



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 227 601**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

- 96 Número de solicitud europea: **96925884 .7**  
96 Fecha de presentación : **31.07.1996**  
97 Número de publicación de la solicitud: **0841937**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.1998**

54 Título: **Utilización de betaglicano para reducir la cicatrización.**

30 Prioridad: **04.08.1995 GB 9516073**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.04.2005**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **08.06.2009**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **08.06.2009**

73 Titular/es: **Renovo Limited**  
**Manchester Incubator Building**  
**48 Grafton Street**  
**Manchester M13 9XX, GB**

72 Inventor/es: **Ferguson, Mark, William, James**

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

ES 2 227 601 T5

## DESCRIPCIÓN

Utilización de betaglicano para reducir la cicatrización.

5 La presente invención tiene que ver con preparados farmacéuticos para promover la curación de heridas con cicatrización reducida.

10 Por “heridas” se entiende cualquier condición que pueda resultar en la formación de tejido cicatrizante. En particular, esto incluye la curación de heridas cutáneas, la reparación de daños tendinosos, la curación de heridas por aplastamiento, la curación de heridas oculares, incluyendo las heridas en la córnea, la curación de heridas que afecten al sistema nervioso central (CNS), condiciones que resulten en la formación de tejido cicatrizante en el CNS, formación de tejido cicatrizante como consecuencia de apoplejías, y adherencia de tejidos, por ejemplo, como consecuencia de heridas o cirugía (esto puede aplicarse, por ejemplo, a la curación de tendones y de las estricturas y adherencias abdominales).

15 Por “cicatrización reducida” se entiende un nivel reducido de cicatrización respecto a una herida no tratada.

20 En particular, hay una carencia de preparados para promover la curación de las heridas con cicatrización reducida. La formación de tejido cicatrizante, aunque proporcione fortaleza mecánica a una herida curada, puede ser de aspecto desagradable y podría mermar la función del tejido.

25 Esto ocurre especialmente en el caso de heridas que conducen a la formación de tejido cicatrizante en el CNS, pues el tejido cicatrizante inhibe la reconexión o la regeneración de terminaciones nerviosas cortadas, lo que afecta su función de manera significativa.

30 Existe también una falta de preparados para tratar y promover la curación de heridas crónicas, por ejemplo úlceras venosas, úlceras diabéticas y llagas de cama (úlceras de decúbito), especialmente entre ancianos y pacientes confinados a silla de ruedas. Tales preparados pueden resultar sumamente útiles en pacientes en los que la curación de las heridas sea o bien lenta o no se haya iniciado aún. Tales preparados pueden usarse para activar la curación de heridas y pueden entonces usarse en combinación con preparados para promover la curación con cicatrización reducida. Por tanto, no sólo puede curarse una herida crónica, sino que puede también curarse con cicatrización reducida.

35 El betaglicano (BG), también conocido como TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ , Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$ ) receptor III (RIII), es un proteoglicano membranoso ampliamente distribuido que comprende una proteína central de 100 kDa con cadenas laterales de sulfatos de heparán y condroitina acopladas a ella (véase López-Casillas *et al.*, 1991, *Cell*, 67: 785-795). El TGF- $\beta$  se combina con la proteína central de BG, y no se requieren cadenas laterales de glucosaminoglicano (GAG) para esta interacción, mientras que el FGF-2 se combina con el BG mediante cadenas laterales de sulfato de heparán (Cheifetz, S. *et al.*, 1988, *J. Biol. Chem.*, 263: 16984-16991).

40 La proteína central de BG comprende:

- 45 i. Un dominio extracelular;
- ii. un dominio transmembranoso; y
- iii. un dominio intracelular carente de estructura de señalización reconocible.

50 Las células pueden ceder el dominio extracelular mediante un punto de segmentación cercano al dominio transmembranoso, y esto parece ocurrir *in vivo* en BG soluble (solBG), encontrado en el suero (Andrés, J.L. *et al.*, 1989, *J. Biol. Chem.*, 109: 3137-3145).

55 El TGF- $\beta$  se combina con diversas proteínas de membrana (véase Massague, J. *et al.*, 1994, *Trends in Cell Biol.*, 4: 172-178 a modo de repaso), dos de las cuales, los receptores I y II de TGF- $\beta$  (RI y RII), forman un complejo receptor señalizante. El RI parece requerir la presencia de RII para combinarse con el ligando y el RII parece requerir la presencia del RI para señalizar, pero no para la combinación con el ligando (véase Wrana, J.L. *et al.*, 1992, *Cell*, 71: 1003-1014). La especificidad isoforma del receptor TGF $\beta$  puede ser conferida por los tres tipos diferentes de receptor, puesto que RI y RII se combinan con TGF $\beta$ <sub>1</sub> y TGF $\beta$ <sub>3</sub> con mucha mayor afinidad que con TGF $\beta$ <sub>2</sub>, siendo esta diferencia especialmente pronunciada en células que carecen de BG. La expresión de BG se correlaciona con la combinación elevada de todos los TGF $\beta$ s con RII, y esta correlación se vuelve particularmente evidente en el caso del TGF $\beta$ <sub>2</sub>, isoforma que tiene una baja afinidad con RI y RII en ausencia de BG (véase López-Casillas, F. *et al.*, 1993, *Cell*, 73: 1435-1444). Una función importante del BG anclado a la membrana es la presentación del TGF- $\beta$  al RII, formando un complejo ternario, aumentando así la afinidad de combinación del receptor y de la respuesta celular al TGF $\beta$ .

65 Por el contrario, la forma soluble de BG desempeña un papel muy diferente al del BG anclado a la membrana. El BG soluble se combina al TGF- $\beta$  y evita que las moléculas de TGF- $\beta$  se combinen con los receptores de la superficie celular, por lo que actúa a modo de antagonista del TGF- $\beta$  (véase López-Casillas, F. *et al.*, 1994, *J. Cell Biol.*, 124: 557-568).

## ES 2 227 601 T5

Por todo lo anterior, el BG en sus distintas formas puede actuar a modo de modulador dual del acceso del TGF- $\beta$  a los receptores señalizantes.

5 Los trabajos previos sobre los efectos de los factores de crecimiento fibróticos y no fibróticos sobre la curación de heridas (Shah, M. *et al.*, 1994, J. Cell Sci., 107: 1137-1157; Shah, M. *et al.*, 1995, J. Cell Sci., 108: 985-1002; WO 92/17206 y las referencias allí presentadas) han mostrado que, para promover la curación eficaz con cicatrización reducida, hay que inhibir de modo similar tanto el TGF $\beta_1$  como el TGF $\beta_2$ , pues los experimentos han demostrado que inhibir únicamente el TGF $\beta_2$  no produce ninguna mejora significativa en la cicatrización. El presente inventor ha descubierto ahora que, sorprendentemente, la adición de BG soluble a un sitio (por "sitio" se entiende la localización de una herida), en especial a la localización de una herida, logra la curación con cicatrización reducida.

15 La eficacia de estos resultados es especialmente sorprendente porque se lograron mediante el uso de BG soluble únicamente, que es específico fundamentalmente al TGF $\beta_2$ , no mediante el uso de BG combinado con un preparado neutralizante específico al TGF $\beta_1$ , uso que era aparentemente necesario según el estado de la técnica anterior. Los experimentos (expuestos mas abajo) muestran también que, sorprendentemente, con concentraciones particulares de solBG, el nivel de TGF $\beta_3$  en las heridas se ve incrementado. Las concentraciones más bajas de solBG parecen no tener efecto alguno sobre el nivel de TGF $\beta_3$ , mientras que las concentraciones más elevadas tienen un efecto negativo sobre el nivel de TGF $\beta_3$ . Esto resulta especialmente significativo dado que, a diferencia del TGF $\beta_1$  y del TGF $\beta_2$ , el TGF $\beta_3$  promueve la curación de heridas con cicatrización reducida (WO 93/19769), y esto puede contribuir a explicar el efecto anticicatrizante del solBG.

20 Según la presente invención, se proporciona el uso de betaglicano soluble en una cantidad suficiente y farmacológicamente eficaz para inhibir el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta_2$  (TGF $\beta_2$ ), y suficiente para incrementar el nivel de TGF $\beta_3$  en las heridas, en la fabricación de un medicamento para promover la curación de heridas con cicatrización reducida.

El betaglicano soluble puede por ejemplo incluir betaglicano soluble recombinante.

30 Por "fragmento" o "forma parcialmente modificada" se entiende una molécula capaz de combinarse con TGF $\beta_2$ , efectuando el papel del solBG descrito más arriba. La modificación parcial puede ser, por ejemplo, mediante la sustitución, eliminación o adición de residuos de aminoácidos. Una sustitución puede ser, por ejemplo, una sustitución conservada. De aquí que una forma parcialmente modificada de solBG pueda ser homóloga del solBG. Por ejemplo, puede tener al menos un 40% de homología con el solBG. Puede, por ejemplo, tener al menos 50, 60, 70, 80, 90 o 95% de homología con el solBG.

35 El solBG puede, por ejemplo, incluir como mínimo el fragmento combinante con TGF- $\beta$  de solBG.

El solBG puede promover la curación acelerada de heridas. Por "curación acelerada" se entiende una curación más rápida que la lograda en una herida de control no tratada.

40 El solBG puede estar en una concentración entre aproximadamente 0,1  $\mu$ M. Los experimentos (expuestos mas abajo) han demostrado que la eficacia del solBG en la contribución a la curación de heridas depende de la dosis. Los experimentos (expuestos mas abajo) están referidos a ratas únicamente y las concentraciones óptimas de solBG para promover la curación de heridas con cicatrización reducida en ratas u otros animales puede determinarse fácilmente mediante la experimentación.

El solBG puede tener mayor afinidad combinatoria con el TGF $\beta_2$  que con el TGF $\beta_1$  y el TGF $\beta_3$ . Puede combinarse con TGF $\beta_1$ , TGF $\beta_2$  y TGF $\beta_3$  en una proporción de aproximadamente 2:7:2, respectivamente.

50 El solBG puede disminuir la cantidad de TGF $\beta_2$  que se liga a los receptores de la superficie celular.

El solBG puede disminuir la activación por parte del TGF $\beta_2$  de los receptores de la superficie celular.

55 El solBG puede usarse en conjunción con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El solBG puede usarse en conjunción con un preparado para promover la curación de heridas con cicatrización reducida.

60 El solBG puede usarse en conjunción con un preparado para promover la curación de heridas crónicas.

El solBG puede administrarse a una localización en que haya herida.

El solBG puede administrarse en alícuotas de unos 100  $\mu$ l.

65 El solBG puede administrarse bien inmediatamente antes, bien inmediatamente después de que se produzca la herida. El solBG puede administrarse dentro de aproximadamente las primeras 120 horas tras la herida, por ejemplo unas 48 o 24 horas después de la herida.

El solBG puede administrarse dos veces por lo menos. Puede, por ejemplo, administrarse tres veces. Puede, por ejemplo, administrarse inmediatamente antes de la herida, aproximadamente 24 horas después de la herida y aproximadamente 48 horas después de la herida.

- 5 La invención resultará más evidente con la siguiente descripción que muestra, a modo de ejemplo únicamente, un procedimiento para promover la curación de heridas con cicatrización reducida mediante solBG, así como métodos para lograr tal objetivo.

## Experimental

10 Se experimentó con animales para comprobar los efectos del BG soluble (solBG) sobre la curación de heridas haciendo a los animales y tratándolos con diversas concentraciones de solBG y analizando las heridas (véase “Materiales y Métodos”). Los resultados demuestran que el BG soluble, en especial con una concentración de entre unos 0,01  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ , y más concretamente con una concentración de aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$ , parece tener gran potencial como agente anticicatrizante. Las heridas analizadas 7, 40 y 80 días tras su inflicción (pi) muestran una cicatrización significativamente mejorada (o sea, menos cicatrización) y una curación aumentada (o sea, acelerada) de heridas respecto de heridas de control.

## Materiales y Método

20 El solBG recombinante (véase López-Casillas *et al.*, 1991, *Cell*, 67: 785-795; López-Casillas, F. *et al.*, 1993, *Cell*, 73: 1435-1444; y López-Casillas, F. *et al.*, 1994, *J. Cell Biol.*, 124: 557-568) suministrado por F. López-Casillas fue disuelto en MEM (medio esencial mínimo) (exento de suero). 250 ng de solBG son equivalentes a 50  $\mu\text{g}$  de anticuerpo neutralizante (NAB) del TGF- $\beta$ . Las dosis apropiadas de solBG se calcularon a partir de las concentraciones eficaces conocidas de NAB respecto del TGF- $\beta$  (véase Shah, M. *et al.*, 1994, *J. Cell Sci.*, 107: 1137-1157; Shah, M. *et al.*, 1995, *J. Cell Sci.*, 108: 985-1002; y López-Casillas, F. *et al.*, 1994, *J. Cell Biol.*, 124: 557-568). Ratas macho adultas de Sprague-Dawley (200-250 g) fueron anestesiadas mediante inhalación de halothane, óxido nitroso y oxígeno. Se practicaron cuatro incisiones, de 1 cm de longitud y hasta una profundidad de y a través del panículo carnoso en la piel dorsal, equidistantes de la línea media y adyacentes a las extremidades. Las heridas se dejaron sin sutura, para que curaran mediante intención secundaria, para producir la máxima cicatrización. Se dejó una herida de control sin tratar en cada animal y una fue infiltrada únicamente con MEM mediante inyección como control vehicular. Se inyectó solBG en las dos heridas restantes con concentraciones de 0,001  $\mu\text{M}$ , 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$  inmediatamente antes de infligir la herida y en los días 1 y 2 tras la inflicción. Se aplicó solBG a las heridas mediante inyección intradérmica en 100  $\mu\text{l}$  de MEM a lo largo del borde de cada herida. Cuatro animales por dosis de solBG por punto temporal para las concentraciones de 0,001  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ , y dos animales por dosis por punto temporal para las concentraciones de 0,001  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  (n=48 en total). Los animales se recogieron en cada uno de los puntos temporales de 3, 5, 7 y 80 días pi. Los animales fueron muertos por sobredosis de cloroformo y las heridas se recogieron por excisión del tejido adyacente. Cada herida fue biseccionada, la mitad de la herida fue congelada rápidamente en OCT para su criosección e inmunocitoquímica y la mitad fue fijada en formaldehído para inclusión en cera e histología.

## Resultados

### Histología

45 Hubo pocas diferencias histológicas entre las heridas tratadas con las dosis más bajas de solBG (0,001-0,1  $\mu\text{M}$ ) y las heridas de control o de control vehicular cinco días tras la inflicción de las heridas. Sin embargo, las heridas tratadas con 1 y 2  $\mu\text{M}$  de solBG parecían ser mucho más estrechas que los controles, pero con mayor infiltración celular inflamatoria y más vasos sanguíneos nuevos en la base de la herida. Se hicieron observaciones similares en las heridas recogidas 7 días después de la herida.

El grado de cicatrización se examinó 80 días tras las heridas. El tratamiento con 0,001  $\mu\text{M}$  o 0,01  $\mu\text{M}$  de solBG no resultó en ninguna mejora consistente de la cicatrización comparada con los controles. Las fibras de colágeno dentro de la herida eran finas, densamente compactas y fuertemente orientadas, paralelas por lo general a la epidermis, en una típica formación de cicatriz. Sin embargo, cuando se aplicaba una dosis de 0,1  $\mu\text{M}$  a las heridas, la cicatrización subsiguiente resultaba significativamente mejorada. Las fibras de colágeno dentro de las heridas tratadas eran mucho más gruesas, más separadas y orientadas de forma más aleatoria que en las cicatrices de control, y eran más similares a la orientación de tipo “tejido de cesto” de las fibras de colágeno que se ve en la dermis normal. Una dosis de 1  $\mu\text{M}$  de solBG no resultó en ninguna mejora consistente de la cicatrización, aunque algunas de las heridas tratadas sí mejoraron, mientras que una dosis de 2  $\mu\text{M}$  o bien no resultó en mejora alguna o resultó en una cicatriz peor que la hallada en las heridas de control.

### Inmunocitoquímica

65 Las heridas recogidas tres días después de su inflicción fueron examinadas. No hubo diferencias consistentes en el contenido de fibronectina en la herida tres días después de su inflicción entre las heridas de control y las tratadas con las diversas concentraciones de solBG. La tinción para desvelar el TGF $\beta$ , reveló cantidad similares de esta citoquina, sumamente evidente dentro los monocitos y los macrófagos, en las heridas tratadas y de control, salvo cuando se apli-

## ES 2 227 601 T5

caba una concentración de 1 o 2  $\mu\text{M}$  de solBG. En estas heridas los niveles de  $\text{TGF}\beta_1$  parecían haberse incrementado respecto a los controles. Resulta interesante que la tintación para desvelar el  $\text{TGF}\beta_3$ , encontrado principalmente una vez más dentro de los monocitos y de los macrófagos, reveló un patrón diferente. La aplicación de 0,001  $\mu\text{M}$  de solBG no tuvo ningún efecto evidente sobre los niveles de  $\text{TGF}\beta_3$ , pero las dosis de 0,01  $\mu\text{M}$  y particularmente de 0,1  $\mu\text{M}$ , tratamiento este último que mostró la mayor mejoría en la cicatrización, resultaron en un aumento de la tintación para desvelar  $\text{TGF}\beta_3$ , dentro de la herida. Por el contrario, las dosis de 1  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$  resultaron en niveles inferiores de  $\text{TGF}\beta_3$  dentro de la herida respecto a los controles. Los estudios iniciales sobre los niveles de receptores  $\text{TGF}\beta$  dentro de la herida revelan una expresión aumentada del receptor de tipo I en el borde de la herida y en la dermis adyacente en heridas tratadas con 1 y 2  $\mu\text{M}$  de solBG.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 227 601 T5

### REIVINDICACIONES

- 5 1. La utilización de betaglicano soluble en una cantidad farmacológicamente eficaz y suficiente para inhibir el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta_2$  (TGF $\beta_2$ ), y suficiente para incrementar el nivel de TGF $\beta_3$  en las heridas, en la fabricación de un medicamento para promover la curación de heridas con cicatrización reducida.
2. La utilización según la reivindicación 1 en la que el betaglicano soluble sea betaglicano soluble recombinante.
- 10 3. La utilización según la reivindicación 1 ó 2 en la que el medicamento contenga betaglicano soluble en una concentración de aproximadamente 0,1  $\mu$ M.
4. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el betaglicano soluble tenga mayor afinidad combinatoria hacia el TGF $\beta_2$  que hacia el TGF $\beta_1$  y el TGF $\beta_3$ .
- 15 5. La utilización según la reivindicación 4 en la que el betaglicano soluble se combine con TGF $\beta_1$ , TGF $\beta_2$  y TGF $\beta_3$  en una proporción aproximada de 2:7:2 respectivamente.
- 20 6. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el betaglicano soluble reduzca la cantidad de TGF $\beta_2$  que se liga a los receptores de la superficie celular.
7. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el betaglicano soluble reduzca la activación por parte del TGF $\beta_2$  de los receptores de la superficie celular.
- 25 8. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el betaglicano soluble se use en conjunción con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
9. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el betaglicano soluble se use en conjunción con un preparado para promover la curación de heridas con cicatrización reducida.
- 30 10. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que el betaglicano soluble se use en conjunción con un preparado para promover la curación de heridas crónicas.

35

40

45

50

55

60

65