junio de 1992 LNKD. Pubmed 8505213 vol. 34 n° 7, junio de 1993 páginas 2313-2315 describe los efectos del ácido hialurónico sobre la proliferación celular epitelial corneal. El P.M.

35 del ácido hialurónico utilizado en esta referencia es 860.000 Daltons.

El documento WO9503786 se refiere a una composición para aerosol o espuma que comprende ácido hialurónico o sus sales o derivados. Esta referencia describe que las fracciones de ácido hialurónico de muy bajo P.M. (50 a 100.000) estimulan la reparación tisular, mientras que las fracciones con P.M. Entre 500.000 y 730.000 no poseen actividad antiinflamatoria y pueden utilizarse para sustituir fluidos endobulbares y en terapia para patologías de

40 articulaciones.

El documento WO2008031601 describe la composición curativa que comprende plata y varios polímeros hidrófilos para el recubrimiento de artículos tales como catéteres y endoscopios con actividad antibacteriana y para reducir la adhesión bacteriana. El ácido hialurónico se menciona entre otros polímeros hidrófilos.

El documento DE102005008299 describe partículas de plata muy porosas como agente antimicrobiano en una

45 composición grasienta útil para el tratamiento de enfermedades de la piel tal como el eccema. El ácido hialurónico se menciona, entre otras sustancias alternativas, como posible agente hidratante.

El documento WO2010051918 describe composiciones que contienen una combinación de partículas sólidas de lípidos (nanopartículas y/o micropartículas) con partículas metálicas. Esta referencia describe que las nanopartículas de lípidos aumentan la actividad antibacteriana de las micropartículas de plata pero es imperceptible acerca de las

50 posibles ventajas en cuanto a la actividad antibacteriana superior y toxicidad inferior de una combinación de micropartículas de plata y de ácido hialurónico, lo que se menciona solamente como "compuesto cosmético activo" entre otros compuestos cosméticos opcionales.

El documento DE102008031023 se refiere a una espuma para aplicación tópica que comprende una combinación de partículas de microplata y de un compuesto de origen natural (vegetal).

Uno de los objetivos de la invención es proporcionar una composición para vendaje y curación de heridas que es más eficiente y menos tóxica que los actualmente disponibles para el tratamiento de lesiones de la piel.

Otro objeto de la invención es satisfacer la necesidad clínica de vendajes con un agente activo antifúngico/antimicrobiano fuerte mientras se minimizan los efectos inhibidores sobre la regeneración de tejidos y la toxicidad en los tejidos a tratar.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una composición que comprende ácido hialurónico y plata, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderado entre 130 y 230 kDa y en donde la plata está en forma metálica coloidal o en forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" con un tamaño de partícula medio entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g y la concentración de plata en dicha forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" o en dicha forma coloidal entre 1 y 3% en peso.

La presente invención también proporciona una formulación farmacéutica que comprende dicha composición y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe el uso de dicha composición como medicamento, en particular para el tratamiento tópico de lesiones y/o heridas cutáneas superficiales y/o de cavidad pequeña.

La presente invención se refiere también a un aparato para dispensar dicha composición en forma de un aerosol anhidro, una espuma o un gel hidrófilo, que son adecuadas para aplicación cutánea.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la evaluación (Experimento 1) de la proliferación celular *in vitro* de los fibroblastos humanos cultivados en presencia de AH con diferentes fracciones de peso molecular medio ponderado que van desde 5.000-10.000 Da (muestra i) hasta 1.500.000-3.200.000 Da (muestra v).

La figura 2 muestra el efecto del AH con fracciones de peso molecular medio ponderado diferentes, es decir, 5.000-10.000 Da (muestra i), 10.000-15.000 Da (muestra ii) y 200.000 Da (muestra iii) sobre la expresión de fibronectina.

La figura 3 muestra el efecto del AH con fracciones de peso molecular medio ponderado diferentes, es decir, 5.000-10.000 Da (muestra i), 10.000-15.000 Da (muestra ii) y 200.000 Da (muestra iii) sobre la expresión de colágeno de tipo I.

La figura 4 muestra los efectos sobre la proliferación de fibroblastos sanos de composiciones de la invención que comprenden plata coloidal metálica (A) y plata metálica micronizada (B) en comparación con una referencia y una formulación disponible en el mercado que comprende plata metálica coloidal que no comprende ácido hialurónico (C) a concentraciones de 5 y 30 mg/ml después de 3 o 5 días de cultivo.

La figura 5 muestra la actividad de las composiciones A-C sobre el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).

Descripción detallada de la invención

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "peso molecular medio ponderado" quiere decir calculado con el método de "viscosidad intrínseca" (Terbojevich *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 1986, 363-377).

Como se emplea en la presente memoria, "estructura esponjosa" quiere decir un material completamente poroso, con estructura de células abiertas y/o células cerradas, con área superficial de 5 m²/g o superior.

La presente invención se refiere a una composición que comprende ácido hialurónico y plata, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderado entre 130 y 230 kDa y en donde la plata está en forma metálica coloidal o en forma metálica micronizada con una estructura "esponjosa" porosa.

La composición descrita en la presente memoria favorece la curación de las lesiones de varios tipos (agudas, crónicas, úlceras de diversa etiología, quemaduras, llagas) eliminando infecciones bacterianas y/o fúngicas y favoreciendo la cicatrización del tejido dañado. Se descubrió sorprendentemente que estas ventajas se obtienen con una composición que comprende ácido hialurónico que tiene un peso molecular (P.M.) medio ponderado bien definido que, como se describe en la presente memoria, estimula la proliferación de fibroblastos humanos, con la consiguiente deposición de colágeno y fibronectina, y es protector contra los daños y perjuicios que la plata puede producir en estas células.

La plata lleva a cabo la actividad antibacteriana de la composición conocida en la técnica, está disponible en el mercado en forma de sales (p. ej., nitrato, sulfato, carbonato y otros, disponible p. ej. en Sigma Aldrich), o de metal coloidal, es decir, asociada a pequeñas proteínas que mejoran su estabilidad, o en forma metálica.

Entre los diversos tipos de plata metálica, se descubrió sorprendentemente que la plata metálica micronizada es adecuada para el propósito de la invención con las siguientes características:

- tamaño medio de partícula de 2-18 micrómetros, preferiblemente 10 micrómetros
- microestructura "esponjosa" (SL) con gran porosidad lo que aumenta considerablemente el área superficial ($\geq 5\text{m}^2/\text{g}$);
- alta pureza (preferiblemente $> 99,5\%$);

(en lo sucesivo "plata metálica micronizada esponjosa").

Dicha peculiar estructura porosa "esponjosa" favorece una mayor liberación, tanto inmediata como mantenida, de iones Ag (Ag^+) en el lecho de la herida, lo que se traduce en una mayor actividad antimicrobiana y antifúngica en comparación con las formas de plata que se utilizan con más frecuencia, como se demuestra por los resultados de los experimentos más adelante.

En particular, plata metálica micronizada "esponjosa" como la comprendida en la composición de la invención no mancha la piel ni la ropa, además tras la exposición a la luz solar, no tiñe la herida de marrón cuando el exudado está presente y es más fácil de manejar en la preparación de formas farmacéuticas según la invención. El tamaño de partícula a microescala hace que la plata metálica micronizada "esponjosa" se pueda mezclar fácilmente con otros componentes. La plata metálica coloidal, en cambio, debe someterse a un proceso de micronización en primer lugar, especialmente cuando se desea administrar en forma de pulverización, a fin de evitar obstrucciones debido a la formación de grumos de polvo.

La plata utilizada para la composición de la presente invención puede ser plata metálica micronizada coloidal o "esponjosa", que se descubrió que tienen actividad antimicrobiana/antibacteriana comparable, aunque es preferible la plata metálica micronizada "esponjosa".

El ácido hialurónico (AH) es un heteropolisacárido de cadena lineal compuesto de restos de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina alternados, con el peso molecular medio ponderado que puede oscilar entre 400 y 3×10^6 Da, dependiendo de la fuente de extracción o del método de preparación empleado. El ácido hialurónico, de hecho, se puede obtener por ejemplo, por extracción a partir de crestas de gallo (patente europea EP 138 572 B1), por fermentación, o por síntesis. Como ya se ha dicho, se sabe que el AH ejerce una multiplicidad de funciones en el cuerpo, que van desde el apoyo mecánico para las células de muchos tejidos tales como piel, tendones, músculos y cartílagos, hasta la hidratación de los tejidos y la lubricación de las articulaciones. Además, se sabe que el AH, mediante su receptor de membrana CD44, es capaz de modular muchos y diferentes procesos relacionados con la fisiología y biología celular, tales como la proliferación celular, la migración, la diferenciación y la angiogenia.

Cada uno de estos efectos es esencialmente atribuible a las fracciones de AH con diferentes pesos moleculares, y especialmente la acción de reparación de tejidos es muy evidente en fracciones de AH con un peso molecular ponderado bajo (AH oligomérico) y disminuye a medida que aumenta el peso molecular. Durante varios ensayos, en cambio, se descubrió sorprendentemente que una fracción específica de AH con un P.M. medio ponderado comprendido en un intervalo entre 130 y 230 kDa, calculado con el método de "viscosidad intrínseca" (Terbojevich *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 1986, 363-377), que tiene por lo tanto un P.M. notablemente superior a los ya conocidos por su acción cicatrizante de heridas, tiene una extraordinaria eficacia hacia la proliferación de fibroblastos humanos. Además, se descubrió que el AH con un peso molecular medio ponderado entre 130 y 230 kDa mejora sorprendentemente la actividad antimicrobiana/antifúngica de la plata (forma metálica coloidal o forma metálica micronizada "esponjosa") con la que se asocia, reduciendo drásticamente su citotoxicidad. Dicha fracción de AH, después de las pruebas adecuadas, se seleccionó para las composiciones objeto de la presente invención, de las que se demuestra, mediante los experimentos descritos en la presente memoria, tanto la eficacia contra los patógenos durante los tratamientos habituales y la reducción de toxicidad contra los fibroblastos humanos, con el consiguiente aumento de la actividad de curación de heridas. Sorprendentemente, el AH utilizado en las composiciones de la presente invención puede proceder de una fuente extractiva, fermentación (de *Streptococcus*) o biosintética (de *Bacillus*), preferiblemente de una fermentación o de una fuente biosintética, y tiene un P.M. medio ponderado comprendido entre 130 y 230 kDa, preferiblemente entre 145 y 210 kDa, e incluso más preferiblemente entre 160 y 200 kDa; este último por brevedad en adelante se define como AH de P.M. medio ponderado de 160-200 kDa. Se puede adquirir en numerosas empresas (por ejemplo, Lifecore Biomedical; QP Corp.; Seikagaku; Shiseido; Fidia Farmaceutici) que pueden proporcionar AH con las especificaciones deseadas relativas al P.M.

En contra de las expectativas, se descubrió que las fracciones de ácido hialurónico que tiene un peso molecular medio ponderado notablemente mayor que el de las fracciones oligoméricas tienen influencia positiva más fuerte sobre la proliferación de fibroblastos que el de las fracciones oligoméricas. La composición que comprende estas fracciones específicas de AH y plata demuestra una mejora del efecto antibacteriano/antifúngico y también una toxicidad reducida frente a los fibroblastos en comparación con composiciones habituales a base de plata solo en pruebas específicas.

Por ejemplo, con referencia a la tercera columna de la figura 4, la composición de la invención, que comprende estas

fracciones específicas de AH y plata, estimula el crecimiento de fibroblastos con respecto a la muestra de referencia, mientras que se observa una reducción de fibroblastos con respecto a la referencia utilizando plata coloidal, sin AH, en una cantidad total tan baja como un tercio de la de la prueba con la composición de la invención.

Esto significa que la composición de la presente invención representa un progreso claro e impredecible sobre los últimos adelantos de la técnica, que es más eficiente y menos tóxica que las composiciones actualmente disponibles para el tratamiento tópico de las lesiones cutáneas descritas.

En base a los resultados de los experimentos descritos más adelante, se descubrió inesperadamente que la composición de la invención que comprende AH con un peso molecular medio ponderado de 160-200 kDa y plata metálica coloidal o micronizada "esponjosa" tiene las siguientes propiedades sorprendentes:

- 10 - una capacidad sin precedentes y notable por el AH con un peso molecular medio ponderado de 160-200 kDa para estimular la proliferación de fibroblastos;
- actividad antibacteriana, relacionada con la presencia de plata coloidal o plata metálica micronizada "esponjosa", que es al menos comparable a la de los tratamientos convencionales contra microorganismos que se encuentran generalmente en las heridas infectadas;
- 15 - en particular cuando se utiliza plata metálica micronizada "esponjosa", la composición de la invención es más activa que los tratamientos habituales contra el SARM, que es particularmente difícil de contrastar;
- toxicidad muy baja o ausente para con fibroblastos cutáneos;
- actividad antibacteriana ejercida también en presencia de cantidades de plata inferiores al 50% de la formulación disponible en el mercado, manteniendo al mismo tiempo la capacidad del AH para estimular la
- 20 proliferación de fibroblastos.

Por estas razones, la composición de la invención es especialmente ventajosa con respecto a las composiciones conocidas en la técnica anterior y sobre las composiciones actualmente disponibles para el tratamiento de lesiones cutáneas y heridas emergentes, por ejemplo, de lesiones cutáneas y/o heridas de diverso origen (agudas, crónicas, úlceras de etiología diversa, quemaduras, llagas).

- 25 Preferiblemente, en la composición de la invención el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderado entre 145 y 210 kDa.

Preferiblemente, en la composición de la invención el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa y la plata está en forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa".

- 30 En la composición de la invención la plata en forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" tiene un tamaño de partícula medio entre 2 y 18 micrómetros y un área superficial no inferior a 5 m²/g.

Preferiblemente, en la composición de la invención el ácido hialurónico tiene una concentración entre 0,1 y 2% p/p de la composición total, más preferiblemente entre 0,1 y 0,5% p/p de la composición total y, aún más preferiblemente 0,2% p/p de la composición total.

- 35 En la composición de la invención la plata en forma metálica coloidal o la plata en forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" tiene una concentración entre 1 y 3% p/p de la composición total, preferiblemente de 2% p/p de la composición total.

Una composición según la presente invención puede estar en forma de polvos, soluciones o suspensiones, para administrarse en diversas formas, entre las que se prefieren gel hidrófilo, espuma, aerosol anhidro, ya que presentan algunas características especialmente deseadas. En particular, aerosol anhidro y espuma:

- 40 • son fácilmente aplicables y sin operaciones especiales, ya que no necesitan ni cortar ni dar forma para adaptarse a la herida;
- puede aplicarse evitando el contacto con la herida, contribuyendo de esta manera a reducir las causas adicionales de contaminación;
- son perfectamente adaptables al sitio en el que se van a aplicar, es decir, una herida superficial, plana o de
- 45 todas formas con pequeñas cavidades se beneficiarán de la aplicación de una aerosol anhidro, que se distribuirá fácilmente de manera uniforme. De hecho, el polvo de ácido hialurónico presente en el aerosol anhidro, en contacto con el exudado, forma inmediatamente un gel transparente que mantiene húmeda la cavidad de la lesión en una medida que favorece la curación de heridas y al mismo tiempo la divide del medio ambiente circundante, evitando contaminaciones adicionales; en una herida profunda, hueca, será más útil aplicar una espuma en su lugar, que
- 50 llena de forma homogénea y uniforme todo el lecho de la herida, favoreciendo el contacto íntimo tanto de la curación de heridas (ácido hialurónico) como del agente antibacteriano (plata) con la parte lesionada;

- no requieren necesariamente ser cubierta con vendas, con la ventaja de simplificar la etapa de renovación del vendaje.

En cuanto a la forma de hidrogel, encuentra aplicación específica en caso de heridas no muy profundas ni con cavidades y con poco exudado; de hecho, el propio hidrogel proporciona el medio con la humedad correcta que es fundamental para el proceso de curación.

La presente invención proporciona una formulación farmacéutica que comprende una composición que comprende ácido hialurónico y plata, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderado entre 130 y 230 kDa y en donde la plata está en forma metálica coloidal o en forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" con un tamaño medio de partícula entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g y la concentración de plata en dicha forma metálica micronizada con una "estructura esponjosa" o en dicha forma coloidal entre 1 y 3% en peso, en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica de la presente invención comprende además al menos un excipiente seleccionado de un agente de suspensión, un vehículo y un propulsor.

Más preferiblemente, en la formulación farmacéutica según la presente invención, el propulsor se selecciona de un grupo que consiste en mezclas de isobutano/n-butano/propano y n-butano.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica según la invención está en forma de un aerosol anhidro, una espuma o un gel hidrófilo, que son adecuadas para aplicación cutánea.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica según la invención está en forma de un aerosol anhidro que establece como gel transparente en la cavidad de la lesión para favorecer la curación óptima de la herida húmeda.

Más preferiblemente, la formulación farmacéutica según la invención está en forma de un aerosol anhidro, que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con una concentración de 0,2% p/p, plata metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" con un tamaño medio de partícula entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g a una concentración de 2% p/p y n-butano como propulsor.

Más preferiblemente, la formulación farmacéutica según la invención está en forma de un aerosol anhidro, que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con una concentración de 0,2% p/p, plata metálica coloidal con una concentración de 2% p/p y n-butano como propulsor.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica según la invención es en forma de espuma, que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con una concentración de 0,2% p/p, plata en forma micronizada metálica con una estructura porosa "esponjosa" con una estructura porosa "esponjosa" con un tamaño medio de partícula entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g o en forma metálica coloidal con una concentración de 2% p/p y una mezcla de isobutano/n-butano/propano como propulsor.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica según la invención está en forma de gel hidrófilo que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con una concentración de 0,2% p/p, plata en forma micronizada metálica con una estructura porosa "esponjosa" con un tamaño medio de partícula entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g o en forma metálica coloidal con una concentración de 2% p/p y una mezcla de isobutano/n-butano/propano como propulsor.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición o una formulación farmacéutica como se ha descrito anteriormente para su uso como medicamento.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición o una formulación farmacéutica como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento tópico de las lesiones y/o heridas cutáneas superficiales de cavidad pequeña.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica para uso en el tratamiento tópico de las lesiones y/o heridas cutáneas cavidad superficiales y/o de cavidad pequeña está en forma de un aerosol anhidro, que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con una concentración de 0,2 % p/p, plata metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa", con un tamaño medio de partícula entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g a una concentración de 2% p/p y n-butano como propulsor.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica para uso en el tratamiento tópico de las lesiones y/o heridas cutáneas superficiales y/o de cavidad pequeña según la invención está en forma de un aerosol anhidro, que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con la concentración de 0,2% p/p, plata metálica coloidal con una concentración de 2% p/p y n-butano como propulsor.

Preferiblemente, la formulación farmacéutica para uso en el tratamiento tópico de las lesiones y/o heridas cutáneas superficiales y/o cavidad pequeña según la invención está en forma de espuma, que comprende ácido hialurónico

con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con concentración de 0,2% p/p, plata en forma micronizada metálica con una estructura porosa "esponjosa" con un tamaño medio de partícula entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g o en forma metálica coloidal con una concentración de 2% p/p y una mezcla de isobutano/n-butano/propano como propulsor.

- 5 Preferiblemente, la formulación farmacéutica para uso en el tratamiento tópico de lesiones y/o heridas cutáneas superficiales y/o de cavidad pequeña según la invención está en forma de gel hidrófilo que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con una concentración de 0,2% p/p, plata en forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" con un tamaño medio de partícula entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g o en forma metálica coloidal con una concentración de 2% p/p y una mezcla de isobutano/n-butano/propano como propulsor.

En una realización, la presente invención se refiere a un aparato para administrar la composición como se ha descrito anteriormente en forma de un aerosol anhidro, una espuma para aplicación cutánea o un gel hidrófilo.

- 15 Todos los experimentos mostrados en la presente solicitud se llevaron a cabo en fibroblastos sanos aislados a partir de biopsias de piel humana, a fin de reproducir con la mayor precisión posible la situación patológica encontrada cuando se aplica el producto final. Los ensayos de cultivo celular utilizaron un material tridimensional como soporte, para imitar con precisión el lecho de la herida que, aunque dañado, comprende una capa dérmica más profunda y una epidérmica, más superficial.

Los protocolos de investigación y materiales utilizados se describen en la presente memoria.

- 20 Experimento 1: Evaluación de la proliferación celular *in vitro* de fibroblastos humanos cultivados en presencia de AH con diferentes P.M.

En base a lo que está disponible en los últimos adelantos de la técnica, se preparan diferentes muestras de AH, y en particular:

- i. AH con P.M. medio ponderado comprendido entre 5.000-10.000 Da, preparado según el ejemplo 1 de la patente europea EP 868 437;
- 25 ii. AH con P.M. medio ponderado comprendido entre 10.000-15.000 Da, preparado según el ejemplo 2 de la patente europea EP 868 437;
- iii. AH con P.M. medio ponderado de 160.000-200.000 Da;
- iv. AH con P.M. medio ponderado 1.000.000 Da, preparado según el ejemplo 1 de la patente europea EP 535 200;
- 30 v. AH con P.M. medio ponderado 1.500.000-3.200.000 Da, Hyalubrix[®] (Migliore *et al.*, *Arthr. Res. Ther.* 2009, 11, R183);

todos a la concentración de 1 mg/ml de medio de cultivo.

- 35 Aislamiento de fibroblastos sanos de biopsias de piel humana: en resumen, después de algunos lavados en solución tampón de fosfato (PBS) adicionada con antibióticos, la biopsia se libera de tejido adiposo subcutáneo y se corta en pequeñas tiras, que se someten a digestión enzimática por la enzima dispasa durante 30 min. Al final del tratamiento, la piel se separa de la dermis subyacente, que se digiere con tripsina durante 10 min; las células se extraen a continuación por centrifugación.

Cultivo celular: las células se cultivan *in vitro* sembrando en medio de cultivo DMEM enriquecido con suero bovino fetal al 20% (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) y 1% de glutamina.

- 40 Análisis MTT: Este análisis determina cuantitativamente la presencia de actividad de succinato deshidrogenasa en células cultivadas; dicha actividad, presente sólo en las mitocondrias de células viables, se utiliza normalmente como marcador para comprobar la actividad metabólica, la viabilidad y por tanto el crecimiento de las células cultivadas. La prueba se basa en la conversión del colorante azólico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de amarillo a azul por succinato-deshidrogenasa. La cantidad de colorante azul (formazán) determinada por espectrofotometría es proporcional a la presencia de succinato-deshidrogenasa en el cultivo celular y además es
- 45 proporcional al número de células viables.

Las células se incuban con una solución de MTT de 0,5 mg/ml durante 3 h. Al final de la incubación, el colorante se extrae de la célula con una solución de extracción (90% de isopropanol, 10% de DMSO) y se lee a la longitud de onda de 540/660 nm.

- 50 Procedimiento de operación: como se ha dicho, los ensayos de proliferación de células se llevaron a cabo utilizando cultivos tridimensionales y células precisamente de siembra Hyaff 11 no tejido (preparado según el ejemplo 2 de la patente europea EP 618 817). Este es el procedimiento preferido cuando la intención es imitar la proliferación fibroblástica *in vivo*, y esto es en una dermis que consiste en una matriz extracelular tridimensional formado principalmente por ácido hialurónico y colágeno, en la que se insertan fibroblastos cutáneos.

Se siembran fibroblastos aislados (60.000) según lo anteriormente dicho en pequeñas piezas de material no tejido (1x1 cm) fijado dentro de placas adecuadas, y se mantienen en cultivo durante 24 h. Después, se añadieron diferentes muestras de AH para probar al medio de cultivo, y después de 3 días de tratamiento, se llevó a cabo el análisis MTT para evaluar la proliferación celular. La referencia consistió en fibroblastos no tratados con AH.

- 5 Resultados: como se muestra claramente en la figura 1, al contrario de lo descrito en los últimos adelantos de la técnica, las fracciones de bajo P.M. de AH no estimulan la proliferación celular. La fracción de peso molecular medio ponderado de 160-200 kDa, en cambio, tiene notable actividad proliferante, mientras que los P.M. superiores a un millón de Da resultan totalmente ineficientes, cuando no incluso tóxicos.

- La proliferación y la viabilidad de los fibroblastos se confirman también por evaluación cuantitativa de la expresión génica de colágeno de tipo I (figura 3) y fibronectina (figura 2), según el siguiente procedimiento.

- Se aislaron y cultivaron fibroblastos como se ha descrito anteriormente, y se trataron durante 3 días con muestras i, ii, iii (se excluyeron los demás debido a su efecto negativo sobre la proliferación celular); al final del tratamiento se llevó a cabo la PCR en tiempo real para evaluar la expresión génica de colágeno tipo I y fibronectina: ARN celular se extrajo utilizando el método "Trizol", siguiendo las instrucciones del proveedor (reactivo TRIZOL, Techonologies LIFE, GIBCO BRL). En resumen, se lisaron células añadiendo 1,0 ml de Trizol y se analizó cuantitativamente el ARN total midiendo la absorbancia a 260 nm. Para amplificar cada gen, se seleccionaron cebadores adecuados utilizando el programa informático Primer3 (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, EE. UU.). Se evaluó la expresión génica por PCR en tiempo real llevada a cabo con Rotor-gene TM5500 (Corbett Research, Sydney, Australia). Los resultados se resumen en las figuras 2 y 3: ellos confirman que el AH de P.M. medio ponderado 160-200 kDa determina un aumento significativo en la expresión génica de ambas proteínas en comparación con la referencia, y esto significa que los fibroblastos tratados son capaces de construir la matriz extracelular, esencial para completar la curación de las heridas.

- Conclusión: sorprendentemente, el AH de P.M. medio ponderado 160-200 kDa presentó una acción extraordinariamente eficiente en la proliferación de fibroblastos cutáneos. Dichos fibroblastos son viables y metabólicamente activos, ya que depositan matriz extracelular, por lo que son capaces de activar la reparación de tejidos cutáneos lesionados.

- Basándose en los inesperados resultados anteriores, se evalúan los efectos antimicrobianos y antifúngicos de las formulaciones presentadas en la presente memoria utilizando un producto comercializado como referencia. Los microorganismos empleados son los que normalmente están presentes en las heridas infectadas, es decir: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecium* (resistentes a la vancomicina), *S. aureus* (resistente a la meticilina) y *C. albicans*.

Se prepararon formulaciones analíticas, que contenían plata, tanto en forma coloidal como metálica, en forma de polvo, para ser disueltas en el medio del experimento.

Experimento 2: Evaluación de la actividad antimicrobiana/antifúngica de los preparados.

- Se realizaron pruebas *in vitro*, por lo tanto se prepararon formulaciones analíticas que contenían plata metálica coloidal o metálica micronizada en forma de polvos, de modo que pudieran disolverse o ponerse en suspensión para evaluar su eficacia. La formulación de referencia (R) está disponible en el mercado en forma de polvo, así como de aerosol anhidro (Katoxyn[®], Devergè M & M).

Formulación A

- 0,2% de AH sodio de P.M. 160-200 kDa
- 2% de plata metálica coloidal
- 4% de Syloid 244 (excipiente)
- caolín ligero (excipiente) c.s.p. 100

Formulación B

- 0,2% de AH sodio de P.M. 160 a 200 kDa
- 2% de plata metálica micronizado esponjosa (SL) 2% (*MicroSilver BGTM Pharma*)
- 4% de Syloid 244 (excipiente)
- caolín ligero (excipiente) c.s.p. 100

probada frente a una composición comercial patrón (formulación C - Katoxyn[®]) que consiste en

- 4,25% de plata metálica coloidal
- 1,5% de peróxido de benzofilo
- 1% de gluconato de calcio anhidro (excipiente)
- Silicato de aluminio (excipiente) c.s.p. 100

- 5 Microorganismos de ensayo: se preparó un cultivo líquido de cada microorganismo siguiendo las instrucciones del proveedor. La incubación duró 48 horas como mínimo, a fin de obtener un cultivo rico y viable; el título de cada cultivo se determinó aproximadamente por la escala de McFarland. Para algunos microorganismos se prepararon dos suspensiones de prueba inoculando en dos muestras de 100 ml de TSB (Tryptic Soy Broth; Millipore) una cantidad de cultivo líquido que contiene aproximadamente 10^3 y aproximadamente 10^6 UFC. Los inoculados se sometieron a continuación a recuento para determinar exactamente el contenido microbiano de las suspensiones a T=0.

- Muestras de formulaciones: Se extrajeron dos muestras de aproximadamente 1 g de cada formulación y se añadieron a suspensiones que contienen 10^3 y 10^6 CFU, o solamente 10^3 CFU. Las muestras así preparadas se incubaron y se mantienen en agitación lenta y constante y rotación vertical, a fin de maximizar el contacto íntimo del producto con los microorganismos y para evitar el fenómeno de sedimentación de polvo. Después de 30 min de incubación, se extrajo una alícuota, en la que se llevó a cabo el recuento del contenido microbiano de las suspensiones por la técnica de las membranas de filtrado, operando diluciones adecuadas en las muestras que contenían 10^6 CFU. Las membranas utilizadas para la filtración se transfirieron al medio TSA (Tryptone Soy Agar - Biogenetics) y se incubaron durante al menos 5 días.

- 20 El recuento del contenido bacteriano en la suspensión de ensayo se repitió después de 12 h y 24 h.

Las tablas siguientes describen, para cada formulación ensayada, los valores de reducción logarítmica de la concentración de diversos microorganismos después de diferentes tiempos de contacto.

Tabla 1 - Formulación A

| | | |
|---------------------------------|----------|----------|
| <i>E. coli</i> ATCC 8739 | 12 horas | 24 horas |
| 3×10^3 | 3 | 3 |
| 4×10^5 | 5 | 5 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 | 12 horas | 24 horas |
| 6×10^3 | 3 | 3 |
| 5×10^5 | 5 | 5 |
| <i>E. faecium</i> ATCC 700221 | 12 horas | 24 horas |
| 2×10^2 | 2 | 2 |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 12 horas | 24 horas |
| 5×10^2 | 2 | 2 |

- 25 A partir de los datos, se puede inferir que el contenido de bacterias en todos los inóculos tratados con la formulación A es prácticamente nulo tanto después de 12 h como de 24 h. Esto significa que la formulación A actúa como bactericida, y no como bacteriostático. De hecho, la Farmacopea Europea define un bactericida para uso tópico como un producto que, después de 24 h en contacto con el microorganismo, reduce su contenido por lo menos 2 logaritmos de concentración.

Tabla 2 - Formulación B

| | | |
|---------------------------------|----------|----------|
| <i>E. coli</i> ATCC 8739 | 12 horas | 24 horas |
| 3×10^3 | 3 | 3 |
| 4×10^5 | 5 | 5 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 | 12 horas | 24 horas |
| 6×10^3 | 3 | 3 |
| 5×10^5 | 5 | 5 |
| <i>E. faecium</i> ATCC 700221 | 12 horas | 24 horas |
| 2×10^2 | 2 | 2 |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 12 horas | 24 horas |
| 5×10^2 | 2 | 2 |

La formulación B tiene un perfil de actividad idéntico al de la formulación A. Esto significa que la actividad sobre los microorganismos en este experimento de plata formulada junto con el ácido hialurónico es cuali/cuantitativamente idéntica ya sea en forma coloidal o en forma metálica micronizada "esponjosa".

Tabla 3 - Formulación C

| | | |
|---------------------------------|----------|----------|
| <i>E. coli</i> ATCC 8739 | 12 horas | 24 horas |
| 3×10^3 | 3 | 3 |
| 4×10^5 | 5 | 5 |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 | 12 horas | 24 horas |
| 6×10^3 | 3 | 3 |
| 5×10^5 | 5 | 5 |
| <i>E. faecium</i> ATCC 700221 | 12 horas | 24 horas |
| 2×10^2 | 2 | 2 |
| <i>C. albicans</i> ATCC 10231 | 12 horas | 24 horas |
| 5×10^2 | 2 | 2 |

Parece evidente que también la formulación C se reproducen los resultados observados con las formulaciones A y B, pero los datos obtenidos dan lugar a una imagen absolutamente inesperada, teniendo en cuenta algunas diferencias fundamentales entre las diferentes formulaciones:

- A y B contienen una concentración de plata (2%) claramente inferior (menos de la mitad) que la de C (4,25%)
- C contiene peróxido de benzoílo (PB); como todos los peróxidos, PB es un agente oxidante de por sí, que se utiliza

muy a menudo en los preparados tópicos contra el acné exactamente por su capacidad para matar los microorganismos debido a la oxígeno liberado del mismo. La actividad de la formulación C se debe por tanto a la plata y al PB contenida en el mismo, en donde el PB actúa por un lado como un activador de la oxidación de la plata, y por otro lado como una fuente de agente antibacteriano, es decir, oxígeno.

- 5 Conclusión: todas las formulaciones probadas pueden definirse, como por Farmacopea Europea, agentes bactericidas para uso tópico. En términos de reducción del contenido bacteriano los tres preparados son cualitativa pero no cuantitativamente equivalentes, porque, absolutamente impredecible, las formulaciones A y B, que comprenden ácido hialurónico con un P.M. medio ponderado igual a 160-200 kDa, contienen menos de la mitad de la plata presente en C.
- 10 Por lo tanto, las formulaciones A y B son más eficientes que la formulación C ya que provocan el mismo efecto antibacteriano/antifúngico con una concentración de plata notablemente inferior y sin ayuda de agentes activos adicionales (oxígeno liberado de peróxido de benzoilo).

Experimento 2a: a la vista de los datos anteriores, se realiza una prueba adicional para evaluar el efecto de las composiciones A, B y C (definido anteriormente) frente a un microorganismo especialmente relevante, es decir, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM). SARM es una bacteria responsable de varias infecciones sean particularmente difíciles de tratar, en la medida en que a veces se denomina "*Staphylococcus aureus* multirresistente". De hecho, es resistente a los antibióticos β -lactámicos y a las cefalosporinas. Las infecciones por SARM son particularmente problemáticas en los hospitales en donde los pacientes con heridas abiertas o que llevan dispositivos invasivos (p. ej., catéteres) corren un alto riesgo de contaminación.

- 20 Procedimiento.

- Almohadillas de los dedos esterilizadas se contaminan con SARM (10^8 UFC en un volumen de 30 microlitros); las áreas contaminadas se dejan secar al aire durante 3 minutos, a continuación el producto que va a ensayarse (composición A, B o C) se aplica desde una distancia de unos 15 cm durante 5 segundos, con un intervalo de 3 segundos, dos veces. Cada formulación se pone en contacto con los microorganismos durante 30 min, 3 h, 6 h o 15 h en una cámara humedecida. Al final, las almohadillas de los dedos se sumergen durante 1 minuto en un medio neutralizante para bloquear la acción antimicrobiana y para recoger los microorganismos. Una muestra del medio neutralizante se diluyó adecuadamente y se sembró en un medio sólido apropiado. Las UFC se cuantifican después de 25 h de cultivo y los datos resultantes se dan a conocer en la figura 5. Es evidente que, en línea con los resultados del experimento 1, la actividad de la composición C es totalmente superponible a la de la composición A.
- 30 Sorprendentemente, la composición B, que comprende plata metálica micronizada "esponjosa" y AH con un P.M. medio ponderado de 200 kD, tiene un efecto notablemente superior, reduciendo la población microbiana más sustancialmente tanto en 30 min como en puntos posteriores en el tiempo. Este aspecto es particularmente notable, teniendo en cuenta que la cantidad de plata de la composición B es menos de la mitad de la de la formulación C.

- 35 Conclusión: todas las formulaciones probadas son eficaces también contra *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM), pero la composición B que comprende plata metálica micronizada "esponjosa" y AH con un P.M. medio ponderado de 160-200 kDa es sustancialmente más eficiente. La actividad de la composición que comprende plata metálica micronizada "esponjosa" y AH con un P.M. medio ponderado de 160-200 kDa es especialmente sorprendente, teniendo en cuenta que la cantidad de plata en esta composición es menor que la mitad de la de la composición disponible en el mercado.

- 40 En vista de los resultados del experimento 2 y 2a, el efecto citotóxico de las formulaciones se prueba frente a fibroblastos cutáneos, para comprobar si la presencia de plata anulaba el efecto ejercido por AH con P.M. medio ponderado de 160-200 kDa de peso sobre la proliferación de fibroblastos, demostrado en el experimento 1.

Experimento 3: actividad de la formulación de la invención sobre la proliferación de los fibroblastos sanos de biopsias de piel humana *in vitro*.

- 45 El aislamiento y el cultivo de fibroblastos se realizaron según el procedimiento descrito en el experimento 1. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo de marcaje con bromodesoxiuridina BrdU (Kit de bromodesoxiuridina, BioAssay™). En resumen, después de la incorporación de BrdU, las células se someten a marcaje con un anticuerpo anti-BrdU y se analizan mediante un lector adecuado.

- 50 Muestras: dada la sorprendente eficiencia de la formulación B contra SARM, por conveniencia de la formulación, se seleccionó la formulación B (basada en plata metálica micronizada "esponjosa" y AH con un peso medio de 160-200 kDa) para ser comparada con la formulación C (producto comercializado), preparando muestras a diferentes concentraciones (5 mg/ml; 30 mg/ml) de la forma siguiente.

- Se pesaron cantidades adecuadas de cada formulación, se disolvieron en DMEM (medio de cultivo celular) que contenía BrdU, y se mantuvieron en agitación durante 10 min. A continuación, la mezcla se centrifugó a 6.000 rpm durante 3 min. El sobrenadante así obtenido se puso en contacto con las células cultivadas, evaluando la proliferación de fibroblastos frente a células en DMEM con BrdU solamente (referencia).
- 55

Los resultados del experimento se resumen en la figura 4, donde la primera columna representa valores de la proliferación celular después de 3 días de incubación, y el segundo después de 5 días de incubación.

Parece inmediatamente evidente que la formulación B ejerce un efecto positivo sobre la proliferación de fibroblastos en comparación con la referencia, independientemente de la cantidad de ingredientes activos contenidos en ella. El efecto evaluado frente a la referencia es más sustancial para la muestra de 5 mg/ml y después de 3 días de contacto, pero también se observa crecimiento celular significativo en la muestra de 30 mg/ml tanto a 3 como a 5 días, siempre en comparación con la referencia.

En particular, con referencia a la tercera columna de la figura 4, se observa crecimiento de los fibroblastos con respecto a la muestra de referencia en una prueba utilizando 30 mg/ml de la composición B (que comprende 2% p/p de plata micronizada "esponjosa" y 0,2% de hialuronato sódico con un peso molecular medio ponderado de 160 -200 kDa). En cambio (figura 4, cuarta columna), se observa una reducción de fibroblastos con respecto a la referencia utilizando 5 mg/ml de composición C que comprende 4,25% de plata coloidal, es decir, una cantidad total inferior de plata (aproximadamente un tercio) con respecto a la cantidad utilizada en la prueba con la composición B a 30 mg/ml.

Una vez más, el AH de P.M. medio ponderado 160-200 kDa demuestra sus propiedades inesperadas en la proliferación celular también cuando están asociados con un agente antibacteriano/antifúngico. Los datos de estos experimentos, de hecho, demuestran que el ácido hialurónico de P.M. Medio ponderado 160-200 kDa protege los fibroblastos de la actividad citotóxica de la plata mientras que deja inalterada la actividad antimicrobiana de la plata micronizada o la plata coloidal. Los datos para la formulación C, en cambio, muestran una tendencia opuesta; ya a la concentración de 5 mg/ml a los 5 días se tienen valores de proliferación negativos en comparación con la referencia, para indicar la inhibición de la proliferación de fibroblastos, mientras que con la muestra que contiene 30 mg/ml se observa una disminución del número de fibroblastos ya después de 3 días de tratamiento, lo que indica claramente la toxicidad de la muestra. Sólo la muestra de 5 mg/ml después de 3 días de tratamiento todavía tiene un número de fibroblastos idénticos a la referencia, pero dicho resultado es absolutamente irrelevante si se compara con la formulación B equivalente que, en las mismas condiciones de concentración y tiempo de tratamiento, aumenta la proliferación de fibroblastos en más del 50%.

También en vista de los datos experimentales descritos en la presente, la composición de la invención que comprende ácido hialurónico y plata, en forma de aerosol anhidro, espuma cutánea o gel hidrófilo, es adecuada para tratamiento tópico de las lesiones cutáneas y/o heridas de diverso origen (agudo, crónico, úlceras de etiología diversa, quemaduras, úlceras) también con el exudado, y a continuación se caracterizan por un alto riesgo de infección, por ejemplo, microorganismos tales como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium* y los hongos tales como *Candida albicans*. El ácido hialurónico utilizado tiene un peso molecular medio ponderado comprendido entre 130 y 230 kDa, preferiblemente comprendido entre 145 y 210 kDa, e incluso más preferiblemente comprendido entre 160 y 200 kDa. Su concentración en la composición final puede oscilar entre 0,1 y 2% en peso (p/p), preferentemente entre 0,1 y 0,5% p/p y aún más preferiblemente es igual a 0,2% p/p. La plata, que puede ser en forma metálica coloidal o en forma metálica micronizada "esponjosa", prefiriéndose esta última forma, en vista de las ventajas anteriores. La concentración de plata en la composición final puede estar comprendido entre 1 y 3% p/p; siendo la concentración preferida igual al 2% p/p. En cuanto a las formas farmacéuticas, el hidrogel es particularmente útil para lesiones y/o heridas cutáneas bastante superficiales; el aerosol seco encuentra uso particular, con lesiones y/o heridas cutáneas planas o en pequeñas cavidades, mientras que la espuma cutánea es adecuada para aplicación en las lesiones y/o heridas cutáneas en cavidades.

En caso de aerosol anhidro y espuma cutánea, la composición según la invención comprende propulsores como n-butano o una mezcla que consiste en n-butano, isobutano y propano; en particular, n-butano es preferible en la formulación de aerosol anhidro, mientras que la mezcla de n-butano, isobutano y propano es el propulsor preferido para la espuma cutánea.

A título ilustrativo, en la presente memoria se proporcionan formulaciones y método de preparación de las formas farmacéuticas seleccionadas, que sin embargo pueden modificarse según el conocimiento del experto en la técnica de formulación.

Aerosol anhidro que comprende Ag metálica coloidal: 100 g de producto contienen

| Componentes | Cantidad | Función |
|---|----------|----------------------|
| Hialuronato de sodio (AH de sodio) P.M. 160-200 kDa | 0,20 | |
| Plata metálica coloidal 2,0 | 2,0 | Antibacteriana |
| Dióxido de silicio (Syloid 244) | 4,0 | Agente de suspensión |

| | | |
|---------------|------------|-----------|
| Caolín ligero | c.s.p. 100 | Vehículo |
| n-butano 1,3 | | Propulsor |

Ácido hialurónico micronizado y tamizado se mezcla por dilución progresiva con plata coloidal previamente micronizado. La premezcla obtenida se mezcla por dilución progresiva con dióxido de silicio. La mezcla así obtenida se mezcla por último con caolín ligero hasta homogeneidad.

- 5 El producto intermedio obtenido de la manera descrita anteriormente se somete a continuación a la distribución en cilindros presurizados.

Aerosol anhidro que comprende Ag metálica micronizada "esponjosa": 100 g de producto contienen

| Componentes | Cantidad | Función |
|--|------------|----------------------|
| Hialuronato de sodio (AH de sodio) P.M. 160-200 kDa | 0,20 | |
| Plata metálica micronizada (<i>MicroSilver BGTM Pharma</i>) | 2,0 | Antibacteriana |
| Dióxido de silicio (Syloid 244) | 4,0 | Agente de suspensión |
| Caolín ligero | c.s.p. 100 | Vehículo |
| n-butano 1,3 | | Propulsor |

- 10 Ácido hialurónico micronizada y tamizado se mezcla por dilución progresiva con plata metálica micronizada esponjosa, que tiene ya un tamaño de partícula de micrómetros. La premezcla obtenida se mezcla por dilución progresiva con dióxido de silicio. La mezcla así obtenida se mezcla por último con caolín ligero hasta homogeneidad.

El producto intermedio obtenido de la manera descrita anteriormente se somete a continuación a distribución en cilindros presurizados.

Espuma cutánea a base de plata metálica coloidal: 100 g de producto contienen

| Componentes | Cantidad (g) |
|--|--------------|
| Hialuronato de sodio (AH de sodio) P.M. 160-200 kDa | 0,20 |
| Plata metálica micronizada (<i>MicroSilver BGTM Pharma</i>) | 2,0 |
| Glicerol | 6,0 |
| Macroglicéridos de caprilcaproilo (Labrasol) | 10,0 |
| Lecitina de soja hidrogenada | 0,3 |
| Polisorbato 80 | 2,0 |
| Alcohol bencílico | 0,5 |
| Sorbato potásico | 0,1 |
| Acetato de α -tocoferol | 0,1 |

| | |
|------------------------------|-------------------|
| Agua purificada | c.s.p. 100 |
| Isobutano, n-butano, propano | Mezcla propulsora |

Se añade con agitación una dispersión de plata coloidal previamente micronizada en Labrasol a una solución que comprende hialuronato de sodio y glicerol y se mezcla hasta homogeneidad. Se añaden sorbato de potasio, alcohol bencílico, polisorbato 80, acetato de alfa-tocoferilo, lecitina de soja hidrogenada y se agitan hasta que se disuelve. Se añade agua purificada hasta alcanzar el volumen final y se agita hasta homogeneidad. La preparación

5 obtenida se filtra y se somete a distribución en recipientes presurizados.

Espuma cutánea a base de plata metálica micronizada "esponjosa": 100 g de producto contienen:

| Componentes | Cantidad (g) |
|--|-------------------|
| Hialuronato de sodio (AH de sodio) P.M. 160-200 kDa | 0,20 |
| Plata metálica micronizada (<i>MicroSilver BGTM Pharma</i>) | 2,0 |
| Glicerol | 6,0 |
| Macroglicéridos de caprilcaproilo (Labrasol) | 10,0 |
| Lecitina de soja hidrogenada | 0,3 |
| Polisorbato 80 | 2,0 |
| Alcohol bencílico | 0,5 |
| Sorbato potásico | 0,1 |
| Acetato de α -tocoferol | 0,1 |
| Agua purificada | c.s.p. 100 |
| Isobutano, n-butano, propano | Mezcla propulsora |

Se añade con agitación una dispersión de plata metálica micronizada "esponjosa" en Labrasol a una solución que comprende hialuronato de sodio y glicerol y se mezcla hasta homogeneidad. Se añaden sorbato de potasio, alcohol bencílico, polisorbato 80, acetato de alfa-tocoferilo, lecitina de soja hidrogenada y se agita hasta que se disuelva. Se

10

añade agua purificada hasta alcanzar el volumen final y se agita hasta homogeneidad. La preparación obtenida se filtra y se somete a distribución en recipientes presurizados.

Gel hidrófilo que comprende plata coloidal metálico: 100 g de producto contienen:

| Componentes | Cantidad (g) |
|---|--------------|
| Hialuronato de sodio (AH de sodio) P.M. 160-200 kDa | 0,20 |
| Plata metálica coloidal | 2,0 |
| Carbomer 974P | 1,5 |
| Glicerol | 10,0 |
| Propilenglicol | 6,675 |

| | |
|------------------------------|------------|
| Trietanolamina | 1,325 |
| PEG 400 | 6,675 |
| p-hidroxibenzoato de metilo | 0,2 |
| p-hidroxibenzoato de propilo | 0,02 |
| Agua purificada | c.s.p. 100 |

- 5 Se disuelven en agua purificada a 80°C p-hidroxibenzoato de metilo y p-hidroxibenzoato de propilo. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, se agrega hialuronato de sodio y se mezcla hasta disolución completa. A continuación, se disuelve PEG 400 y se añade Carbomer 974P manteniendo en agitación hasta que se obtiene dispersión homogénea e hidratación completa de este último. A continuación se añade trietanolamina hasta que se obtiene la gelificación de la fase acuosa. Por último, en agitación, se añaden glicerol, propilenglicol y plata coloidal previamente micronizada y se mezclan hasta homogeneidad.

Gel hidrófilo que comprende plata metálica micronizada "esponjosa": 100 g de producto contienen:

| Componentes | Cantidad (g) |
|--|--------------|
| Hialuronato de sodio (AH de sodio) P.M. 160-200 kDa | 0,20 |
| Plata metálica micronizada (<i>MicroSilver BGTM Pharma</i>) | 2,0 |
| Carbomer 974P | 1,5 |
| Glicerol | 10,0 |
| Propilenglicol | 6,675 |
| Trietanolamina | 1,325 |
| PEG 400 | 6,675 |
| p-hidroxibenzoato de metilo | 0,2 |
| p-hidroxibenzoato de propilo | 0,02 |
| Agua purificada | c.s.p. 100 |

- 10 Se disuelven en agua purificada a 80°C p-hidroxibenzoato de metilo y p-hidroxibenzoato de propilo. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, se agrega hialuronato de sodio y se mezcla hasta disolución completa. A continuación, se disuelve PEG 400 y se añade Carbomer 974P manteniendo en agitación hasta que se obtiene dispersión homogénea e hidratación completa de este último. A continuación se añade trietanolamina hasta que se obtiene la gelificación de la fase acuosa. Por último, en agitación, se agregan glicerol, propilenglicol y plata metálica micronizada "esponjosa" y se mezcla hasta homogeneidad.
- 15

- En resumen, se descubrió que una formulación que comprende AH con un peso molecular medio ponderado entre 130 y 230 kDa, preferiblemente 145 a 210 kDa y más preferiblemente 160 a 200 kDa, con plata en la concentración de 2% p/p es capaz de eliminar bacterias potencialmente patógenas y puede utilizarse de manera eficaz en terapia tópica para el tratamiento de lesiones cutáneas y heridas que se originan, por ejemplo, a partir de lesiones cutáneas y/o heridas de diverso origen en forma de aerosol anhidro o espuma cutánea o gel hidrófilo. La plata en la composición de la invención puede estar en forma metálica coloidal o en forma metálica micronizada "esponjosa", con un tamaño medio de partícula entre 2 y 18 micrómetros, un área superficial no inferior a 5 m²/g, prefiriéndose esta última forma, en vista de su actividad sorprendentemente mayor frente a las infecciones por SARM.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende ácido hialurónico y plata, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderado entre 130 y 230 kDa y en donde la plata está en forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" con un tamaño de partícula medio entre 2 y 18 micrómetros y un área superficial no inferior a 5 m²/g o en forma metálica coloidal y la concentración de plata en forma metálica micronizada con una estructura porosa "esponjosa" o en forma coloidal, está comprendida entre 1 y 3% en peso de la composición total.
2. La composición según la reivindicación 1, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderado entre 145 y 210 kDa.
3. La composición según la reivindicación 1, en donde el ácido hialurónico tiene un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido hialurónico tiene una concentración entre 0,1 y 2% p/p de la composición total.
5. La composición según la reivindicación 4, en donde el ácido hialurónico tiene una concentración entre 0,1 y 0,5% p/p de la composición total.
6. La composición según la reivindicación 5, en donde el ácido hialurónico tiene una concentración del 0,2% p/p de la composición total.
7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la plata tiene una concentración de 2% p/p de la composición total.
8. Una formulación farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. La formulación farmacéutica según la reivindicación 7, en donde al menos un excipiente se selecciona de un agente en suspensión, un vehículo y un propulsor.
10. La formulación farmacéutica según la reivindicación 9, en la que el propulsor se selecciona de un grupo que consiste en mezclas de isobutano/n-butano/propano y n-butano.
11. La formulación farmacéutica según la reivindicación 8, en forma de aerosol anhidro, espuma o gel hidrófilo que son adecuados para aplicación cutánea.
12. La formulación farmacéutica según la reivindicación 11 en forma de aerosol anhidro, que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con una concentración de 0,2% p/p, plata en forma micronizada metálica con una estructura porosa "esponjosa" o en forma metálica coloidal en concentración de 2% p/p y n-butano como propulsor.
13. La formulación según la reivindicación 11-12 en forma de un aerosol anhidro adecuado para formar un gel transparente tras la aplicación en la cavidad de la lesión.
14. La formulación farmacéutica según la reivindicación 11 en forma de espuma, que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa con una concentración de 0,2% p/p, plata en forma micronizada metálica con una estructura porosa "esponjosa" o en forma metálica coloidal en concentración de 2% p/p y una mezcla de isobutano/n-butano/propano como propulsor, o en forma de un gel hidrófilo, que comprende ácido hialurónico con un peso molecular medio ponderado entre 160 y 200 kDa en una concentración de 0,2% p/p, plata en forma micronizada metálica con una estructura porosa "esponjosa" o en forma metálica coloidal, en concentración de 2% p/p.
15. La composición según las reivindicaciones 1-7 o la formulación según las reivindicaciones 8-14 para su utilización como medicamento en el tratamiento tópico de lesiones y/o heridas cutáneas superficiales y/o de cavidad pequeña.

Figura 1

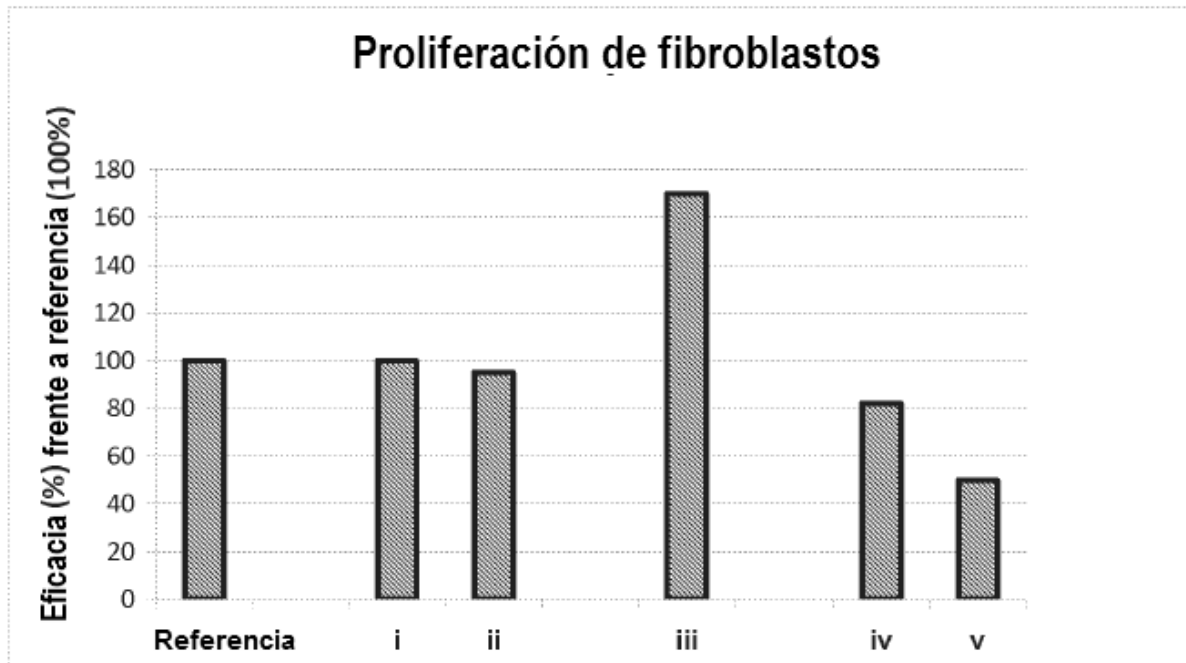


Figura 2

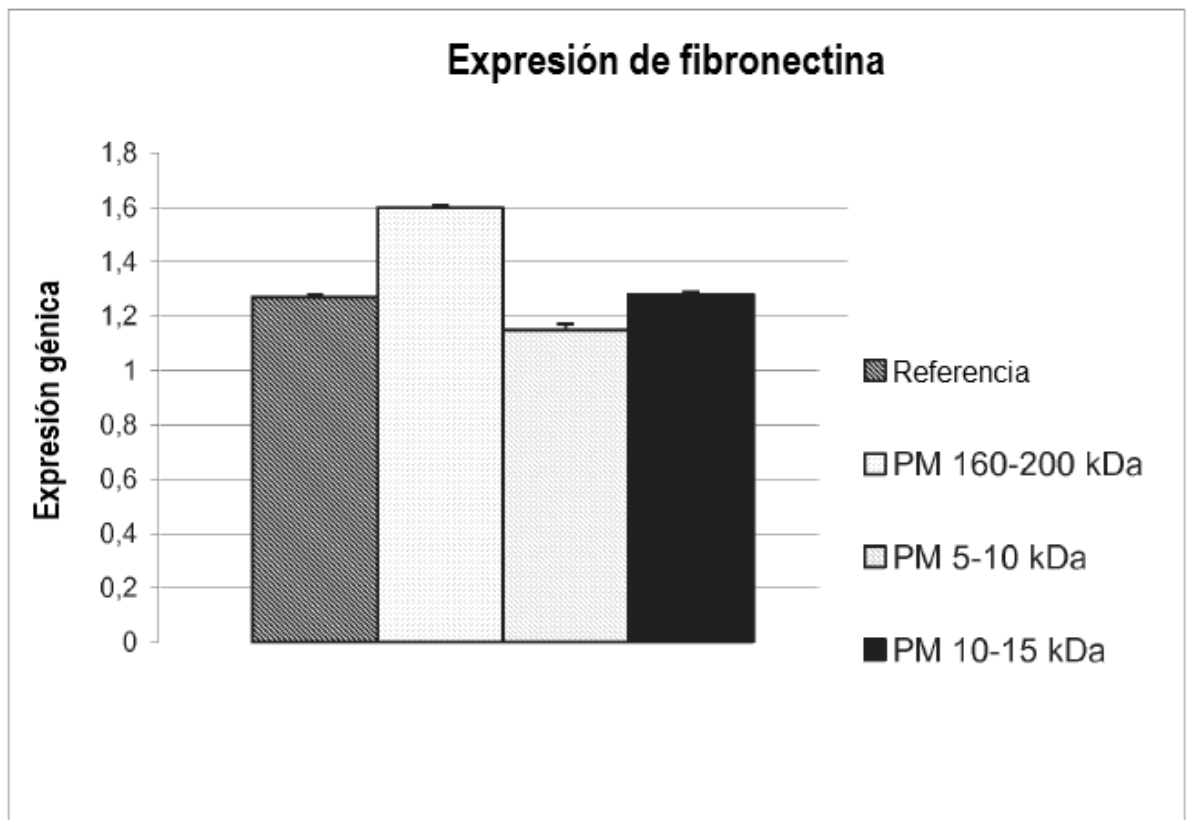


Figura 3

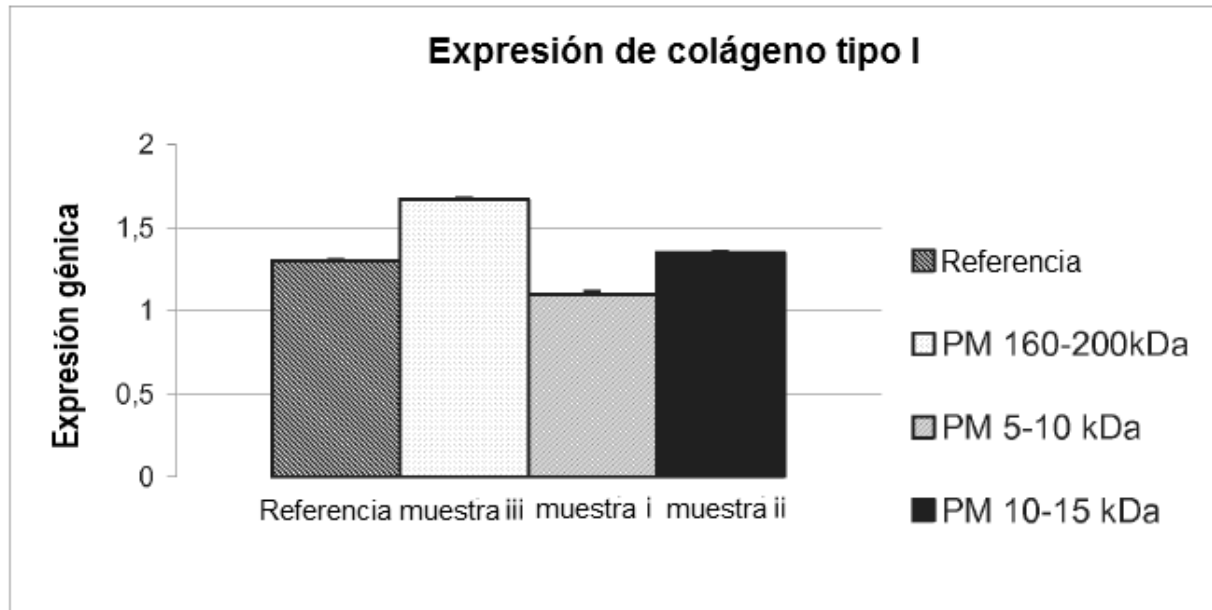


Figura 4

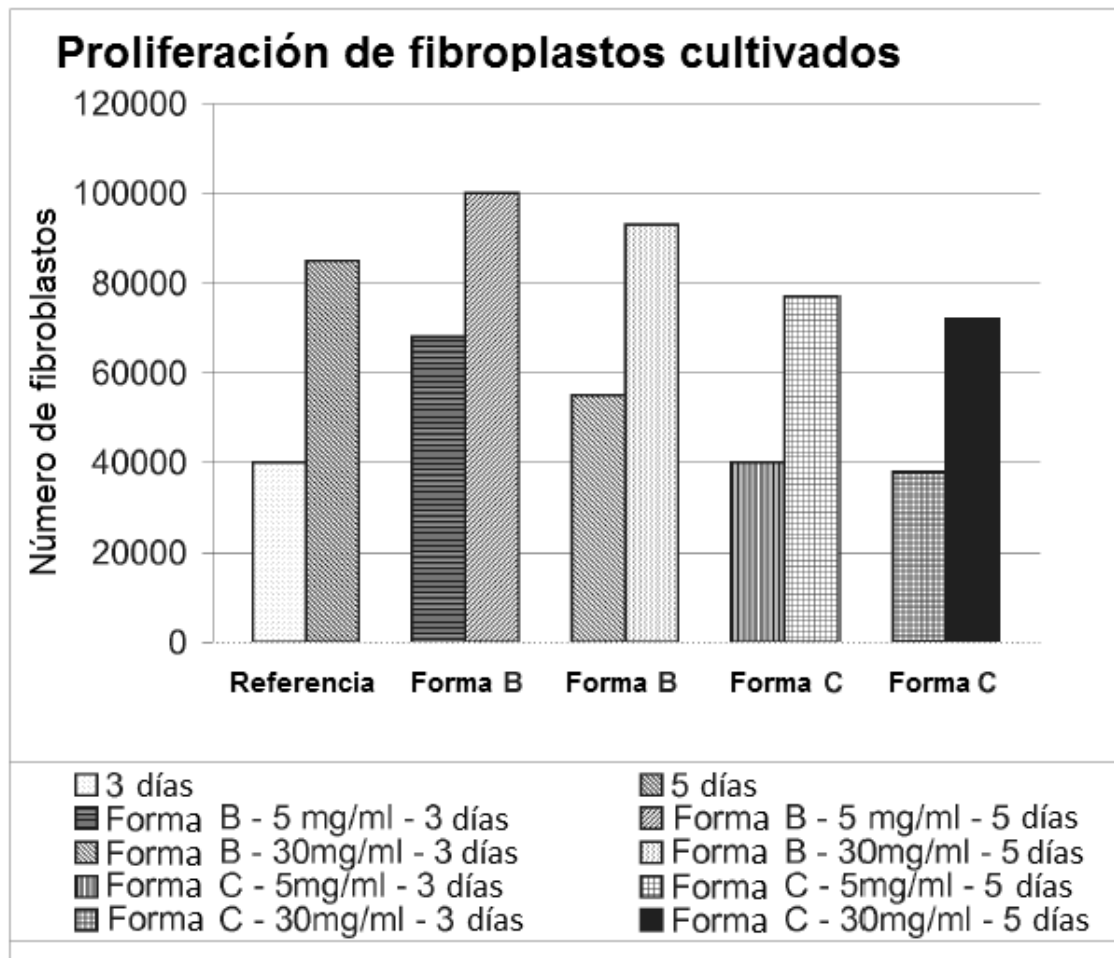


Figura 5

