

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
7 de enero de 2010 (07.01.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2010/000906 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A61K 31/726 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)

CEBADERA MIRANDA, Elena [ES/ES]; c/ Julian Camarillo, 35, E-28037 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2009/070266

(74) Mandatarios: ELZABURU MARQUEZ, Alberto et al.; Miguel Angel 21, E-28010 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:  
30 de junio de 2009 (30.06.2009)

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200802002 1 de julio de 2008 (01.07.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): LABORATORIOS FARMACEUTICOS ROVI, S.A. [ES/ES]; c/ Julian Camarillo, 35, E-28037 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

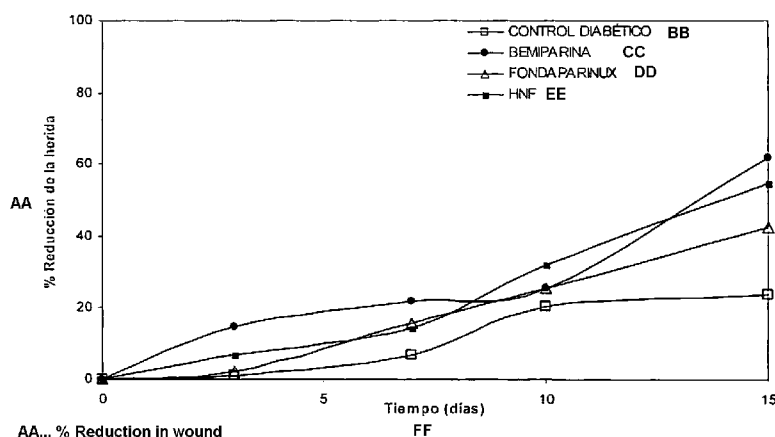
(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): LÓPEZ-BELMONTE ENCINA, Iván [ES/ES]; c/ Julian Camarillo, 35, E-28037 Madrid (ES). CANALES MAYORDOMO, María de los Angeles [ES/ES]; c/ Julian Camarillo, 35, E-28037 Madrid (ES).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION WITH GLYCOSAMINOGLYCANS AND USE THEREOF IN THE TREATMENT OF CHRONIC ULCERS

(54) Título: COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA CON GLICOSAMINOGLICANOS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ÚLCERAS CRÓNICAS



AA... % Reduction in wound  
BB... DIABETIC CONTROL  
CC... BEMIPARIN  
DD... FONDAPARINUX  
EE... NFNH  
FF... TIME (DAYS)

FIGURA 3

(57) Abstract: The invention relates to a glycosaminoglycan composition for the treatment of diabetic foot ulcers. More specifically, the invention relates to low-molecular-weight heparins (LMWH) and very-low-molecular-weight heparins (VLMWH) in the treatment of chronic ulcers, particularly diabetic foot ulcers, and, in particular, in the production of a drug for the treatment of chronic ulcers, particularly diabetic foot ulcers and pressure ulcers.

(57) Resumen: La invención se refiere a una composición de glicosaminoglicanos para el tratamiento de úlcera de pie diabético, en concreto se refiere a heparinas

[Continúa en la página siguiente]



WO 2010/000906 A1



SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— *antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))*

**Publicada:**

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

## COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA CON GLICOSAMINOGLICANOS Y SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ÚLCERAS CRÓNICAS

### CAMPO DE LA INVENCION:

5

La invención se refiere a una composición de glicosaminoglicanos para el tratamiento de úlceras crónicas, en concreto úlceras de pie diabético, y úlceras de presión. Más en particular, se refiere a composiciones de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM) en el tratamiento de úlceras crónicas, y más en concreto en la fabricación de un medicamento para el

10 tratamiento de úlceras crónicas.

### ESTADO DE LA TÉCNICA:

15

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se caracteriza por un aumento sostenido de los niveles de glucosa plasmáticos, lo que contribuye a la aparición de neuropatía periférica y de complicaciones macro y microvasculares. Según los datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de la DM está aumentada de forma alarmante, estimándose en 2000 una prevalencia en la población mundial del 2,8% y que esta cifra aumentará hasta el 4,4% en 2030. Así, en 2000 el número de pacientes con DM rondaba los 171 millones y se estima que este número se

20 incrementa hasta los 366 millones en el 2030. Este aumento en la incidencia de la DM se ha asociado entre otros factores al envejecimiento general de la población, ya que existe una relación directa entre la edad y la prevalencia de la enfermedad. En este sentido, se ha estimado que la prevalencia de la DM en España podría estar entre el 2% y el 6%; el 10% correspondería a DM tipo 1, estando el 50% de los pacientes con DM tipo 2 sin diagnosticar. Teniendo en cuenta que los estudios publicados de

25 prevalencia de DM en diferentes regiones de España son anteriores a 2002 y la tendencia al aumento de la incidencia, actualmente en España se estima que existirían más de 2,5 millones de personas diabéticas.

30

La afectación neurológica, tanto del sistema periférico como del autónomo representa probablemente la complicación más frecuente de la DM. Puede ocurrir en ambos tipos de DM, y su prevalencia y severidad está en relación con los años de evolución de la diabetes y con el grado de control glucémico. Se estima que esta complicación afecta al 60% de los sujetos DM, siendo la principal causa de la aparición de úlceras en los pies de los sujetos diabéticos. En esta línea, la American Diabetes Association en su sexagésima sesión científica estableció que el 15% de los pacientes con DM desarrollaban a lo largo de

35 su vida una úlcera en el pie y que el 6% de las hospitalizaciones que se producen en sujetos diabéticos

5 tienen como causa las úlceras del pies. De todas las úlceras que se producen en pacientes con diabetes, el 15% termina en amputación, siendo las complicaciones asociadas a la DM la causa principal de las amputaciones no traumáticas (40-70%), estando a su vez el 85% de las amputaciones que se producen en los pacientes diabéticos relacionadas con úlceras en el pie. En Estados Unidos se efectúan de forma anual 100.000 amputaciones, lo que repercute de forma considerable en el gasto sanitario, calculándose que en 2001 las úlceras y las amputaciones tuvieron en US un coste aproximado de 1000 millones de dólares y siendo este gasto en UK de 456 millones de dólares. Estos costes derivados de la úlcera del pie diabético varían en gran medida dependiendo de si se ha producido amputación o no y así, en un estudio realizado en Suiza en 1990, se observó que en el caso de aquellas úlceras que curaron y que no presentaban componente isquémico, los costes asociados fueron de 16.500 dólares. Por el contrario, en los casos en los que fue necesaria una amputación menor, los costes se elevaron a 27.000 dólares, ascendiendo a 63.000 dólares en el caso de que se produjera una amputación mayor.

15 La definición de pie diabético propuesta por el Grupo de Consenso sobre Pie Diabético de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascul ar es: "Alteración clínica de base etiopatogénica neuropática inducida por la hiperglicemia mantenida, en la que con o sin coexistencia de isquemia, y previo desencadenante traumático, se produce la lesión y/o ulceración del pie".

20 La ulceración del pie es una complicación significativa de enfermedades como la diabetes con una incidencia anual ligeramente superior al 2% (Abbott C.A., et al (2002) The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. Diabet. Med. 19(5):377-84). Se estima que un 15% de los pacientes con diabetes desarrollarán úlceras en algún momento de su vida (Reiber G. E. (1996) The epidemiology of diabetic foot problems. Diabet. Med. 13 Suppl 1 :S6-11) y que alrededor de un 10%- 30% de los que presenten úlceras progresarán con la amputación del miembro (Lipsky B.A. (2004) Medical treatment of diabetic foot infections. Clin. Infecí Dis. 39 Suppl 2:S104-14). Además, esto se complica en el caso en el que se produce una isquemia en la extremidad inferior en la que aparece la úlcera, siendo producida en la mayor parte de los casos por insuficiencia de riego sanguíneo por alta incidencia de trombosis.

35 En relación con la mortalidad a los 5 años de los pacientes a los que se les practica una amputación de miembros inferiores, es de 50-60% (Reiber G. E. (1996) The epidemiology of diabetic foot problems. Diabet. Med. 13 Suppl 1 :S6-11). Se han utilizado diversos métodos para el tratamiento del paciente con pie diabético que incluyen el control metabólico estricto, profilaxis de los factores de

riesgo modificables, desbridamiento, empleo de apósitos, tratamiento antimicrobiano de las infecciones, eliminación de la presión del área lesionada, uso de injertos de piel, administración de factores de crecimiento y el empleo de métodos de revascularización en caso de existir indicación.

5 En la mayoría de los casos el tratamiento de este tipo de úlceras crónicas se realiza por vía tópica, por ejemplo, el empleo de apósitos en las úlceras como las del pie diabético es comúnmente utilizado. Entre los nuevos tipos de apósitos estudiados en ensayos clínicos controlados se encuentran los apósitos que se basan en membrana polimérica semipermeable, Promogran (matriz de colágeno), alginato, carboximetilcelulosa, hialuronan y presión subatmosférica (Eldor R. Y col. (2004) New and  
10 experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies. *Diabet. Med.* 21(11):1161- 73). También se han desarrollado métodos para crear sustitutos de piel que son colocados sobre la lesión ulcerosa. El Dermagraft® se produce sembrando fibroblastos de dermis humana sobre un andamio sintético de material bioabsorbible que ha demostrado ser eficaz en las úlceras de bajo grado con una mayor proporción de curación en un  
15 menor tiempo (Marston W.A., et al. (2003) Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group. The efficacy and safety of Dermagraft® in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* 26:1701-5). El Apligraf® consta de una capa de dermis compuesta de fibroblastos humanos en una matriz de colágeno tipo I bovino y una capa de epidermis formada de queratinocitos humanos. De manera similar, este sustituto de piel ha mostrado asociarse  
20 significativamente a una mayor y más rápida curación de lesiones cuando se aplica en úlceras neuropáticas de bajo grado y no infectadas (Veves A., et al (2001) Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care* 24:290-5). En un ensayo clínico fase III, aleatorizado, de doble ciego y controlado con placebo, el Factor de Crecimiento Derivado de  
25 Plaquetas (Platelet Derived Growth Factor, abreviado PDGF) en forma de gel mostró ser eficaz y seguro para el tratamiento de pacientes diabéticos que presentaban úlceras neuropáticas con buena perfusión sanguínea (Wieman T.J. , et al (1998) Clinical efficacy of beclapermin (rh PDGF-BB) gel. *Diabetes Care* 21 (5):822-7). La mayoría de los pacientes (95%) incluidos en este estudio tenían úlceras con un área < 10 cm<sup>2</sup> según la evaluación por planimetría. El gel de becaplermina 100 µg/g,  
30 en comparación con placebo, aumentó significativamente la proporción de cierre completo de la lesión en un 43% (50 vs. 35%, p = 0.007) y redujo el tiempo para lograr dicho efecto en un 32% (86 vs. 127 días, p = 0.013). Los resultados satisfactorios con el PDGF o becaplermina (Regranex®) llevaron a su aprobación para el tratamiento de las úlceras neuropáticas en las extremidades inferiores del diabético que se extienden hasta el tejido subcutáneo o más profundamente y tienen un adecuado flujo  
35 sanguíneo (Brem H., Sheehan P., Boulton A.J. (2004) Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. *Am.*

J. Surg. 187(5A): 1 S-1 OS). Sin embargo, unos meses más tarde la FDA inició una revisión de seguridad tras recibir los datos de un estudio que mostró un mayor riesgo de cáncer en pacientes con diabetes que se aplicaron el factor de crecimiento tópico Regranex® de Johnson & Johnson directamente en sus úlceras de pierna y pie diabético, por lo que esta alternativa terapéutica  
5 actualmente está en revisión y se ha limitado para pacientes que no tengan predisposición a padecer algún tipo de tumor.

En cuanto a tratamientos por vía parenteral local, hace unos años se ha publicado un método de administración de un agente cicatrizante como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), que  
10 consiste en la infiltración de una solución de la biomolécula en la lesión mediante varias inyecciones (WO 03053458). Este tratamiento ha mostrado tener efectividad en la prevención de la amputación del pie diabético pero tiene el inconveniente de que resulta traumático para el paciente ya que la aplicación de inyecciones en la lesión es muy dolorosa y en cada tratamiento deben aplicarse varias inyecciones durante varias semanas. También, en el documento EP 1499317 se divulga un método de  
15 tratamiento de complicaciones diabéticas tales como el pie diabético con inhibidores del intercambiador sodio-hidrógeno de tipo 1 (NHE-1), y en la publicación internacional WO 02077155 se describe que el factor de crecimiento de queratinocitos (KFG-2) promueve o acelera la curación de heridas.

Finalmente, la publicación internacional WO2007087759 se refiere a una composición farmacéutica que contiene microesferas con factores de crecimiento de epidermis para administración parenteral para pacientes que poseen afecciones crónicas en la piel, como son las úlceras de pie diabético. Muchas otras patentes se han enfocado sobre otros métodos de acelerar el rango de cicatrización. Sin embargo, ninguno de estos métodos ha probado ser ampliamente eficaz.  
20

En la literatura no patente, por otro lado, se han publicado algunos estudios que divulgan ciertos resultados alentadores para enfermos de pie diabético tratados con heparinas de bajo peso molecular (HBPM), sobre la base de que las heparinas son conocidos antitrombóticos y antiinflamatorios que pueden mejorar la microcirculación vascular. En "Effect of Dalteparin of  
30 healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease", Diabetes Care, vol. 26(9), Septiembre 2003, así como en la publicación del mismo grupo de M. Kalani, A. et al. titulado "Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers", Thrombosis Research. 120, 653-661, 2007 en los se describen ensayos clínicos que demuestran que una heparina de  
35 bajo peso molecular (HBPM) tal como la dalteparina mejora la evolución de las úlceras de pie

diabético en pacientes con enfermedad arterial oclusiva periférica. Sin embargo, llama la atención que en estos artículos los pacientes son tratados de forma conjunta con ácido acetilsalicílico, es decir, se deja entrever cómo la asociación de dos principios activos con efecto anticoagulante favorecen de forma sinérgica la evolución de las úlceras de pie diabético en pacientes con enfermedad arterial oclusiva periférica. También, en “Low molecular weight heparin seem to improve local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients”, VASA, Brand 22, 1993, FET 2, se divulga la realización de ensayos clínicos, controlados con placebo, doble ciego, para evaluar la eficacia de dalteparina en enfermos con úlceras de pie diabético. Los resultados preliminares de este estudio parecen indicar que la dalteparina podría tener un efecto beneficioso sobre la prevención de este tipo de heridas, aunque siempre en dosis de profilaxis, es decir en ningún momento se emplean dosis de dalteparina superiores a 2500 UI/día, ya que se prevén hemorragias durante el tratamiento a dosis superiores, sin que este aumento suponga una eficacia mayor en el caso de pacientes con úlcera de pie diabético. Esto se debe a la creencia general en el estado de la técnica de que los pacientes diabéticos tienen mayor riesgo de sangrado que pacientes que no tienen la enfermedad (Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary síndromes, Eikelboom JW et al. Circulation. 2006 Aug 22;114(8):774-82).

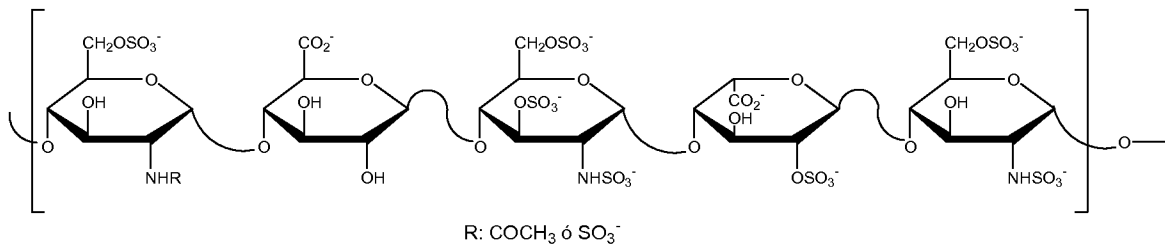
#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

Hasta la fecha, la utilización de glicosaminoglicanos en el tratamiento de úlceras crónicas, en concreto las úlceras de pie diabético, y de forma particular la utilización de algunas heparinas de bajo peso molecular para este fin, se ha descrito a grosso modo para pacientes que tienen afecciones circulatorias severas ya que estas heparinas de bajo peso molecular poseen actividad antitrombótica y anticoagulante, expresada como efecto anti-factor X activado (Xa) y efecto anti-factor IIa. Sin embargo, no se utilizan de forma general para pacientes diabéticos que padecen úlcera de pie diabético sin enfermedad oclusiva arterial periférica, por el riesgo de sangrado que supone el tratamiento a dosis superiores. Esto es debido al efecto anti factor Xa que tienen este tipo de compuestos que se traduce en efecto antitrombótico y que guarda una relación directa con el contenido dentro de la estructura heparinoide de un pentasacárido concreto presente en las estructuras sacarídicas que conforman las heparinas de bajo peso molecular y muy bajo peso molecular y a la relación efecto anti-factor Xa / anti-factor IIa. Esta relación viene determinada porque a mayor cantidad de pentasacárido en la estructura total, mayor actividad anti-factor Xa, siendo el pentasacárido sintético (fondaparinux) el inhibidor más selectivo del factor Xa y por tanto la molécula con mayor capacidad antitrombótica de forma selectiva.

Por lo tanto, la actividad antitrombótica del fondaparinux es consecuencia de la inhibición selectiva del factor Xa, mediada por la antitrombina III (ATIII). Por su unión selectiva a la ATIII, el fondaparinux potencia aproximadamente 300 veces la neutralización innata del factor Xa por la ATIII. La neutralización del factor Xa interrumpe la cascada de coagulación sanguínea e inhibe la formación de trombina y el desarrollo de trombos (ver Figura I).

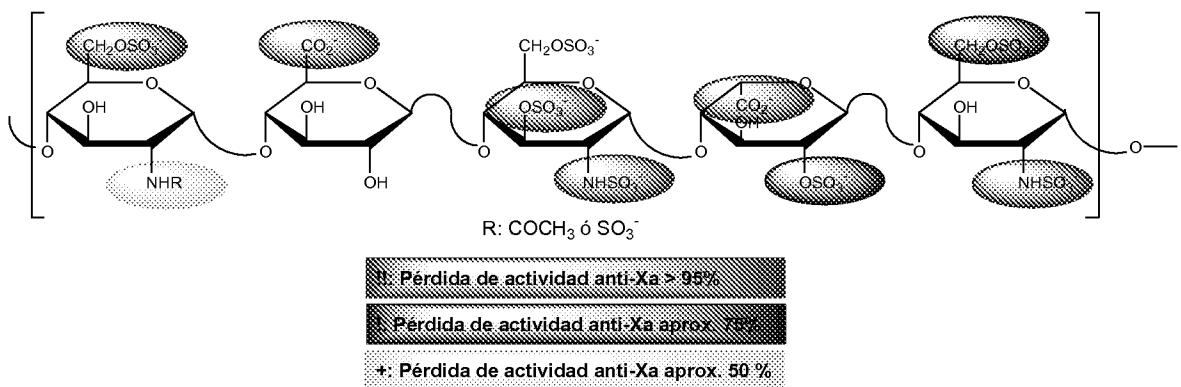
Teniendo en cuenta el estado de la técnica, en principio cabe pensar que para obtener un efecto curativo (no paliativo) será necesaria mayor cantidad de pentasacárido en la estructura. Sin embargo, como se ha indicado más arriba, esta aproximación no se lleva a cabo por el riesgo de sangrado que supone el tratamiento a dosis superiores. Los inventores de la presente invención han conseguido vencer este prejuicio de estado de la técnica ya que han conseguido demostrar que, aunque el pentasacárido esté en menor proporción o alterado químicamente o enzimáticamente de forma selectiva, el efecto cicatrizante y regenerativo no se ve afectado, ya que lo realmente importante en la estructura del glicosaminoglicano es la proporción de cadenas polisacáridicas que no contienen el pentasacárido. Además, los investigadores de la presente invención han podido determinar experimentalmente el efecto beneficioso cicatrizante de la administración de los glicosaminoglicanos con menos cantidad de pentasacárido en cualquier tipo de úlcera que se considere crónica -no solo en las úlceras de pie diabético- y que dicha administración es efectiva mediante vía tópica o mucosa externa, es decir aplicada directamente sobre el área afectada.

Fue gracias a los trabajos realizados a principio de los años 80 por los grupos de Lindahl y Choay (Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinaÿ P and Fareed J. Ann NY Acad Sci 1981;370:644-649; Thunberg L, Bäckström G and Lindahl U. Carbohydr Res 1982;100:393-410), cuando se llegó a la hipótesis de que dentro de las cadenas de heparina existe una secuencia específica correspondiente a un pentasacárido que es la que interacciona selectivamente con la antitrombina III. La estructura de este pentasacárido es la siguiente (fórmula 1):



30 Formula 1

- En la Heparina no fraccionada así como en las diversas HBPM ó HMBPM obtenidas por los métodos conocidos de despolimerización (enzimática, ácido nitroso, β-eliminación, etc), existe una medida que nos permite la determinación de la cantidad de pentasacárido dentro de la estructura general a través de la cuantificación del contenido de una unidad disacárida específica y exclusiva del pentasacárido llamada Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina (A<sub>NS,3S</sub>). Esta medida nos permite obtener una buena correlación entre el porcentaje presente de éste disacárido y el contenido de pentasacárido en la estructura heparínica y por tanto de actividad anti-FXa de la heparina en cuestión (Guerrini M et al. Seminars in Thrombosis and Hemostasis 2007 ; 33: 478-787).
- 5 Las distintas modificaciones químicas y/o enzimáticas que pueden afectar a la integridad del pentasacárido también llevarían correlacionadas una disminución de la actividad anti-FXa del compuesto. Estas reacciones pueden ser N-deacetilaciones, N y O-sulfataciones, O-acilaciones, reacciones de apertura del anillo, etc.
- 10 Por ejemplo, si el pentasacárido se encuentra alterado química o enzimáticamente en cuanto al grado de sulfatación también se encontrará alterado el efecto anti-Factor Xa. Sin embargo en diversos estudios (Lindahl U, Bäckström G and Thunberg L. J. Biol. Chem. 1983;258:9826-9830; Riesenfeld J, Thunberg L, Höök M and Lindahl U. J. Biol. Chem. 1981;256:2389-2393) se ha demostrado que cuando se altera el grado de sulfatación no todos los grupos sulfato presentes en el pentasacárido con afinidad por la antitrombina III son igualmente importantes, así es posible establecer como afecta a la actividad anti-Factor Xa de éste, la eliminación de alguno de estos grupos:
- 20



25

Por esta razón en la presente invención, hemos modificado física y químicamente distintas HBPM ó HMBPM (ver ejemplos) para alterar el pentasacárido responsable de la actividad anti FXa de forma

5 cualitativa y cuantitativa, para demostrar que en el caso de úlceras, en concreto aquellas de pie diabético, lo que interesa es que en este tipo de glicosaminoglicanos exista mayor proporción de secuencias oligosacáridicas ricas en los monosacáridos seleccionados del grupo formado por: N-sulfo-D-Glucosamina y Ácido D-Glucurónico, y en realizaciones preferidas de la invención, también, N-acetil-D-Glucosamina, Acido L-Idurónico y Ácido L-Idurónico 2-sulfatado y no tanto del pentasacárido responsable de la la actividad anti FXa (no siendo necesaria la presencia de altas concentraciones de la unidad de N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina esencial para la actividad antitrombótica del pentasacárido). Por esta razón para los propósitos de la presente invención la proporción de pentasacárido está limitada a un máximo de un 20% del disacárido característico del pentasacárido (ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina) en la estructura del glicosaminoglicano que, de acuerdo con el estado de la técnica, es el responsable de la actividad anti FXa y que por tanto, según ésta, convendría tener en mayor proporción.

15 En el estado de la técnica se aprecia claramente que los pacientes diabéticos tienen alterado el proceso de cicatrización de las úlceras provocadas por la propia enfermedad, pero los inventores de la presente invención también han demostrado que el efecto de la composición farmacéutica objeto de la presente invención, funciona de forma sorprendente para todo tipo de úlceras de crónicas como las de presión.

20 Para el objeto de la presente invención se entiende por úlceras crónicas a las soluciones de continuidad con pérdida de sustancia en la piel, dependiendo del origen de la úlcera se pueden clasificar como: úlceras por presión, úlcera diabética, úlcera isquémica (arterial o venosa), úlcera postquemadura, úlceras postradioterapia, etc.

25 Esta clasificación se ha realizado según la causa que origina úlcera, sin embargo el mecanismo fisiopatológico que convierte una herida/úlcera en crónica, es una alteración en el proceso isquémico que lleva a la necrosis cutánea y a una dificultad regenerativa de la misma por medios naturales (Kirman CN. Pressure ulcers, non surgical treatment and principles, Emedicine Jul 2008 ([www.emedicine.com/plastic](http://www.emedicine.com/plastic)) An G, Faeder J, Vodovotz Y. Transactional systems biology: introduction of an engineering approach to the pathophysiology of the burn patient. J Burn Care Res. 2008;29(2):277-85. Nikolovska S, et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of venous ulcers. Acta Dermatovenerol Croat 2005;13(4):242-6).

35 En este sentido, por ejemplo la isquemia se puede producir por presión externa sobre los capilares (úlceras por decúbito o por presión), por lesión calórica (quemadura), o por obstrucción vascular

(diabetes, arteriosclerosis, etc.). Tras el proceso isquémico de la piel y órganos circundantes, se produce una reperfusión de los tejidos dañados, que aumenta la lesión inicial llevando a un empeoramiento y agravamiento de las lesiones. El mecanismo exacto del proceso de isquemia-reperfusión que agrava la lesión inicial y que lleva a la cronicidad de la lesión, que se produce tras la necrosis inicial no se conoce, pero se sospecha que la continua producción de mediadores inflamatorios (citoquinas, interleukina, etc.) agravan el proceso isquémico inicial empeorando las lesiones, y llevando a la cronicidad de la úlcera.

Por ello se han investigado diferentes armas terapéuticas para modelar la producción de mediadores inflamatorios que facilitan la regeneración tisular, pero que no empeoren el daño celular. Un hecho a resaltar es que el proceso de cicatrización de una herida es el mismo en casi todos los tejidos, después de la exposición a cualquier proceso destructivo (Gurtner GC et al. Wound repair and regeneration. Nature 2008;453:314-21); de esta manera recientemente se ha investigado con heparinas de bajo peso molecular en la prevención de las heridas por quemaduras (Ravikumar T et al. Low molecular weight heparin-induced pharmacological modulation of burn wound healing. Ann Burn fire Disast 2006;19(3):1-10 Oremus M, et al. The uses of heparin to treat burn injury. Evid Rep Technol Assess (Full Rep). 2006;(148):1-58) pero hasta la fecha no existe ningún tratamiento sistémico que facilite la regeneración de una úlcera crónica (Fonder MA et al. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. J Am Acad dermatol 2008;58:185-206) y aún menos se conoce en el caso de los glicosaminoglicanos cual es la composición y/o porcentaje de monosacáridos responsables de esta actividad curativa y regeneradora que favorece la aparición de sistemas fisiológicos como el bloqueo de la producción de mediadores inflamatorios, la regeneración capilar, o los mecanismos de reperfusión y cicatrización de las úlceras.

Es decir, la composición objeto de la presente invención funciona para úlceras crónicas incluso para pacientes que no tengan diabetes y a los que les aparecen determinado tipo de úlceras crónicas que no cicatrizan fácilmente como pueden ser las úlceras de presión, entendiendo úlceras de presión como aquellas que presentan áreas de daño en la piel y tejido subyacente causado por la presión prolongada sobre un plano duro, no necesariamente intensa, e independiente de la posición. Se desecha en la actualidad el término úlcera por decúbito por no hacer referencia a la presión, factor determinante en su aparición, y por excluir a la que no han aparecido en decúbito.

Es un problema común en el cuidado de los pacientes con enfermedades crónicas, sobre todo en ancianos con movilidad limitada, con importante morbi-mortalidad y elevada repercusión económica y social, por eso para el objeto de la presente invención es importante determinar que aunque la

mayoría de los ejemplos se han realizado provocando diabetes en los animales, en el ejemplo 5, se ve claramente cómo aunque el animal no sea diabético la administración de la composición farmacéutica objeto de la presente invención funciona sorprendentemente bien.

5 Además, sin pretender quedar vinculados por la teoría, sin embargo creemos que esta hipótesis se encuentra refrendada por los resultados de nuestros ejemplos, ya que si empleamos para el tratamiento de úlceras, y en concreto las de pie diabético, el pentasacárido sintético (fondaparinux), la actividad cicatrizante y/o regenerativa se encuentra muy disminuida (cuando debería ser al revés) del mismo modo que si modificamos química y/o enzimáticamente los monosacáridos seleccionados del grupo formado por N-sulfo-D-Glucosamina y Ácido D-Glucurónico, así como, en realizaciones preferidas de la invención, también N-acetil-D-Glucosamina, Acido L-Idurónico y Ácido L-Idurónico 2-sulfatado, la actividad de nuestro glicosaminoglicano disminuye drásticamente. Por ello se concluye que, aunque exista una porción de pentasacárido en la estructura, éste no es el responsable de la actividad cicatrizante y/o regenerativa tisular, así como si alteramos cualitativa o cuantitativamente los monosacáridos anteriormente mencionados no obtenemos una buena actividad cicatrizante y/o regenerativa tisular.

Por esta razón, un aspecto principal de la presente invención se dirige a una composición de glicosaminoglicanos que contiene una proporción de determinados monosacáridos y contiene una proporción que no supere un 20%, del disacárido característico del pentasacárido, para tratamiento de úlceras crónicas y en particular la úlcera de pie diabético.

Los inventores de la presente invención también han llegado a elaborar una relación entre la cantidad necesaria de los monosacáridos citados anteriormente y la dosis de un medicamento que contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz de glicosaminoglicano, relacionando la proporción de monosacáridos (UI) con la vida media plasmática del producto, para conseguir una dosis de "tratamiento" de la enfermedad y no de profilaxis.

En los estudios publicados hasta la fecha, las escasas heparinas utilizadas para úlceras crónicas, y en concreto úlceras de pie diabético, han tenido como objetivo siempre la profilaxis, es decir que se pensaba que aumentando la dosis se produciría una hemorragia en el paciente, o bien una terapia coadyuvante de la enfermedad con otro tipo de compuestos que actúan a distintos niveles en la cascada de coagulación, como es el AAS. Por ello, las condiciones utilizadas en estos casos han sido las habituales para profilaxis, lo que implica utilizar concentraciones de heparina muy bajas, siendo la relación entre el tiempo de vida media plasmática (en horas) y la dosis en UI de 1:472 para el caso de la bemparina, por ejemplo.

5 Esto es así porque el efecto que se busca con la heparina es actuar en profilaxis, ya que teniendo en cuenta el estado de la técnica, la cantidad de pentasacárido responsable de la actividad antitrombótica es más que suficiente para favorecer la vascularización de extremidades inferiores en pacientes con  
10 úlcera de pie diabético, y a dosis superiores a la indicada la creencia general es que el riesgo de sangrado aumenta por exceso de dicho efecto antitrombótico, teniendo en cuenta que los pacientes diabéticos tienen mayor predisposición al sangrado, sin darse cuenta que lo realmente importante es administrar mayor cantidad de otros monosacáridos que no forman parte del pentasacárido en la formulación. Por ello, tradicionalmente se han utilizado para este fin siempre dosis muy bajas, en las que  
15 la relación entre el tiempo de vida media plasmática y la dosis en UI de la HBPM inferior a 1:500, ya que se considera que así se consigue el mismo efecto anticoagulante y antitrombótico pero con un menor riesgo de sangrado para pacientes que ya poseen una enfermedad compleja como es la diabetes.

20 Hasta el conocimiento de los inventores no existe sustancialmente bibliografía de patentes sobre el tratamiento de úlceras de pie diabético con composiciones de glicosaminoglicanos como las heparinas de bajo peso molecular sin que sean dosis de profilaxis, ya que éstas no son curativas sino preventivas y realmente no curan las úlceras mediante cicatrización con regeneración del tejido de granulación, sino que se utilizan porque se cree que previenen la formación de las mismas y en la mayoría de los casos utilizadas en tratamiento sinérgico con otros fármacos como el Ácido  
25 acetilsalicílico (Effect of Dalteparin of healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease", Diabetes Care, vol. 26(9), Septiembre 2003; M. Kalani, A. et al. Titulado Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers. Thrombosis Research. 120, 653-661, 2007) .

30 Además, los inventores de la presente invención, han conseguido eliminar prejuicios del estado de la técnica, ya que han determinado que en el caso de ciertos glicosaminoglicanos, como son las HBPM y las HMBPM, la cantidad de pentasacárido para el tratamiento de úlceras de pie diabético (en pacientes diabéticos) no es significativo, sino que lo realmente importante es la presencia de una  
35 proporción de secuencias oligosacáridas ricas en ciertos monosacáridos específicos. Esta proporción de ciertos monosacáridos específicos, citados en la descripción detallada de la presente invención, es la responsable de la cicatrización de este tipo de úlceras en pacientes diabéticos ya que cuando este tipo de glicosaminoglicanos es administrado por vía subcutánea o vía parenteral, el efecto cicatrizante se debe a la presencia de ciertas fracciones oligosacáridas que no contienen el  
40 pentasacárido comúnmente vinculado en el estado de la técnica con el efecto anti-factor Xa en las

heparinas de bajo peso molecular y muy bajo peso molecular. Además, los inventores de la presente invención han determinado que siempre que el pentasacárido se encuentre ligeramente alterado (cuantitativa y cualitativamente) en la estructura heparinoide, la actividad anti FXa disminuye considerablemente. Sin embargo, no se observa una disminución análoga en el poder cicatrizante.

5

Por lo tanto, un importante problema en el tratamiento de úlceras del pie diabético es conseguir la dosis efectiva y eficaz de un medicamento, que logre la regeneración del tejido isquémico y prevenga la amputación del pie diabético y que además sea efectivo no solo en profilaxis sino como tratamiento terapéutico. Otra ventaja adicional que debe tener el tratamiento de elección es que sea poco traumático para el paciente ya que las úlceras de pie diabético se caracterizan por ser extremadamente dolorosas, por lo que la vía de administración debe ser poco traumática en la proximidad de la herida. Por ello, para los fines de la presente invención, la vía preferida de administración es la vía tópica, ya que es la vía más cómoda de administración que permite a los pacientes aplicarse directamente la cantidad estipulada por el médico de una forma fácil. Además, la vía tópica presenta una serie de ventajas frente a la vía parenteral, ya que es mucho más cómoda para el paciente, puesto que en muchos casos estos tratamientos requieren largos periodos de terapia, como por ejemplo en algunos tipos de diabetes en los que se necesita tratamiento de por vida, siendo la frecuencia de administración diaria. Otro hecho importante es que los pacientes que sufren este tipo de afecciones reciben mucha medicación para tratar otras áreas (no la úlcera en sí), como por ejemplo la diabetes y en muchas ocasiones los pacientes tienen establecidas unas pautas de medicación que en numerosas ocasiones no permiten que se administren otros medicamentos a causa de la interacción que pueda existir con los tratamientos que tienen previamente establecidos.

Por otro lado, los investigadores de la presente invención han llegado a conseguir la absorción de los diferentes glicosaminoglicanos por vía tópica sin que las formulaciones originen el crecimiento exacerbado de las células afectadas en el área ulcerada, como ocurre con la aplicación tópica de factores de crecimiento sobre las heridas que hay actualmente en el estado de la técnica.

Adicionalmente, la vía tópica para este tipo de composiciones es la vía de elección ya que, como se aprecia en el estado de la técnica, en el caso de aplicaciones tópicas de factores de crecimiento sobre el área afectada existe el riesgo de producir un crecimiento descontrolado de las células en la zona afectada (ver el caso de Regranex®), existiendo el riesgo de cáncer y estando limitado su uso a pacientes que padecen enfermedades malignas como el cáncer. Sin embargo, en el caso de los glicosaminoglicanos, los investigadores de la presente invención no han observado un crecimiento descontrolado de las células afectadas, por lo que el uso de la combinación objeto de la presente

35

invención no está limitada a pacientes que no tienen riesgo de enfermedades malignas como el cáncer, sino que la composición de la presente invención se dirige a cualquier tipo de úlcera crónica.

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

**Figura 1:** Representa el mecanismo de acción del pentasacárido sintético (fondaparinux).

**Figura 2A:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de fondaparinux (pentasacárido responsable de la interacción con antirombina III) registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). En el espectro podemos observar cinco picos de correlación que corresponden a los cinco monosacáridos que componen el pentasacárido. **ANSred**, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; **I2S**, ácido L-idurónico 2-sulfato; **ANS,3S**, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina; **G-(ANS,3S)**, ácido D-glucurónico que precede a la unidad ANS,3S y **ANS-(G)**, N-sulfo-D-glucosamina que precede al anillo de ácido D-glucurónico. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) se ha resaltado con un círculo porque es la señal más característica del pentasacárido y se va a tomar como referencia para cuantificar la presencia del mismo en diversas muestras. La proporción de este monosacárido en el fondaparinux es del 20%.

10  
15

**Figura 2B:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de bajo peso molecular bemiparina, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; **ANAc**, N-acetil-D-glucosamina) y a la alteración de la proporción de las unidades existentes, como es el caso del anillo de ácido L-idurónico sulfatado en 2, **I2S**, que está presente en mayor proporción. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) característica del pentasacárido se ha resaltado con un círculo. Como se puede observar en la figura, la intensidad de esta señal ha disminuido en comparación con la muestra de fondaparinux debido al incremento de la proporción de ácido D-glucurónico enlazado a N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), siendo éste el anillo de glucurónico mayoritario. La disminución de la proporción de la unidad G-(ANS,3S) en las muestras de bemiparina, 1.5% del contenido de monosacáridos total, evidencia que la mayor parte de las cadenas oligosacáridicas no presentan el motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

20  
25  
30

También se han etiquetado las señales:

35 **ANSred**, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; **ANS,3S**, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

**Figura 2C:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de muy bajo peso molecular RO14 ckw2\_13\_11L, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; **ANAc**, N-acetil-D-glucosamina) y a la alteración de la proporción de las unidades existentes, como es el caso del anillo de ácido L-idurónico sulfatado en 2, **I2S**, que está presente en mayor proporción. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) característica del pentasacárido se ha resaltado con un círculo. Como se puede observar en la figura, la intensidad de esta señal ha disminuido en comparación con la muestra de fondaparinux debido al incremento de la proporción de ácido D-glucurónico enlazado a N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), siendo éste el anillo de glucurónico mayoritario. La disminución de la proporción de la unidad G-(ANS,3S) en las muestras de RO14 ckw2\_13\_11L, 2.6 % del contenido de monosacáridos total, evidencia que la mayor parte de las cadenas oligosacáridicas no presentan el motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

También se han etiquetado las señales:

**ANSred**, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; **ANS,3S**, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

**Figura 2D:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de bajo peso molecular enoxaparina, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; **ANAc**, N-acetil-D-glucosamina) y a la alteración de la proporción de las unidades existentes, como es el caso del anillo de ácido L-idurónico sulfatado en 2, **I2S**, que está presente en mayor proporción. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) característica del pentasacárido se ha resaltado con un círculo. Como se puede observar en la figura, la intensidad de esta señal ha disminuido en comparación con la muestra de fondaparinux debido al incremento de la proporción de ácido D-glucurónico enlazado a N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), siendo éste el anillo de glucurónico mayoritario. La disminución de la proporción de la unidad G-(ANS,3S) en las muestras de enoxaparina, 1.7 % del contenido de monosacáridos total, evidencia que la mayor parte de las cadenas oligosacáridicas no presentan el motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

También se han etiquetado las señales:

**ANSred**, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; **ANS,3S**, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

**Figura 2E:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de bajo peso molecular tinzaparina, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; **ANAc**, N-acetil-D-glucosamina) y a la alteración de la proporción de las unidades existentes, como es el caso del anillo de ácido L-idurónico sulfatado en 2, **I2S**, que está presente en mayor proporción. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) característica del pentasacárido se ha resaltado con un círculo. Como se puede observar en la figura, la intensidad de esta señal ha disminuido en comparación con la muestra de fondaparinux debido al incremento de la proporción de ácido D-glucurónico enlazado a N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), siendo éste el anillo de glucurónico mayoritario. La disminución de la proporción de la unidad G-(ANS,3S) en las muestras de tinzaparina, 1.05 % del contenido de monosacáridos total, evidencia que la mayor parte de las cadenas oligosacáridicas no presentan el motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

También se han etiquetado las señales:

**ANSred**, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; **ANS,3S**, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

20

**Figura 2F:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de muy bajo peso molecular RO14\_H13\_96\_5, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; **ANAc**, N-acetil-D-glucosamina) y a la alteración de la proporción de las unidades existentes, como es el caso del anillo de ácido L-idurónico sulfatado en 2, **I2S**, que está presente en mayor proporción. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) característica del pentasacárido se ha resaltado con un círculo. Como se puede observar en la figura, la intensidad de esta señal ha disminuido en comparación con la muestra de fondaparinux debido al incremento de la proporción de ácido D-glucurónico enlazado a N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), siendo éste el anillo de glucurónico mayoritario. La disminución de la proporción de la unidad G-(ANS,3S) en las muestras de RO14\_H13\_96\_5, 1.9 % del contenido de monosacáridos total, evidencia que la mayor parte de las cadenas oligosacáridicas no presentan el motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

35

También se han etiquetado las señales:

**ANSred**, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; **ANS,3S**, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

**Figura 2G:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de bajo peso molecular BEMI\_99\_4, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es muy diferente al obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; **ANAc**, N-acetil-D-glucosamina) y a la desaparición de algunas de las señales características como **ANS,3S** y **G-(ANS,3S)**. La desaparición de la señal del pentasacárido, **G-(ANS,3S)**, evidencia que este tipo de heparina de bajo peso molecular no presenta cantidades detectables del motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III. Asimismo, la desaparición de la señal de I2S muestra que esta HBPM también presenta cambios significativos en las unidades características de la región regular de la heparina.

**Figura 2H:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de heparina sódica, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 1), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) y a la alteración de la proporción de las unidades existentes, como es el caso del anillo de ácido L-idurónico sulfatado en 2, I2S, que está presente en mayor proporción. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) característica del pentasacárido se ha resaltado con un círculo. Como se puede observar en la figura, la intensidad de esta señal ha disminuido en comparación con la muestra de fondaparinux debido al incremento de la proporción de ácido D-glucurónico enlazado a N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), siendo éste el anillo de glucurónico mayoritario. La disminución de la proporción de la unidad G-(ANS,3S) en las muestras de heparina sódica, 1.0 % del contenido de monosacáridos total, evidencia que la mayor parte de las cadenas oligosacáridicas no presentan el motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

También se han etiquetado las señales:

**ANSred**, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; **ANS,3S**, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

**Figura 2I:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de bajo peso molecular BEMI\_99\_2, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es muy diferente al obtenido para fondaparinux (ver figura 1), debido a

la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; ANAc, N-acetil-D-glucosamina; ANH2, D-glucosamina; ANH2,3S, D-3-O-sulfo-glucosamina) y a la desaparición de algunas de las señales características como ANS,3S y G-(ANS,3S).

5

**Figura 2J:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de heparina cálcica, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 1), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) y a la alteración de la proporción de las unidades existentes, como es el caso del anillo de ácido L-idurónico sulfatado en 2, I2S, que está presente en mayor proporción. El pico de correlación H1-C1 de la unidad G-(ANS,3S) característica del pentasacárido se ha resaltado con un círculo. Como se puede observar en la figura, la intensidad de esta señal ha disminuido en comparación con la muestra de fondaparinux debido al incremento de la proporción de ácido D-glucurónico enlazado a N-sulfo-D-glucosamina G-(ANS), siendo éste el anillo de glucurónico mayoritario. La disminución de la proporción de la unidad G-(ANS,3S) en las muestras de heparina sódica, 1.0 % del contenido de monosacáridos total, evidencia que la mayor parte de las cadenas oligosacáridicas no presentan el motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

10  
15  
20

También se han etiquetado las señales:

ANSred, N-sulfo-D-glucosamina del extremo reductor; ANS,3S, N-sulfo-3O-sulfo-D-glucosamina.

**Figura 2K:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de bajo peso molecular BP06408-66/27-A, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es muy diferente al obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido L-idurónico sin sulfatar; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) y a la disminución de las señales correspondientes a ANS,3S y G-(ANS,3S). La disminución de la señal del pentasacárido, G-(ANS,3S), evidencia que este tipo de heparina de bajo peso molecular presenta una baja concentración del motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

25  
30

**Figura 2L:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de la heparina de bajo peso molecular BP06408-66/28-A, registrado a 298 K en agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ). El espectro es muy diferente al obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacáridicas que no estaban presentes en fondaparinux (I, ácido

35

L-idurónico sin sulfatar; ANAc, N-acetil-D-glucosamina) y la desaparición de las señales correspondientes a ANS,3S y G-(ANS,3S). La desaparición de la señal del pentasacárido, G-(ANS,3S), evidencia que este tipo de heparina de bajo peso molecular no presenta cantidades detectables del motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

5

**Figura 3:** Se representa el porcentaje de reducción de área ulcerada de los ratones del Ejemplo 5 cuando se les administra una composición control por vía tópica, una composición tópica de bemiparina sódica, una composición tópica de fondaparinux sódico y una composición tópica de heparina no fraccionada.

10

**Figura 4:** Fotografías digitales de la evolución de la herida de los grupos de tratamiento frente al grupo control y representación del área de la herida. Como queda reflejado en las imágenes, en el grupo control no se produce tejido de granulación a día 7 (la base de la herida es clara y brillante), mientras que sí se observa en los grupos tratados. Esto denota un enlentecimiento en la cicatrización en el grupo control frente a los grupos tratados, lo que demuestra el efecto favorable del tratamiento en la curación de las heridas.

15

**Figura 5:** Valores globales de la evolución del porcentaje de reducción de la herida del grupo tratado frente al grupo control. Queda reflejada una mayor reducción de la herida en el grupo de animales tratados con R0-14 frente al control, lo que demuestra su efecto favorable en la curación de la misma.

20

**Figura 6:** Fotografías digitales de la evolución de la herida en el grupo tratado frente al control y representación del área de la herida. Como puede observarse la reducción en el área de la herida es mayor en el grupo tratado con R0-14 que en el grupo control, lo que demuestra el efecto beneficioso del mismo en la curación de las heridas.

25

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

El problema a ser resuelto por la presente invención es, por tanto, proporcionar una composición farmacéutica que solvante los problemas de la técnica anterior.

30

La solución se basa en que los inventores han identificado que una composición farmacéutica de glicosaminoglicanos por vía tópica, en particular HBPM y HMBPM, para tratamiento de úlceras crónicas como las de pie diabético, que contiene la siguiente proporción de los siguientes monosacáridos (en los que todos los porcentajes son sobre el porcentaje total de monosacáridos de la

35

composición):

- a) N-sulfo-D-Glucosamina: 25-50%
- b) Ácido D-Glucurónico: 3-25%

5 y que está caracterizada porque la proporción de la unidad disacarídica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina no es superior al 25%, y preferiblemente al 20%, consigue resolver el problema indicado, puesto que logra la regeneración del tejido, previniendo la amputación del miembro, y es efectiva como tratamiento terapéutico y no solo en profilaxis.

10 Otro aspecto de la invención se refiere también al uso de una composición de glicosaminoglicanos por vía tópica, en particular HBPM y HMBPM, que contienen una proporción característica de al menos los monosacáridos seleccionados del grupo N-sulfo-D-Glucosamina, N-acetil-D-Glucosamina, Acido L-Idurónico, Ácido L-Idurónico 2-sulfatado y Ácido D-Glucurónico en la fabricación de un medicamento alternativo para el tratamiento de las úlceras crónicas como las úlceras de presión y las de pie diabético. Para el objeto de la presente invención, la composición a la que se refiere puede ir  
15 formulada en fase acuosa u oleosa, con textura líquida o sólida, en forma de gel, crema, pomada, spray, parche y/o implante de liberación rápida o sostenida, es decir, cualquier formulación de aplicación directa sobre la úlcera con vehículos farmacéuticamente aceptables que permitan la absorción de los glicosaminoglicanos objeto de la presente invención.

20 La solución se basa en que los inventores han identificado que, contrariamente a la creencia generalizada, es posible administrar a un paciente que padezca de úlcera crónica un tratamiento que consiste en una dosis de heparina de bajo peso molecular (HBPM) clasificada como dosis de tratamiento de enfermedad tromboembólica venosa sin que se produzca un mayor riesgo de sangrado, y obteniéndose sorprendentemente mejores resultados que si se administra a  
25 concentraciones inferiores tales como las concentraciones habituales para profilaxis, debido a la presencia de una proporción determinada de ciertos monosacáridos en los glicosaminoglicanos. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de úlcera de pie diabético que emplea las dosis habituales de tratamiento para enfermedad tromboembólica venosa, entendiéndose como dosis de tratamiento, aquellas en las que en las que la relación entre el  
30 tiempo de vida media plasmática y la dosis en UI de la HBPM es entre 1:800 y 1:5.000, es decir, aquellas que contienen mayor cantidad de monosacáridos específicos.

En una realización particular de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica de glicosaminoglicanos por vía tópica, en particular HBPM y HMBPM, para tratamiento de úlcera de  
35 pie diabético que contienen la siguiente proporción de los siguientes monosacáridos:

- 20 -

- N-sulfo-D-Glucosamina: 25-50%
- N-acetil-D-Glucosamina: 0-10%
- Acido L-Idurónico: 0-35%
- 5 - Ácido L-Idurónico 2-sulfatado: 0-50%
- Ácido D-Glucurónico: 3-25%

En otra realización particular de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica de glicosaminoglicanos por vía tópica, en particular HBPM y HMBPM, para tratamiento de úlcera de pie diabético que contienen la siguiente proporción de los siguientes monosacáridos:

- N-sulfo-D-Glucosamina: 25-50%
- N-acetil-D-Glucosamina: 0-10%
- Acido L-Idurónico: 0-10%
- 15 - Ácido L-Idurónico 2-sulfatado: 15-50%
- Ácido D-Glucurónico: 3-25%

En otra realización particular de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica de glicosaminoglicanos por vía tópica, en particular HBPM y HMBPM, para tratamiento de úlcera de pie diabético que contienen la siguiente proporción de los siguientes monosacáridos:

- N-sulfo-D-Glucosamina: 25-50%
- N-acetil-D-Glucosamina: 0,1-8%
- Acido L-Idurónico: 1-10%
- 25 - Ácido L-Idurónico 2-sulfatado: 15-40%
- Ácido D-Glucurónico: 3-15%

De forma más particular, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica de glicosaminoglicanos por vía tópica, en particular HBPM y HMBPM, para tratamiento de úlceras crónicas como las de pie diabético, que contiene una proporción de la unidad disacáridica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina ( $A_{NS,3S}$ ) inferior al 20%, aún más preferiblemente inferior al 10% y lo más preferiblemente inferior al 5% de la totalidad de la composición sacarídica.

35 Uno de los méritos de esta invención no es solo el haber eliminado un prejuicio del estado de la

técnica, sino el conseguir una correlación efectiva entre la proporción de los monosacáridos citados anteriormente con la dosis de medicamento que contiene la composición farmacéutica citada anteriormente necesaria para tratar la úlcera de pie diabético así como para favorecer la cicatrización y regeneración del tejido en los pacientes en función de la vida media plasmática de estos glicosaminoglicanos.

La vida media plasmática para diversas HBPM conocidas se recoge en la tabla 1, cuyos datos han sido extraídos de la publicación Planes, A. Review on bemiparin sodium – a second generation low molecular weight heparin- and its applications in venous thromboembolism. Expert opinion Pharmacother. 2003; 4:1551-61.

Tabla 1		
HBPM	Intervalo de Vida Media Plasmática (horas)	Vida Media Plasmática (horas)
RO-14	6.5 - 6.9	6.7
Bemiparina	5.2 - 5.4	5.3
Enoxaparina	4.0 - 4.4	4.2
Nadroparina	3.7	3.7
Dalteparina	2.3 - 2.8	2.5
Tinzaparina	3.0	3.0

En cuanto a los distintos tipos de HBPM, se observa que las dosis empleadas dependen de forma inversamente proporcional al tiempo de vida media plasmática, tal y como se muestra en la tabla 2 (fuente: véase el artículo arriba citado de “Expert opinion Pharmacother”, excepto para el caso de la RO-14, cuyos datos provienen de experimentos del solicitante):

Tabla 2		
HBPM	Dosis media (UI/día)	Relación aproximada Vida media / Dosis
RO-14	5.400	1:800
Bemiparina	5.000	1: 950
Enoxaparina	8.000	1: 1.900
Nadroparina	7.600	1: 2.000
Dalteparina	10.000	1: 4.000
Tinzaparina	10.000	1: 3.300

En consecuencia, un aspecto adicional de la invención está dirigido al uso de glicosaminoglicanos, en particular heparinas de bajo peso molecular, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlcera de pie diabético que se caracteriza porque la relación entre el tiempo de vida media plasmática y la dosis en UI de la HBPM es entre 1:800 y 1:5.000, es decir, se caracteriza porque se administra una composición que contiene mayor cantidad de los monosacáridos seleccionados del grupo formado por N-sulfo-D-Glucosamina N-acetil-D-Glucosamina y Ácido D-Glucurónico, y en realizaciones preferidas de la invención también Acido L-Idurónico y Ácido L-Idurónico 2-sulfatado, y una proporción de la unidad disacarídica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina inferior al 20% de la totalidad de la composición sacarídica, para tratamiento de úlcera de pie diabético, más preferiblemente inferior al 10% y lo más preferiblemente inferior al 5%

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de una heparina de bajo peso molecular en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlcera de pie diabético en el que la HBPM es una heparina de peso molecular medio inferior a 6.000 daltons.

En otro aspecto la invención se dirige al uso de una heparina de bajo peso molecular en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlcera de pie diabético caracterizado porque el tiempo de vida media plasmática es entre 5,2 y 5,4 y la dosis media diaria es de 5.000 UI, lo que asegura tener una proporción específica de los monosacáridos seleccionados del grupo formado por N-sulfo-D-Glucosamina y Ácido D-Glucurónico, y en realizaciones preferidas de la invención también N-acetil-D-Glucosamina, Acido L-Idurónico y Ácido L-Idurónico 2-sulfatado, y la unidad disacarídica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina inferior al 20% de la totalidad de la composición sacarídica, más preferiblemente inferior al 10% y lo más preferiblemente inferior al 5%

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de una heparina de bajo peso molecular en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlcera de pie diabético caracterizado porque el tiempo de vida media plasmática es entre 4,0 y 4,4 y la dosis media diaria es de 7.600 UI, lo que asegura tener una proporción específica de los monosacáridos seleccionados del grupo formado por N-sulfo-D-Glucosamina, N-acetil-D-Glucosamina, Acido L-Idurónico, Ácido L-Idurónico 2-sulfatado y Ácido D-Glucurónico.

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de una heparina de bajo peso molecular en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlcera de pie diabético caracterizado porque el tiempo de vida media plasmática es entre 2.3 y 2.8 y la dosis media diaria es de 10.000 UI, lo que asegura tener una proporción específica de los monosacáridos seleccionados del grupo formado por N-sulfo-D-

- 23 -

Glucosamina y Ácido D-Glucurónico, y en realizaciones preferidas de la invención también N-acetil-D-Glucosamina, Acido L-Idurónico y Ácido L-Idurónico 2-sulfatado.

5 Como se ha indicado, gracias a la provisión de una HBPM a una dosis de tratamiento en la que la relación entre el tiempo de vida media plasmática de cada HBPM y la dosis en UI de cada HBPM es entre 1:800 y 1:5.000 se consigue la ventaja de proporcionar un medicamento alternativo para el tratamiento de úlceras crónicas como son las del pie diabético que aporta una mayor efectividad que los tratamientos tradicionales sin un incremento significativo de las desventajas típicamente asociadas a este tratamiento, tal como un mayor riesgo de sangrado, debido a que contiene mayor cantidad de  
10 ciertas unidades monosacarídicas y una cantidad limitada de la unidad disacarídica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina inferior al 20% de la totalidad de la composición sacarídica.

15 Esta invención ha sido posible gracias a que los inventores han superado el prejuicio existente en el campo técnico de las heparinas en contra de elevar la concentración de HPBM hasta niveles del orden de las dosis de tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa, en lugar de quedarse en la habitual dosis de profilaxis (más bajas), en la creencia de que tal elevación aumentaría significativamente el riesgo de sangrado sin producir efectos beneficiosos en cuanto a la mejora de la cicatrización y la regeneración de tejido epitelial, tal y como se observa en la presente invención.

20 Además, sin pretender quedar vinculados por la teoría, sin embargo los inventores de la presente invención consideran los resultados de los ejemplos refrendan su hipótesis, ya que si emplean para el tratamiento de úlcera de pie diabético el pentasacárido sintético (fondaparinux) la actividad cicatrizante y/o regenerativa se encuentra muy disminuida (cuando debería ser al revés) del mismo modo que si  
25 modifican química y/o enzimáticamente los monosacáridos seleccionados del grupo formado por N-sulfo-D-Glucosamina, N-acetil-D-Glucosamina, Acido L-Idurónico, Ácido L-Idurónico 2-sulfatado y Ácido D-Glucurónico, la actividad de la composición de glicosaminoglicano disminuye drásticamente, por ello se concluye que aunque exista una porción de pentasacárido en la estructura éste no es el responsable de la actividad cicatrizante y/o regenerativa tisular así como si alteramos cualitativa o  
30 cuantitativamente los monosacáridos anteriormente mencionados no obtenemos una buena actividad cicatrizante y/o regenerativa tisular.

### **EJEMPLOS**

35 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan a continuación sirven para ilustrar la naturaleza

de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

5 Se han realizado una serie de experimentos para demostrar que el uso de glicosaminoglicanos tales como heparinas de bajo peso molecular en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de úlcera de pie diabético a dosis de tratamiento para HBPM en las que la relación entre el tiempo de vida media plasmática de cada HBPM y la dosis en UI de la HBPM es entre 1:800 y 1:5.000 proporcionan las ventajas indicadas de la invención.

10 En estos experimentos se han utilizado varios compuestos, en particular los siguientes:

Productos comerciales:

- 15 - Fondaparinux: Análogo del pentasacárido con alta afinidad por la antitrombina III obtenido por síntesis química. Entre otras presenta las siguientes características: Peso Molecular de 1728 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 700 UI/mg.
- 20 - Bemiparina: es una heparina de segunda generación, de bajo peso molecular (peso molecular medio de 3.600 daltons) y una relación anti-Xa/anti-IIa superior a 8. La Bemiparina se obtiene mediante un nuevo método de despolimerización y fraccionamiento –beta-eliminación en medio no acuoso... con el fin de conseguir un peso molecular aún más bajo que las heparinas anteriores, así como una óptima distribución de sus fragmentos, de tal modo que el porcentaje de fragmentos de más de 6.000 Daltons resultante es muy inferior al resto de las HPBM, con una proporción elevada de cadenas por debajo de la longitud crítica (PM < 5.400 D). Sin pretender quedar vinculados por la teoría, los inventores creen que son precisamente los monosacáridos presentes que no forman parte de la porción característica del pentasacárido responsable de la actividad antitrombótica, que se  
25 consideran secundarios y a los que no se había dado importancia hasta la fecha, las que aportan a las HPBM de la invención las ventajas indicadas, por esta razón, a mayor dosis de estos monosacáridos se produce mejor cicatrización y curación de las úlceras de pie diabético.
- 30 - Enoxaparina: Heparina de bajo peso molecular obtenida por despolimerización por un método de  $\beta$ -eliminación en medio acuoso de los ésteres bencilicos de heparina previamente formados. Entre otras presenta las siguientes características (Ph. Eur. 6th Edition): Peso Molecular medio de 3500 - 5500 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 90 – 125 UI/mg
- 35 - Dalteparina: Heparina de bajo peso molecular obtenida por despolimerización con ácido nitroso. Entre otras presenta las siguientes características (Ph. Eur. 6th Edition): Peso Molecular medio de 5600 - 6400 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 110 - 210 UI/mg
- Tinzaparina: Heparina de bajo peso molecular obtenida por despolimerización enzimática con

heparinasa I. Entre otras presenta las siguientes características (Ph. Eur. 6th Edition): Peso Molecular medio de 5500 - 7500 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 70 - 120 UI/mg.

- Heparina Sódica: Heparina no Fraccionada. Entre otras presenta las siguientes características (Ph. Eur. 6th Edition): Actividad anticoagulante:  $\geq 150$  UI/mg
- 5 - Heparina Cálcica: Heparina no Fraccionada. Entre otras presenta las siguientes características (Ph. Eur. 6th Edition): Actividad anticoagulante:  $\geq 150$  UI/mg

Productos en fase de investigación:

- 10 - RO-14: Heparina de muy bajo peso molecular obtenida por despolimerización por un método de  $\beta$ -eliminación en medio no acuoso. Entre otras presenta las siguientes características: Peso molecular medio de 1800 - 3000 Daltons y presenta una actividad anti-factor Xa: 80 - 140 UI/mg.
- BEMI-99/4: Es una heparina de bajo peso molecular que tiene alterado el grado de sulfatación, de tal modo que únicamente presenta grupos sulfato en la posición N de las glucosaminas. Por esta razón, su actividad anti factor Xa disminuye considerablemente ya que la porción del pentasacárido se ve  
15 afectado cualitativa y cuantitativamente.

Las modificaciones para obtener esta heparina se fundamentan en una reacción de N,O-desulfatación que se realiza de acuerdo a las condiciones descritas por Nagasawa e Inoue (Nagasawa K, Inoue Y. De-N-sulfation. Methods Carbohydr. Chem. 1980;8:287-289) y de N-sulfatación, según las condiciones de Lloyd et al. Lloyd AG, Embrey G, Fowler LJ. Studies on heparin degradation-I: Preparation of [35S] sulphamate derivatives for studies on heparin degrading enzymes of mammalian origin. Biochem. Pharmacol. 1971;20:637-648), así 10 g de bemiparina se disuelven en  
20 150 ml de agua y la solución se pasa a través de una columna de Dowex 50WX8, H+. El eluido se neutraliza con piridina y se liofiliza, obteniéndose 11,2 g de sal de piridinio de Bemiparina.

La sal de piridinio de bemiparina (3 g) se disuelve en 75 ml de dimetilsulfóxido conteniendo un 10%  
25 de metanol, y la solución se mantiene durante 24 h a 105 °C. Transcurrido este tiempo, se añaden 75 ml de agua, se ajusta el pH a 9,0-9,5 con hidróxido sódico y se agita durante 15 minutos. La solución se neutraliza con ácido clorhídrico, se disuelven 0,5 g de cloruro sódico y se precipita con adición de 3 volúmenes de metanol, obteniéndose el derivado N,O-desulfatado.

El derivado N,O-desulfatado (1 g) se N-sulfata, de acuerdo a las condiciones de Lloyd et col. El  
30 producto se disuelve en 75 ml de una solución saturada de bicarbonato sódico y se ajusta el pH a 9. La disolución se calienta a 55 °C y se añaden 3 g de complejo de trióxido de azufre – trimetilamina. La reacción se mantiene 3 h a 55 °C. Trascurrido este tiempo se vuelve a añadir 3 g de complejo de trióxido de azufre – trimetilamina, dejando 3 h más la reacción a 55 °C. La solución se enfría y se  
ajusta el pH a 7 con ácido clorhídrico, se añade 1 g de cloruro sódico y se precipita con tres  
35 volúmenes de metanol. Se obtienen 0,88 g de BEMI-99/4. El producto obtenido presenta las

siguientes características: Peso molecular medio de 3468 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 4 UI/mg.

- BEMI-99/2: Es una heparina de bajo peso molecular que tiene alterado el grado de sulfatación, por una reacción de N-desulfatación. Esto conlleva una disminución en su actividad anti factor Xa ya que el pentasacárido se ve afectado.

Las modificaciones para obtener esta heparina se fundamentan en las condiciones descritas por Nagasawa e Inoue (Nagasawa K, Inoue Y. De-N-sulfation. Methods Carbohydr. Chem. 1980;8:287-289).

3 g de sal de piridinio de bemiparina (preparada según se indica en el ejemplo anterior), se disuelven en 450 ml de dimetilsulfóxido conteniendo un 10% de metanol, y la solución se mantiene durante 2 h a 55 °C. Transcurrido este tiempo, se ajusta el pH a 9,0-9,5 con hidróxido sódico y se agita durante 15 minutos. La solución se neutraliza con ácido clorhídrico, se disuelven 0,5 g de cloruro sódico y se precipita con adición de 3 volúmenes de metanol, obteniéndose el derivado N-desulfatado. Se obtienen 0,91 g de BEMI-99/2. El producto obtenido presenta las siguientes características: Peso molecular medio de 3619 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 19 UI/mg.

- H13-96/5: Es una heparina de bajo peso molecular que presenta un menor grado de acetilación. Por esta razón, su actividad anti factor Xa disminuye considerablemente ya que la porción del pentasacárido se ve afectado cualitativa y cuantitativamente.

En este caso, para poder obtener este glicosaminoglicano se realiza una reacción de N-deacetilación según las condiciones descritas por Shaklee y Conrad (Shaklee PN, Conrad HE. Hydrazinolysis of heparin and other glycosaminoglycans. Biochem J 1984;217:187-197). Así, 5 g de RO-14 se disuelven en 125 ml de hidrazina anhidra que contiene un 1% de hidrazina sulfato y se mantiene durante 6 h a 95 °C. La solución se concentra a sequedad, se redisuelve en la mínima cantidad de agua y se neutraliza con ácido clorhídrico. Se añaden 2,5 g de cloruro sódico y se precipita con 3 volúmenes de metanol, obteniéndose el producto H13-96/5 (3,4 g). El producto obtenido presenta las siguientes características: Peso molecular medio de 2008 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 46 UI/mg.

- BP06408-66/27-A: Es una heparina de bajo peso molecular de actividad anti factor Xa reducida, obtenida por fraccionamiento de Bemiparina por cromatografía de afinidad sobre ATIII.

Para obtener este derivado, se pasan 10 mg de Bemiparina, por una columna de CNBr-activated Sepharose 4B activada previamente con ATIII (Humana), preparada según las condiciones descritas por Höök et al. (Höök M, Björk I, Hopwood J, Lindahl U. FEBS Lett. 1976 ;66,:90-93). La columna se eluye a 4°C con una disolución tampón pH 7.40 de 1mM Tris-HCl+ 0.4M NaCl, eluyendo así la fracción de baja afinidad.

Esta fracción se purifica por una columna de Biogel P2, eluyendo con agua. La disolución que

- 27 -

contiene el producto se liofiliza, obteniéndose finalmente 7,6 mg de producto.

El producto obtenido presenta las siguientes características: Peso molecular medio de 3567 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 32 UI/mg.

- 5 - BP06408-66/28-A: Es una heparina de bajo peso molecular con actividad anti factor Xa minimizada, obtenida por fraccionamiento de Bemiparina por cromatografía de afinidad sobre ATIII.

Para obtener este derivado, se pasan 10 mg de Bemiparina, por la columna de afinidad descrita en la preparación del producto anterior. La columna se eluye a 4°C con una disolución tampón pH 7.40 de 1mM Tris-HCl+ 0.25M NaCl, eluyendo la fracción de baja afinidad.

- 10 Esta fracción se purifica por una columna de Biogel P2, eluyendo con agua. La disolución que contiene el producto se liofiliza, obteniéndose finalmente 3,6 mg de producto.

El producto obtenido presenta las siguientes características: Peso molecular medio de 3611 Daltons y una actividad anti-factor Xa: 5,4 UI/mg.

- 15 Los experimentos realizados han sido de forma general los siguientes: preparación y cuantificación e identificación de fracciones de las muestras de glicosaminoglicanos mediante RMN y administración en ratas wistar previamente diabetizadas y en ratones modificados genéticamente para valorar la cicatrización de dichas úlceras.

## 20 ESTUDIO DE CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRACCIONES POR RMN

### Determinación de las proporciones monosacáridicas de los productos

- Los inventores de la presente invención han analizado muestras comerciales y muestras de investigación propia, para determinar las proporciones monosacáridicas de aquellos monosacáridos responsables de la cicatrización de la úlcera de pie diabético así como de las distintas fracciones sacáridicas presentes en el pentasacárido.

- El contenido promedio de monosacáridos en las muestras de glicosaminoglicanos (GAGs) se ha determinado mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), empleando experimentos bidimensionales <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H HSQC (heteronuclear single quantum coherence) cuantitativos, según el método descrito por Marco Guerrini et al. El incremento de resolución que se consigue con la segunda dimensión permite cuantificar señales que solapan en el espectro monodimensional, siendo esta técnica de especial interés para estudiar carbohidratos complejos como los GAGs. Estas moléculas presentan graves problemas de solapamiento en los espectros monodimensionales de <sup>1</sup>H que dificultan la determinación de las áreas de picos aislados en el 1D para su cuantificación.

La cantidad de la unidad de ácido-D-glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-glucosamina G-(ANS,3S) presente en GAGs obtenidos a partir de heparina natural, puede relacionarse directamente con la actividad anti-Xa de los mismos, tal y como describen M. Guerrini et al. Este disacárido pertenece al pentasacárido responsable de la interacción con la antitrombina III y sólo se detecta en las secuencias activas. La señal de correlación del carbono anomérico de este tipo de ácido glucurónico con el hidrógeno directamente unido aparece en una región característica y libre de solapamiento en el espectro HSQC y por ello puede emplearse para cuantificar la proporción del pentasacárido en el GAG.

5

Los espectros  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC de fondaparinux y de distintos GAGs se muestran en las Figuras 2A a 2L adjuntas, en las que la señal de correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  del protón anomérico correspondiente a la unidad de ácido glucurónico del pentasacárido se ha resaltado con un círculo.

10

La medida de la intensidad de esta señal en los espectros nos permite determinar la proporción de pentasacárido. Los resultados indican que el porcentaje del monosacárido G-(ANS,3S) en ningún caso supera el 3 % en los GAGs analizados, a diferencia del fondaparinux donde la proporción es del 20 %.

15

Sin embargo, los GAGs estudiados presentan nuevas unidades monosacáridicas, como son los anillos de ácido idurónico sin sulfatar (I) o glucosaminas N-acetiladas (ANAc). Asimismo, la proporción de la unidad de ácido idurónico sulfatado en 2 es mucho mayor que en el pentasacárido. Por tanto, las muestras analizadas contienen mayoritariamente cadenas oligosacáridas distintas al fondaparinux.

20

Fraccio- nes	Fondaparinux	Bemipa- rina	RO14	H13_96_5	BEMI_99_2	BEMI_99_4	BP06408 66/27A	BP06408 66/28A	Enoxapa- rina	Dalteparina	Tinzaparina	Heparina no fraccionada	%
ANS	40	44,4	35,3	39,6	--	44,4	43,4	49,3	40,65	37,3	42,45	42,6	25-50
ANAc	0	2,9	2,2	0,1	2,5	6,03	1,8	4,1	5,6	5,15	7,5	5,1	0-10
I2S	20	30,7	28,3	23,1	26,9	0	34,6	22,6	26	37,7	30,2	38,4	0-50
I	0	2,8	3,3	1,4	1,8	34,2	1,8	1,3	3,35	5,0	4,30	5,7	0-35
G	20	5,7	5,7	6,8	5,7	9,26	6,2	8,6	8,4	7,25	7,9	7,0	3-25
A <sub>NS,3S</sub>	20	2,4	3,1	3,0	0	0	<0,1	0	2,2	2,3	1,0	2,2	<20
G-A <sub>NS,3S</sub>	20	1,5	2,6	1,9	0	0	<0,1	0	1,7	2,05	1,05	1,0	<20

Todos los datos de esta tabla están expresados en %

ANS : N-sulfo-D-Glucosamina  
 ANAc: N-acetil-D-Glucosamina  
 I2S: Ácido L-Idurónico G:Ácido D-Glucurónico  
 I: Ácido L-Idurónico G:Ácido D-Glucurónico  
 A<sub>NS,3S</sub>: N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina  
 G-A<sub>NS,3S</sub>: Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina.

ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL FACTOR XA DEL GLICOSAMINOGLICANO Y SU PODER CICATRIZANTE POR VÍA TÓPICA.

5 *Ejemplo 1: Ulceración del ratón diabético C57BL/KS BKS.Cg-m +Leprdb /+Leprdb/J, medida del grado de cicatrización y evaluación histopatológica. Estudio del efecto cicatrizante de Bemiparina, Fondaparinux y HNF en formas semisólidas.*

10 El ratón diabético C57BL/KsJ-db/db se ha empleado como modelo de diabetes tipo II que presenta una cicatrización alterada, a diferencia del modelo de rata wistar con diabetes inducida por estreptozotocina empleado en los ejemplos anteriores, que es un modelo de diabetes tipo I (*Michaels, J., et al., db/db mice exhibit severe wound-healing impairments compared with other murine diabetic strains in a silicone-splinted excisional wound model. Wound Repair Regen, 2007. 15(5): p. 665-70*).

15 El ratón genéticamente diabético C57BL/KsJ-db/db es un modelo que desarrolla resistencia a la insulina e hiperglucemia similar a las observadas en la diabetes de un paciente adulto. En cuanto al comportamiento en lo que se refiere a la cicatrización, las heridas realizadas en el lomo de estos animales tardan más tiempo en formar el tejido de granulación y en cerrarse que las mismas heridas producidas en animales no diabéticos.

20 Ulceración y medida del grado de cicatrización

El primer día del ensayo se anestesiaron los animales (Ketamina + Xilacina, 100 + 10 mg/kg, i.m.). Se les rasuró el lomo, se limpió la zona con desinfectante y se marcó la situación de la herida mediante plantilla para igualar su posición en todos los animales.

25 La herida se realizó mediante una incisión circular de aproximadamente 1,5 cm de diámetro, extirpándose la piel de la zona media dorsal. Posteriormente se colocó un apósito semipermeable sobre la herida. Se administró por vía i.p. 1 mL/animal de suero fisiológico después de la intervención.

30 Durante los 7 días posteriores a la intervención se administró analgesia (Paracetamol, 1 mg/mL) en el agua de bebida.

Al día siguiente y durante un total de 14 días, los animales se administraron con los tratamientos asignados, 0,15 ml/animal por vía tópica en el lomo del animal, encima de la herida.

35 Medida del área de la herida.

- Se calculó la curación de la herida como un porcentaje:

$$\% \text{ reducción de la herida} = \frac{(A_{\text{basal}} - A_{\text{tiempo}})}{(A_{\text{basal}})} \times 100$$

- 5 Se utilizó como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención.

En la figura 4 se muestra la evolución de los ratones control diabéticos respecto a los ratones diabéticos tratados. El área de la herida se ha representado a la derecha de cada animal.

- 10 En este caso se prepararon unas formulaciones tópicas para administrar directamente sobre las úlceras cuyos vehículos están formados por Carbopol, Phenonip®, Span 80, Glicerol y agua.

- La ulceración y medición del área se realizó como se detalla en los ensayos de administración subcutánea. Al día siguiente de la incisión y durante un total de 14 días, los animales se administraron con los tratamientos asignados, 0,15 ml/animal por vía tópica en el lomo del animal, encima de la herida.
- 15

Para ello, previamente los animales se distribuyeron de manera homogénea, según el peso corporal, en los siguientes grupos de tratamiento:

20

Tratamiento	Dosis
Control diabético	-
Animal diabético tratado con Bemiparina	10000 UI/kg
Animal diabético tratado con Fondaparinux	10000 UI/kg
Animal diabético tratado con Heparina cálcica	10000 UI/kg

- Se realizó el seguimiento de los animales hasta un período de 14 días (tiempo promedio necesario para la cicatrización de las heridas en este modelo animal). La valoración se realizó mediante fotografía digital de la herida y análisis posterior de la imagen. La Figura 3 muestra los valores globales de la evolución del porcentaje de reducción de la herida de los grupos de tratamiento frente al
- 25

grupo control. Tal y como se observa en la gráfica, la mejor curación de las heridas se observó con la bemiparina, obteniéndose un valor de reducción del área superior al 60% al finalizar el tratamiento.

5 Los animales diabéticos no tratados son los que presentan una velocidad de curación más lenta, alcanzándose valores de reducción de la herida cercanos al 20% a tiempo 15 días. En todos los tratamientos se ha observado una continua cicatrización de las heridas, alcanzándose valores de curación superiores a los obtenidos con el control desde la formación de la misma. La mejor evaluación de las heridas se observó con la bemiparina, obteniéndose un valor de reducción del área superior al 60% al finalizar el tratamiento, seguida de la HNF y el fondaparinux. Se puede concluir que  
10 los tres tratamientos presentan un efecto favorable en la curación de las heridas en comparación con el grupo diabético no tratado.

#### Evaluación macroscópica

15 Tal y como se observa macroscópicamente, se aprecian diferencias importantes en todos los grupos (control, Bemiparina, Fondaparinux y heparina cálcica no fraccionada (HNF)) distinguiéndose un comportamiento distinto a partir del séptimo día de observación: Mientras que en el grupo control, al séptimo día se observa que no se produce tejido de granulación (la base de la herida es clara y brillante), se puede ver en contraposición cómo los grupos tratados muestran una diferencia clara en la calidad de la cicatriz al mismo día de tratamiento, observándose en la herida un lecho cubierto de  
20 tejido de granulación. Este hecho diferencial marca la velocidad en el proceso y la calidad de la cicatrización, ya que el tejido de granulación es el responsable de la regeneración del tejido celular y de la cicatrización, además de proteger al animal de las posibles infecciones, al ser muy rico en fibroblastos, vasos capilares y colágeno.

#### 25 Evaluación histopatológica

Al día siguiente de la última administración (día 15) se sacrificaron los animales y se extrajo el área donde se realizó la herida. La porción posterior de la zona que contenía la herida se conservó en formol para su procesado histológico (tinción de hematoxilina-eosina).

30 Los resultados se basan en la puntuación dada por el método de Greenhalgh et al. (1990). A cada bloque se le dio una puntuación histológica del 1 al 15 donde 1 significa herida sin curar y 15 herida completamente epitelizada. La puntuación se basa en el grado de invasión celular, la formación de tejido de granulación, vascularización y epitelización:

Grado	Puntuación	Descripción
I	1-3	Acumulación celular de ninguna a mínima, ausencia de tejido de granulación o desarrollo epitelial.
II	4-6	Tejido de granulación fino e inmaduro dominado por células inflamatorias pero con pocos fibroblastos, capilares o deposición de colágeno; migración epitelial mínima.
III	7-9	Tejido de granulación moderadamente grueso. Puede variar de estar dominado por células inflamatorias a mayor presencia de fibroblastos y deposición de colágenos, neovascularización extensiva, migración epitelial mínima a moderada.
IV	10-12	Tejido de granulación grueso y vascular dominado por fibroblastos y deposición extensiva de colágeno, el epitelio cubre la herida parcial o totalmente.
V	13-15	Área correspondiente a la herida totalmente epitelizado, sin presentar, más o menos, rastros de la herida.

Las puntuaciones histopatológicas obtenidas para los distintos grupos se muestran en la tabla a continuación.

Tratamiento	Puntuación	Grado
Control diabético	6.7	III
Animal diabético tratado con Bemiparina	8.7	III
Animal diabético tratado con Fondaparinux	8.6	III
Animal diabético tratado con HNF	9.4	IV

5

En general los tres grupos tratados obtienen una mejor puntuación histológica que el grupo control, al menos dos puntos por encima de éste. A pesar de que la cicatrización en todos los grupos (control y tratados) se caracteriza por la presencia de tejido de granulación moderadamente grueso, la diferencia entre ellos está en la mayor presencia de células inflamatorias, como ocurre en el caso del grupo control, frente a la mayor presencia de fibroblastos y deposición de fibras de colágeno, como es el caso de los grupos tratados. Esto indica que, en el caso del grupo control, el proceso de cicatrización se encuentra en estadios más tempranos, explicándose así la velocidad de cicatrización más lenta puesta de manifiesto en los estudios de reducción del área de la herida. Dentro de los tratamientos, las muestras cutáneas pertenecientes a los grupos tratados con bemiparina y HNF presentan un índice de reparación cicatricial algo más evolucionado, con un tejido de granulación más evolucionado, mayor presencia de fibroblastos y neovascularización dérmica.

10

15

El grupo tratado con HNF se diferencia en puntuación histológica encuadrándose dentro del grado IV, lo que indica una mayor calidad en la cicatrización con respecto a los demás grupos. El tejido de granulación formado es más grueso y está dominado por fibroblastos, con deposición extensiva de fibras de colágeno. El epitelio cubre la herida parcial o totalmente.

De los resultados obtenidos tanto por determinación del área de la herida como por evaluación histopatológica podemos concluir que los mejores productos ensayados son la bemiparina y la HNF. La bemiparina presenta una velocidad de cicatrización mayor, mientras que en el caso de la HNF la cicatrización es más lenta pero con mayor calidad en el tejido formado.

*Ejemplo 2: Ulceración del ratón diabético C57BL/KS BKS.Cg-m +Lepr<sup>db</sup> /+Lepr<sup>db</sup>/J, medida del grado de cicatrización y evaluación histopatológica. Estudio del efecto cicatrizante de R0-14 en formas semisólidas.*

En este ejemplo se ha vuelto a emplear el ratón diabético C57BL/KsJ-db/db como modelo de diabetes tipo II que presenta una cicatrización alterada.

Como ya hemos comentado anteriormente se trata de un modelo que desarrolla resistencia a la insulina e hiperglucemia similar a las observadas en la diabetes de un paciente adulto.

#### Ulceración y medida del grado de cicatrización

El primer día del ensayo se anestesiaron los animales (Ketamina + Xilacina, 100 + 10 mg/kg, i.m.). Se les rasuró el lomo, se limpió la zona con desinfectante y se marcó la situación de la herida mediante plantilla para igualar su posición en todos los animales.

La herida se realizó mediante una incisión circular de aproximadamente 1.5 cm de diámetro, extirpándose la piel de la zona media dorsal. Posteriormente se colocó un apósito semipermeable sobre la herida. Se administró por vía i.p. 1 mL/animal de suero fisiológico después de la intervención.

Durante los 7 días posteriores a la intervención se administró analgesia (Paracetamol, 1 mg/mL) en el agua de bebida.

Al día siguiente y durante un total de 14 días, los animales se administraron con el tratamiento asignado, 0.15 ml/animal por vía tópica en el lomo del animal, encima de la herida.

Para ello, previamente los animales se distribuyeron de manera homogénea, según el peso corporal, en los siguientes grupos de tratamiento:

Tratamiento	Dosis
Control diabético	-
Animal diabético tratado con R0-14	10000 UI/kg

5

Se realizó el seguimiento de los animales hasta un período de 14 días (tiempo promedio necesario para la cicatrización de las heridas en este modelo animal). La valoración se realizó mediante fotografía digital de la herida y análisis posterior de la imagen.

10

Medida del área de la herida.

- Se calculó la curación de la herida como un porcentaje:

$$\% \text{ reducción de la herida} = \frac{(A_{\text{basal}} - A_{\text{tiempo}})}{(A_{\text{basal}})} \times 100$$

15

Se utilizó como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención.

En la figura 6 se muestra la evolución de los ratones control diabéticos respecto a los ratones diabéticos tratados. El área de la herida se ha representado a la derecha de cada animal.

20

En la figura 5 se muestra la evolución del tanto por ciento de reducción de la herida con el tiempo.

Los animales diabéticos no tratados presentan menor porcentaje de reducción de la herida al final del estudio, alcanzándose un 48% a tiempo 15 días. En el caso del R0-14 se observa una continua cicatrización de las heridas alcanzándose valores de curación superiores al control al final del estudio. Se puede concluir, por tanto, que el tratamiento con R0-14 demuestra un efecto favorable en la curación de las heridas en comparación con el grupo diabético no tratado.

30

Sin quedar vinculados por los ejemplos anteriormente descritos, gracias a los resultados obtenidos así como al comportamiento observado en los animales, se cree que la presente invención es muy probable que funcione para otros polisacáridos, ramificados o no, como podrían ser los pentosanos

polisulfatados, betaglucanos, condroitin sulfatos, dermatan sulfatos, carragenanos, alginatos, arabinosilanos, galactomananos y glucomananos, entre otros.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición farmacéutica de glicosaminoglicanos para tratamiento de úlceras crónicas que comprende, en un medio farmacéuticamente aceptable, al menos los siguientes monosacáridos, en los que todos los porcentajes son sobre el porcentaje total de monosacáridos de la composición:
- a) N-sulfo-D-Glucosamina: 25-50%
  - b) Ácido D-Glucurónico: 3-25%
- 10 caracterizada porque la proporción de la unidad disacáridica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina no es superior al 20%.
- 15 2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la proporción de la unidad disacáridica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina no es superior al 10% sobre el porcentaje total de monosacáridos de la composición.
- 20 3. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque la proporción de la unidad disacáridica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina no es superior al 5% sobre el porcentaje total de monosacáridos de la composición.
- 25 4. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 anteriores, caracterizada porque comprende además una proporción de N-acetil-D-Glucosamina de hasta el 10% sobre el porcentaje total de monosacáridos de la composición.
- 30 5. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 anteriores, caracterizada porque comprende además una proporción de ácido L-Idurónico de hasta el 35% sobre el porcentaje total de monosacáridos de la composición.
6. Composición de acuerdo con la reivindicación 5 anterior, caracterizada porque la proporción de ácido L-Idurónico es de hasta el 10% sobre el porcentaje total de monosacáridos de la composición.
- 35 7. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende además ácido L-Idurónico-2-sulfatado en una proporción de hasta el 50% sobre el porcentaje total de monosacáridos de la composición.

- 38 -

8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque la proporción de ácido L-Idurónico-2-sulfatado está en el intervalo 15-50% sobre el porcentaje total de monosacáridos de la composición.
- 5 9. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque comprende una heparina de bajo peso molecular.
- 10 10. Composición según la reivindicación 9 anterior en la que la heparina de bajo peso molecular es una heparina con un peso molecular medio inferior a 8.000 daltons.
- 11 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 precedentes caracterizada porque comprende una heparina de muy bajo peso molecular.
- 15 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 precedentes caracterizada porque comprende una heparina no fraccionada.
- 20 13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 anteriores en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la úlcera crónica.
- 25 14. Uso según la reivindicación 13, en el que la úlcera crónica es una úlcera de pie diabético.
- 30 15. Uso según la reivindicación 13, en el que la úlcera crónica es una úlcera de presión.
- 35 16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-15 caracterizado porque la composición comprende una heparina de bajo peso molecular y porque la relación entre el tiempo de vida media plasmática y la dosis en UI de la citada heparina está entre 1:800 y 1:5000.
17. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-15 caracterizado porque la composición comprende una heparina de bajo peso molecular que tiene una vida media plasmática entre 5,2 y 5,4 horas y porque la relación entre el tiempo de vida media plasmática y la dosis en UI de la citada heparina está entre 1:900 y 1:1200.
18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-15 caracterizado porque la composición comprende una heparina de bajo peso molecular que tiene una vida media plasmática entre 4,0 y 4,4 horas y porque la relación entre el tiempo de vida media plasmática y la dosis en UI

de la citada heparina de bajo peso molecular está entre 1:1000 y 1:2500.

- 5
19. Uso según la reivindicación 18 caracterizado porque la relación entre el tiempo de vida media plasmática y la dosis en UI de la citada heparina de bajo peso molecular es de alrededor de 1:2000.
20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-19 anteriores en el que la heparina de bajo peso molecular se administra por vía intravenosa.
- 10
21. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-19 anteriores en el que la heparina de bajo peso molecular se administra por vía subcutánea.
22. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-19 anteriores en el que la heparina de bajo peso molecular se administra por vía mucosa.
- 15
23. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-19 anteriores en el que la heparina de bajo peso molecular se administra por vía tópica.

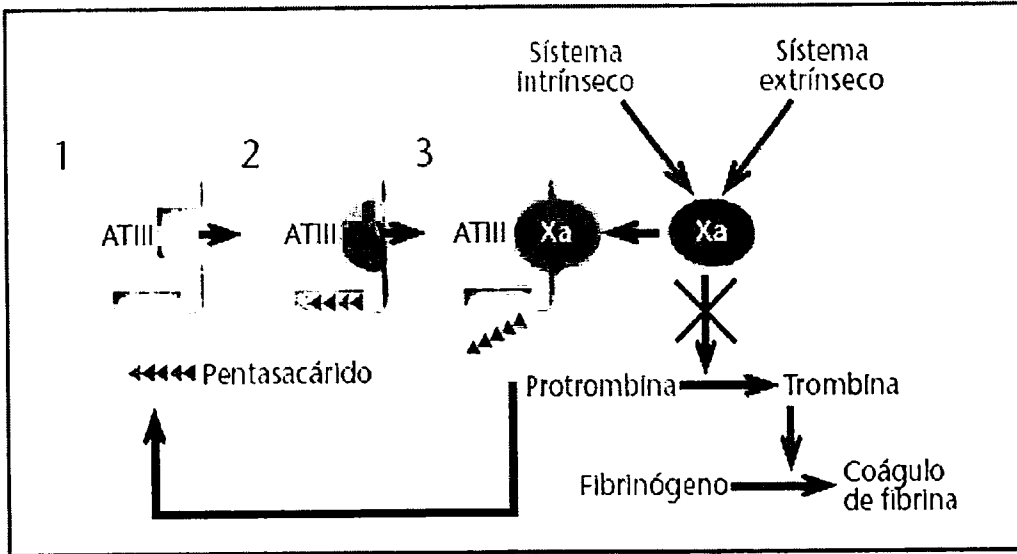


FIGURA 1

2/10

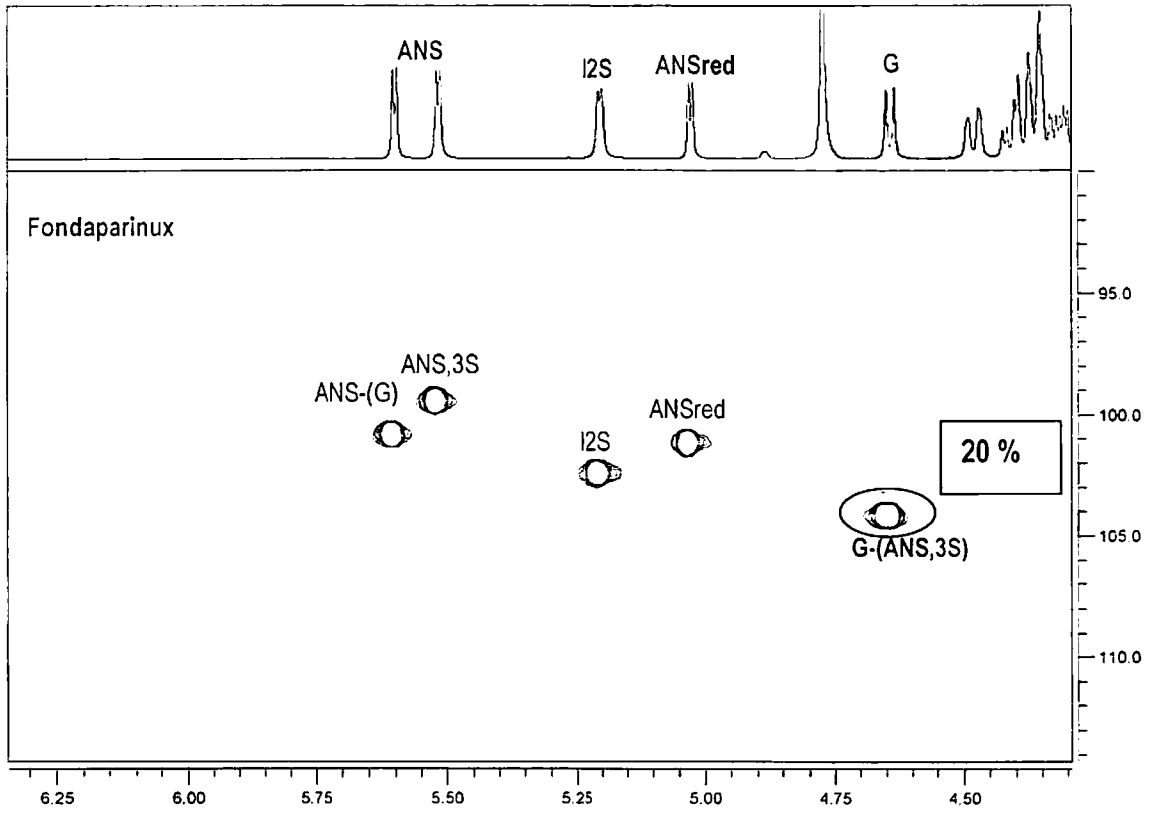


FIGURA 2A

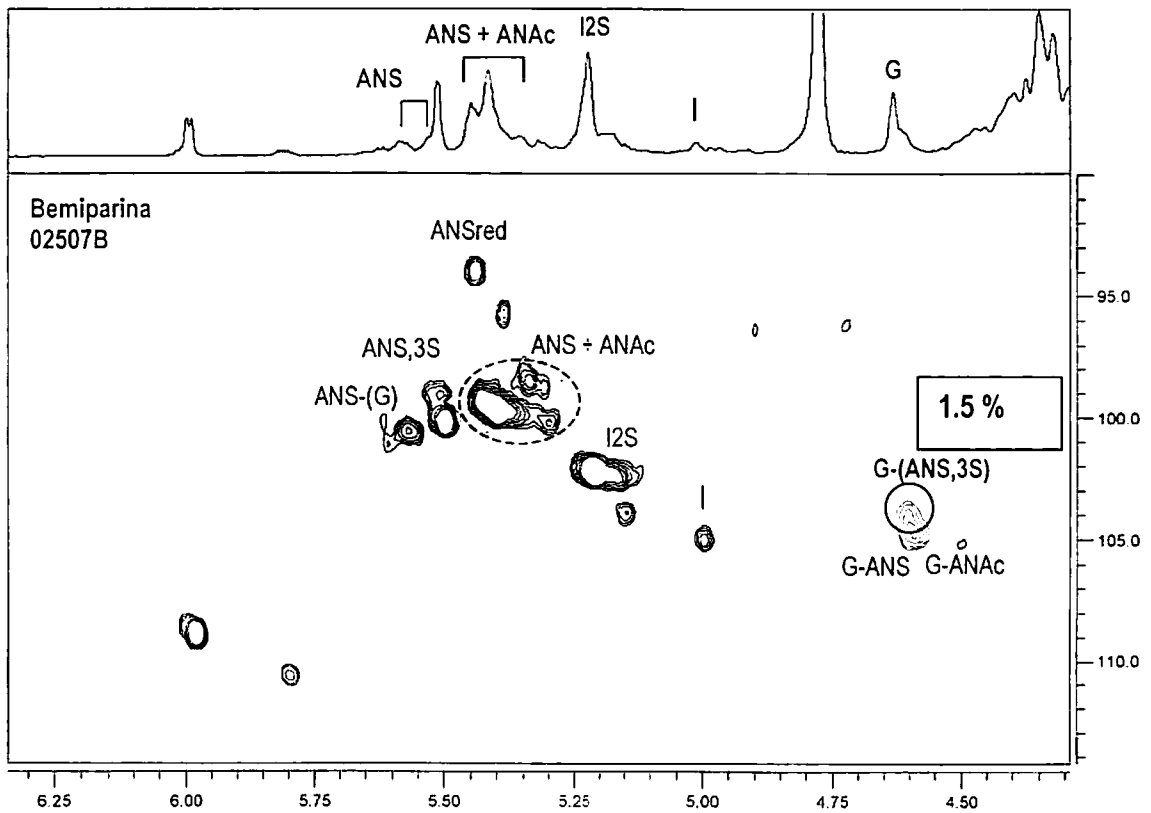


FIGURA 2B

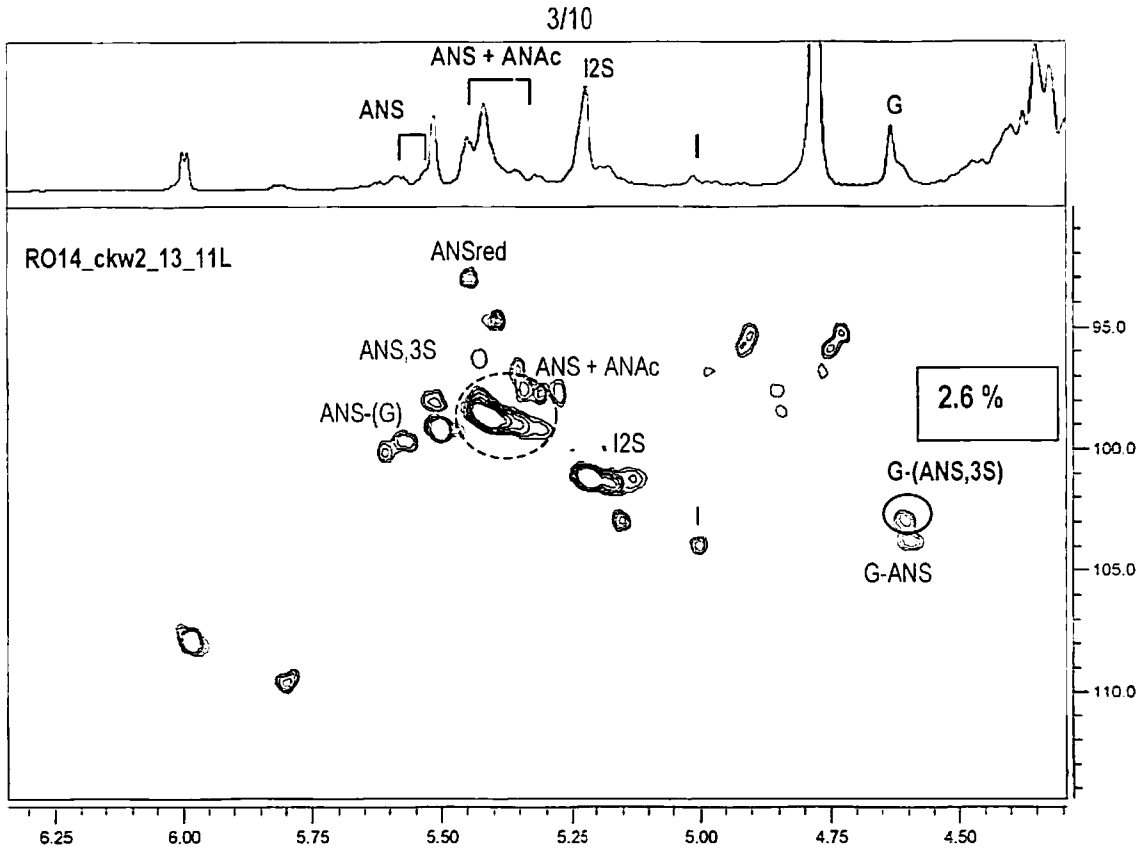


FIGURA 2C

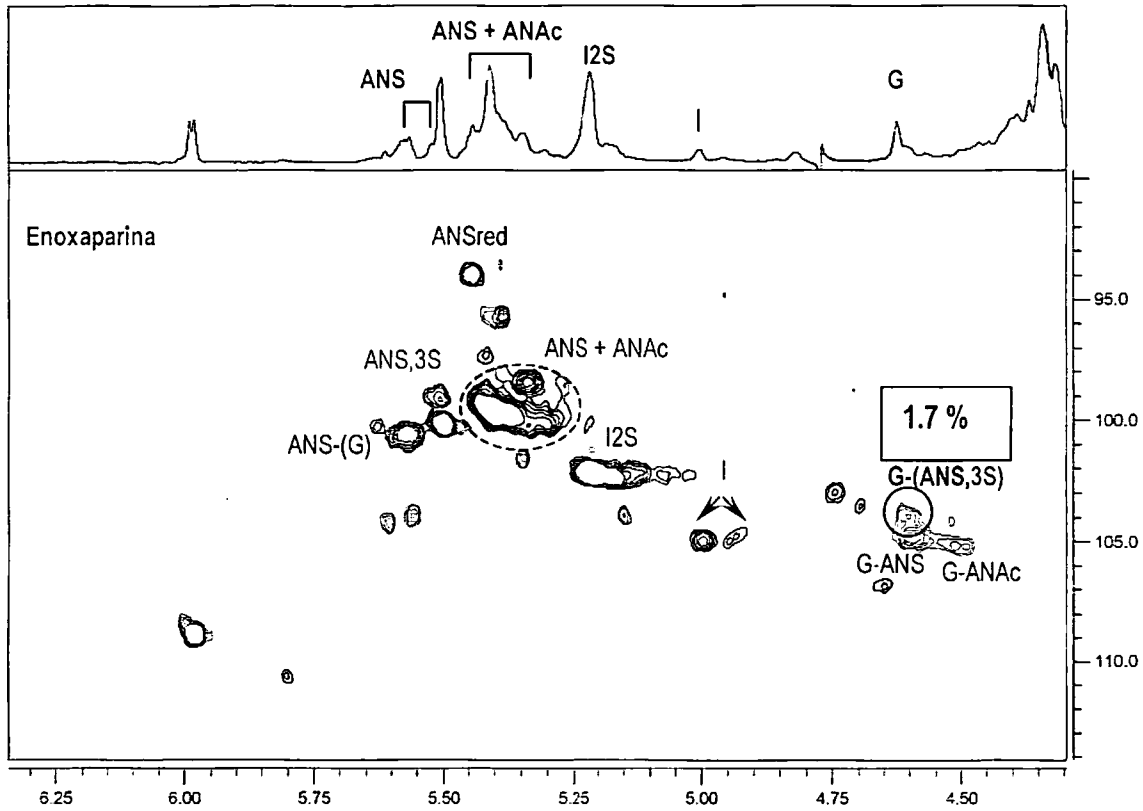


FIGURA 2D

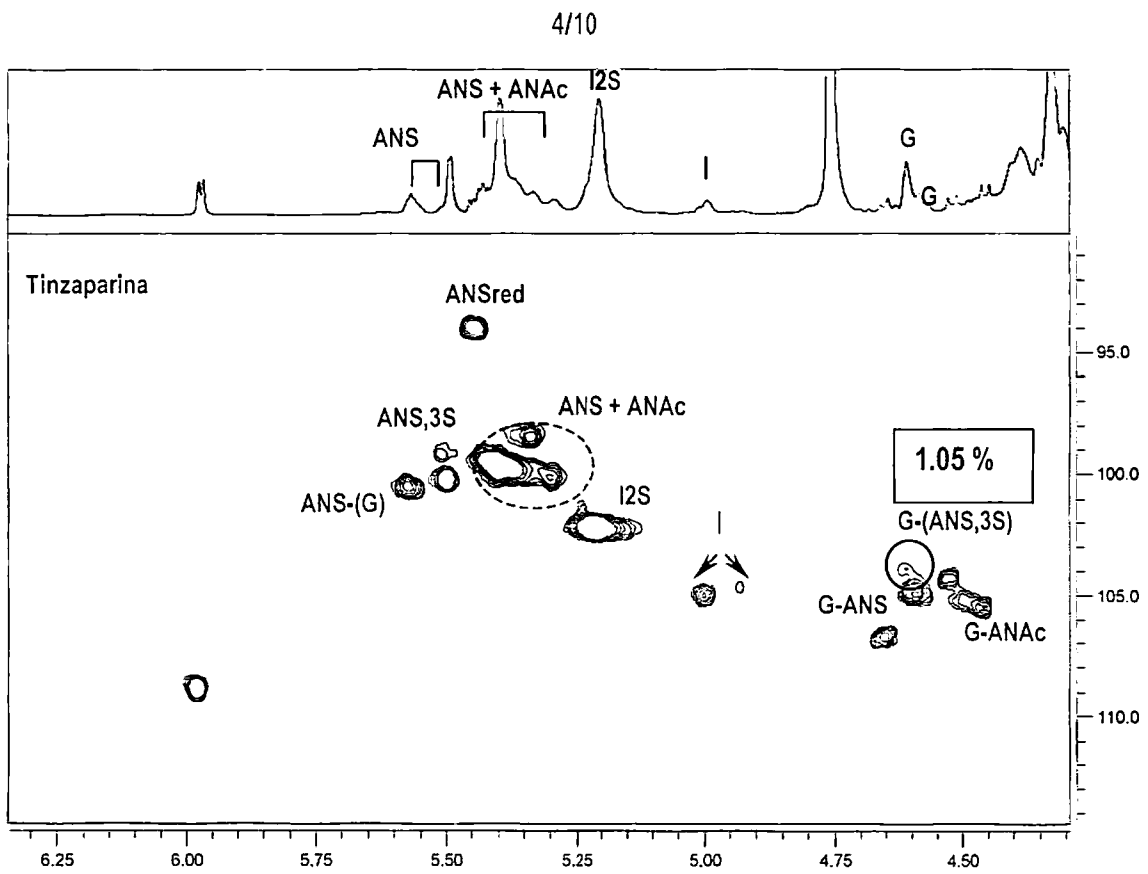


FIGURA 2E

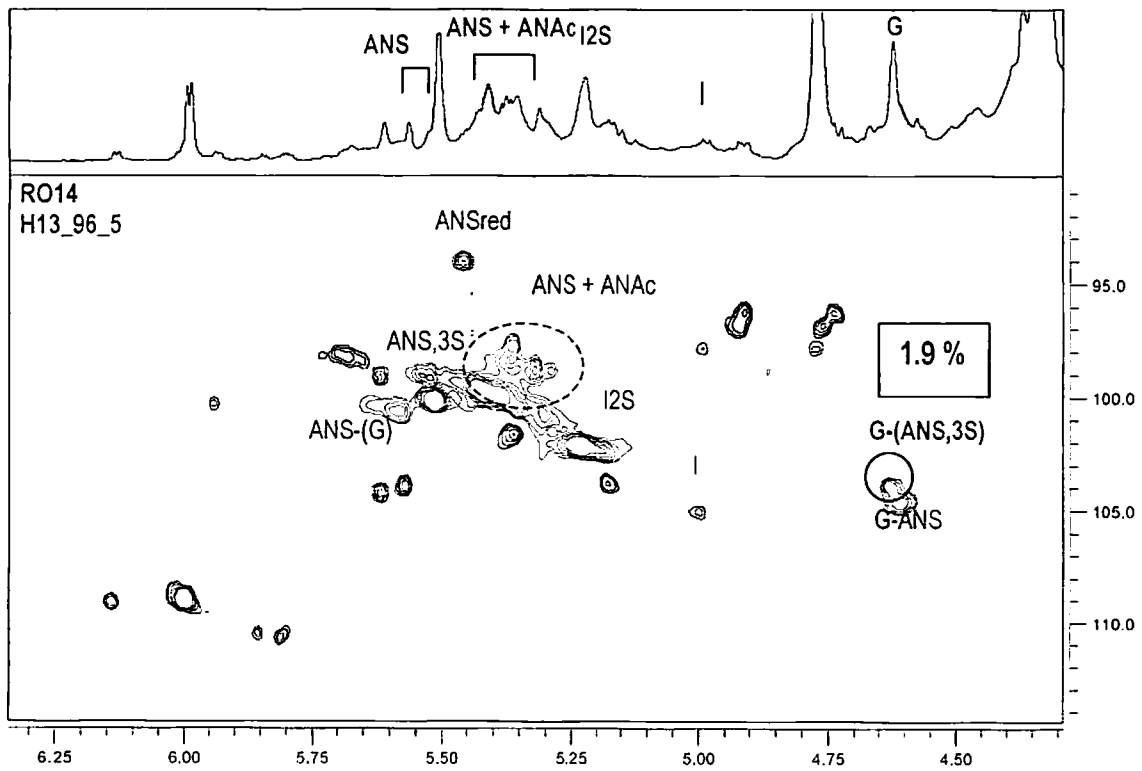


FIGURA 2F

5/10

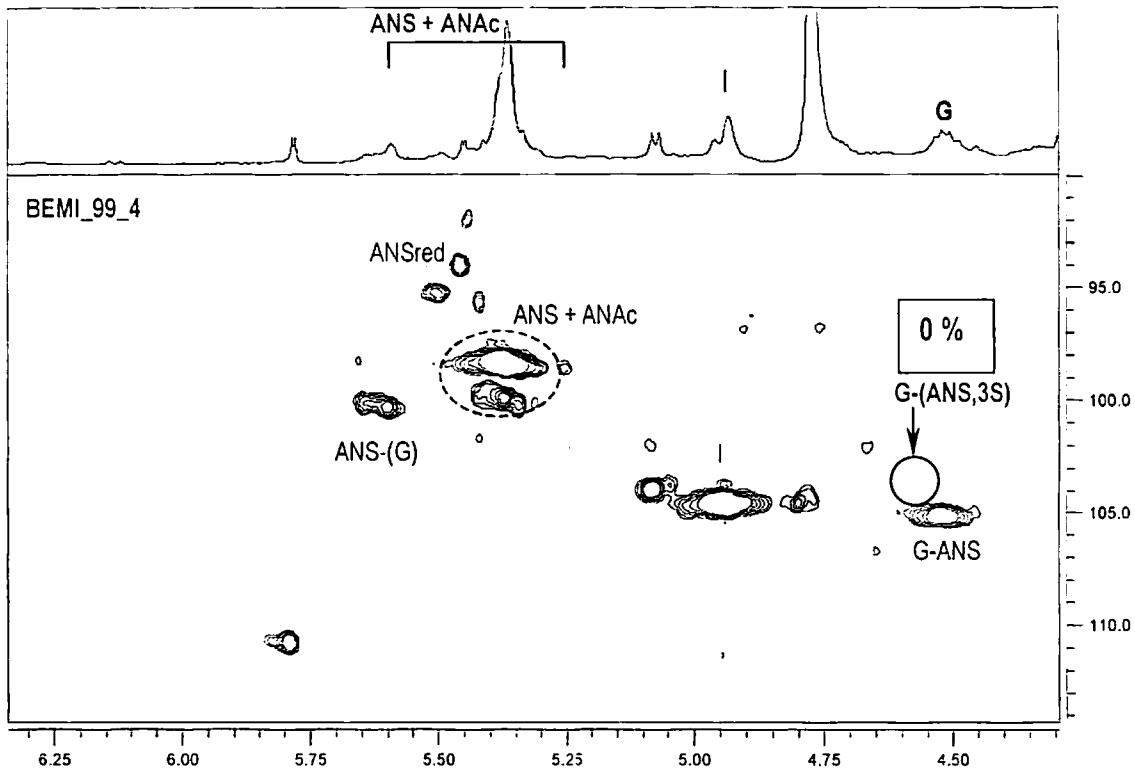


FIGURA 2G

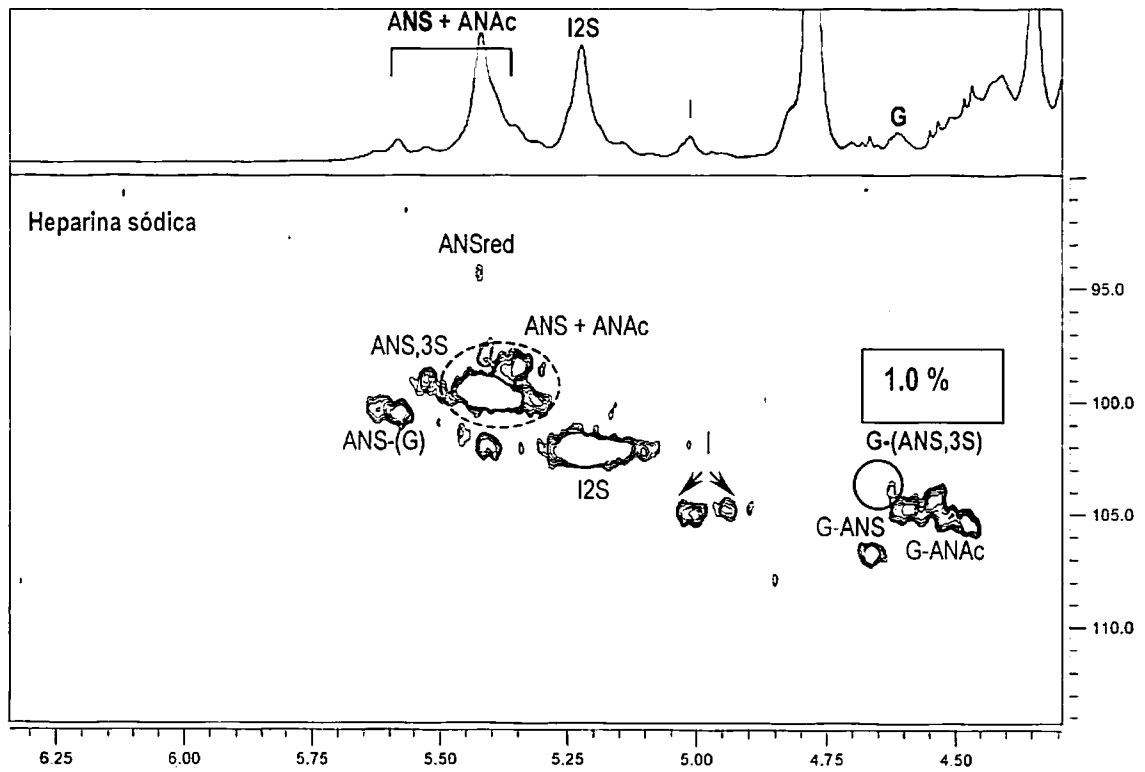


FIGURA 2H

6/10

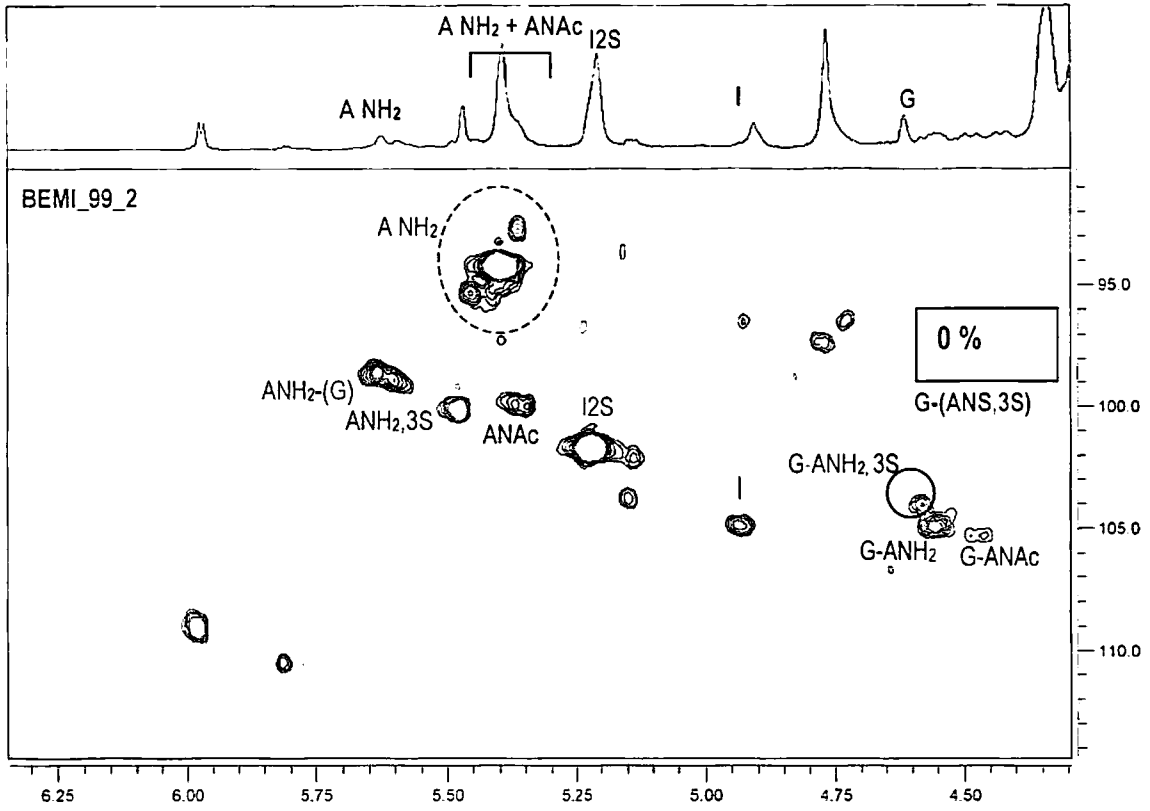


FIGURA 2I

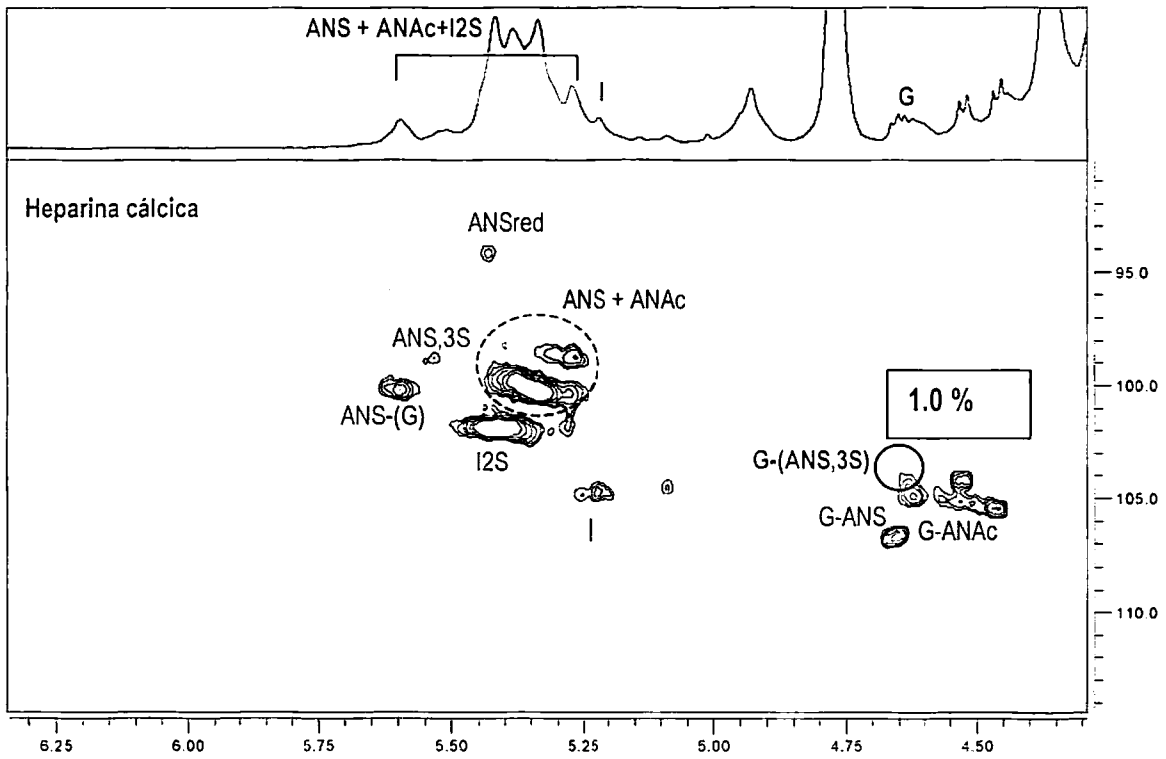


FIGURA 2J

7/10

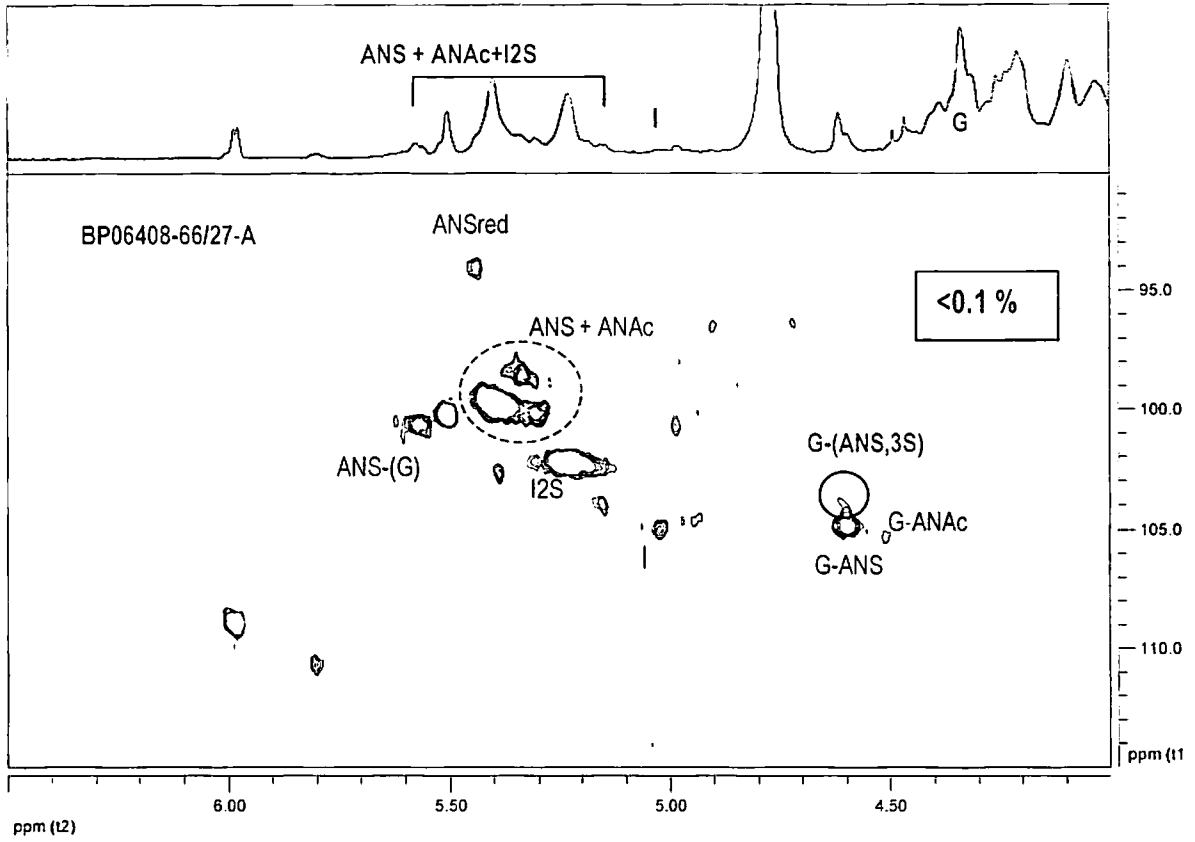


FIGURA 2K

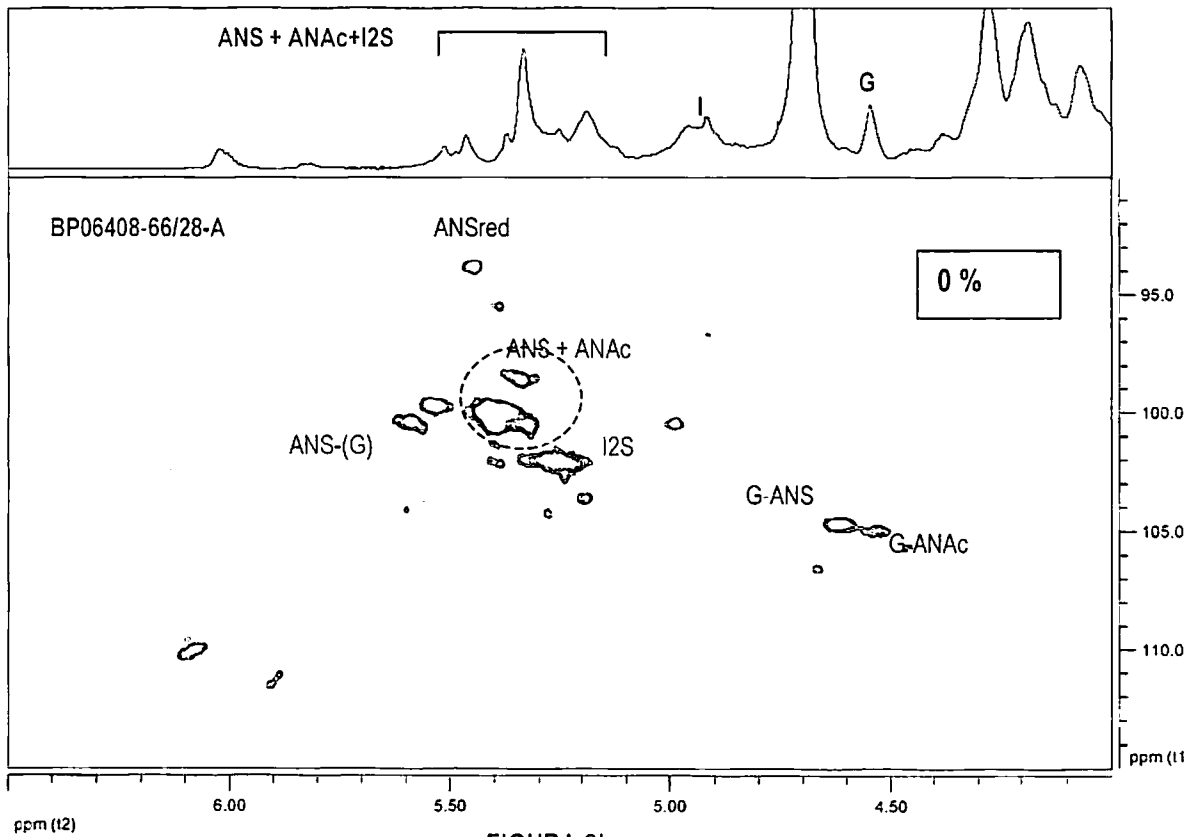


FIGURA 2L

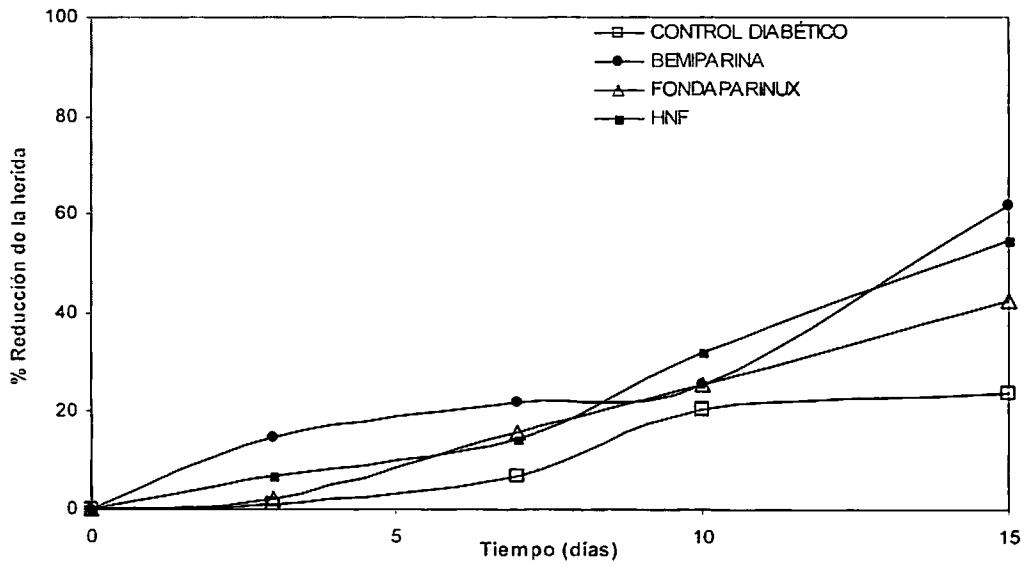


FIGURA 3

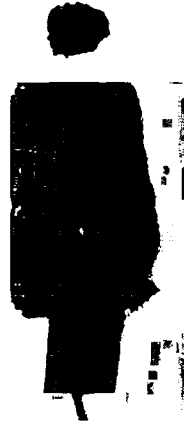
9/10

Ratones diabéticos tratados con HNF

Día de incisión



Día 7



Día 15



Ratones diabéticos tratados con fondaparinux

Día de incisión



Día 7



Día 15



Ratones diabéticos tratados con bemiparina

Día de incisión



Día 7



Día 15



Ratones diabéticos no tratados

Día de incisión



Día 7

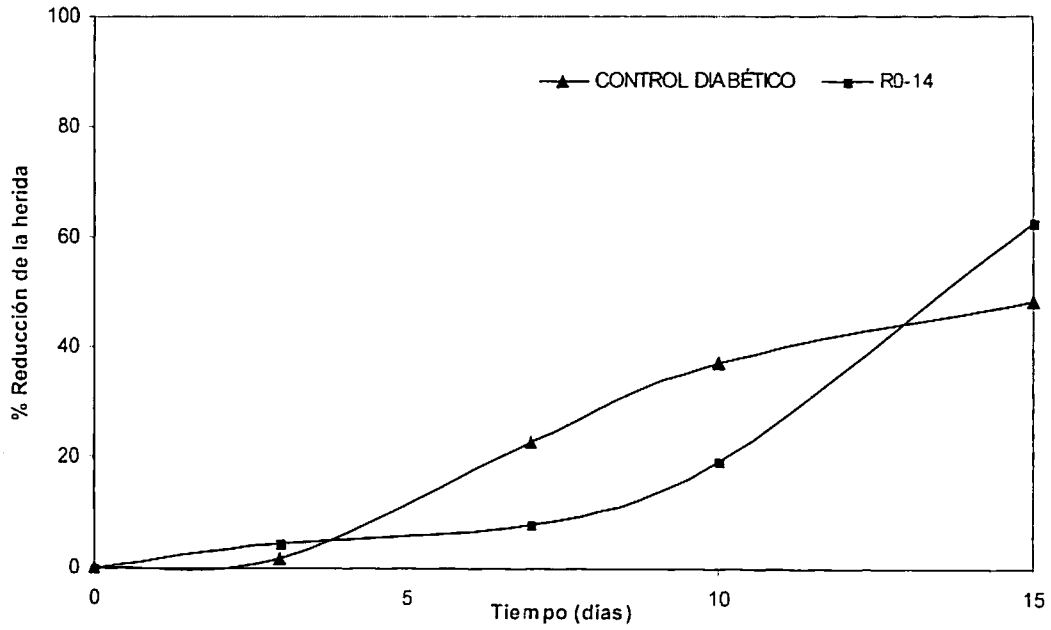


Día 15

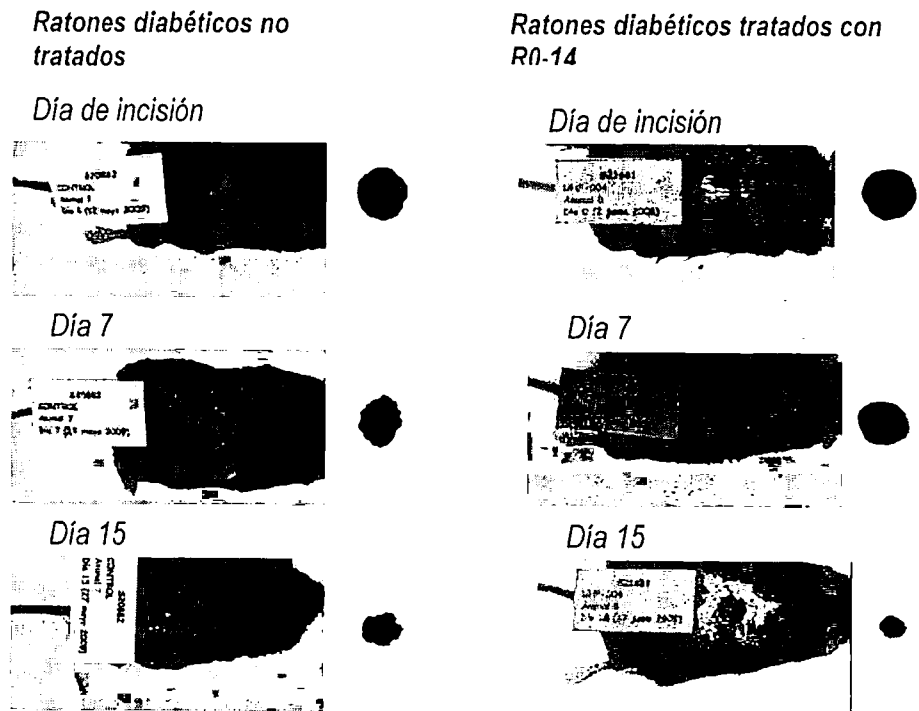


FIGURA 4

10/10



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 2009/070266

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO80/01383 (KABI AB) 10.07.1980, pages 3-4.	1-12
X	EP0040144 A1 (PHARMAINDUSTRIE) 18.11.1981, Pages 4-5.	1-12
X	GUERRINI M; GUGLIERI S; NAGGI A. Low molecular weight heparins: Structural differentiation by bidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Seminars Thrombosis and Hemostasis. July 2007. Vol 33, N° 5, pages 478-489, specially page 485. ISSN 0094-617	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>“E” earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>
---	--

Date of the actual completion of the international search

27 October 2009 (27.10.2009)

Date of mailing of the international search report

(30/10/2009)

Name and mailing address of the ISA/  
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.  
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

A. Barrios de la Fuente

Telephone No. +34 91 349 68 68

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070266

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JORNESKOG GUN; BRISMAR K; FAGRELL B. Low molecular weight heparin seems to improve	13-15,21, 22,23
Y	local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients. Vasa. 1993, Vol 22, N° 2. Pages 137-142. ISSN 0301- 1526	20
Y	Ficha técnica Fragmin. March 2008. [retrieved on 2009-10-27] Retrieved from internet: < URL: <a href="https://sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas.do?methe%20whole=buscar&amp;version=new">https://sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas.do?methe whole=buscar&amp;version=new</a>	20
A	EP 1070503 A1 (LABORATORIOS FARMACEUTICOS ROVI, S.A) 24.01.2001, page 2, lines 31-58	11
A	KALANI M., APELQVIST J.; BLOMBÄCK M. et all.Effect of Dalteparin on Healing of Chronic Foot Ulcers in Diabetic Patients With Pheripheral Arterial Occlusive Disease. Diabetes care. September 2003, Vol 26, N° 9, Sep 2003, pages 2575-2580, the whole document, ISSN 0149- 5992	13-15, 20-23
A	EP1033375 A1 (Yamashina, Ikuo) 6.09.2000; the whole document	1-15
A	DE SANCTIS M.T, CESARONE M.R, INCANDELA L. et all. Four-week treatment with Essaven Gel in Diabetic Microangiopathy. A Placebo-Controlled, Randomized Study. Angiology. December 2001. Vol 52, supplement 3. Pages S49-S55. ISSN 0003-3197	1-15,23

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: 16-19  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
**Claims 16-19 are unclear because the relationship between average plasma life and dosage varies depending on the doses used. Moreover, these claims combine a use of the composition with a parameter which supposedly characterises the composition per se, and for this reason the claims are unclear.**
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070266

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 8001383 A1	10.07.1980	EP 0014184 A	06.08.1980		
		EP 19800850002	07.01.1980		
		NO 802626 A	05.09.1980		
		NO 150801 B	10.09.1984		
		NO 150801 C	27.12.1984		
		DK 380280 A	05.09.1980		
		DK 160764 B	15.04.1991		
		DK 160764 C	23.09.1991		
		JP 56500066 T	22.01.1981		
		JP 63044764 B	06.09.1988		
		US 4303651 A	01.12.1981		
		CA 1136620 A	30.11.1982		
		AT 8998 T	15.09.1984		
		SU 1209033 A	30.01.1986		
		NL 930104 I	01.10.1993		
		-----			
		EP 0040144 A1	18.11.1981	PT 73024 AB	01.06.1981
IE 51283 B	26.11.1986				
IE 811074 L	14.11.1981				
DK 211981 A	15.11.1981				
DK 168824 B	20.06.1994				
FI 811469 A	15.11.1981				
FI 67865 B	28.02.1985				
FI 67865 C	10.06.1985				
NO 811632 A	16.11.1981				
NO 156129 B	21.04.1987				
NO 156129 C	29.07.1987				
EP 19810400728	08.05.1981				
AU 7051981 A	19.11.1981				
FR 2482611 AB	20.11.1981				
MA 19143 A	31.12.1981				
JP 57010601 A	20.01.1982				
JP 60051482 B	14.11.1985				
JP 1324284 C	27.06.1986				
ZA 8103176 A	26.05.1982				
ES 8206555 A	16.11.1982				
AR 229510 A	15.09.1983				
AU 535791 B	05.04.1984				
IN 152828 A	14.04.1984				
IL 62866 A	29.06.1984				
NZ 197081 A	31.07.1984				
KR 840001753 B	19.10.1984				
GR 82283 A	13.12.1984				
CA 1181744 A	29.01.1985				
HU 34769 A	28.04.1985				
HU 188667 B	28.05.1986				
MX 6537 E	04.07.1985				
AT 384428 B	10.11.1987				
AT 213681 A	15.04.1987				
DZ 294 A	13.09.2004				

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070266

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1070503 A1	24.01.2001	EP 19990500184	13.10.1999
		BR 9905820 A	13.03.2001
		JP 2001187802 A	10.07.2001
		ES 2161615 AB	01.12.2001
		US 6384021 B	07.05.2002
		AT 309693 T	15.07.2005
		PT 1070503 E	31.10.2005
		ES 2244165 T	01.12.2005
		DK 1070503 T	05.12.2005
		DE 69925821 T	18.05.2006
EP 1033375 A1	06.09.2000	WO 9926984 A	03.06.1999
		CA 2310422 A	03.06.1999
		AU 1173599 A	15.06.1999
		EP 19980954731	18.11.1998
		JP 3342007 B	05.11.2002
		US 6569840 B	27.05.2003

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070266

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**A61K 31/726** (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°  
PCT/ ES 2009/070266

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	WO80/01383 (KABI AB) 10.07.1980, páginas 3-4.	1-12
X	EP0040144 A1 (PHARMAINDUSTRIE) 18.11.1981, Páginas 4-5.	1-12
X	GUERRINI M; GUGLIERI S; NAGGI A. Low molecular weight heparins: Structural differentiation by bidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. Seminars Thrombosis and Hemostasis. Julio 2007. Vol 33, N° 5, páginas 478-489, en especial página 485. ISSN 0094-617	1-12

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>“&amp;” documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 27 Octubre 2009 (27.10.2009)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional <b>30 DE OCTUBRE DE 2009 (30/10/2009)</b>
---	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. N° de fax 34 91 3495304	Funcionario autorizado <b>A. Barrios de la Fuente</b>
--	--

N° de teléfono +34 91 349 68 68

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070266

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	JORNESKOG GUN; BRISMAR K; FAGRELL B. Low molecular weight heparin seems to improve	13-15,21, 22,23
Y	local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients. Vasa. 1993, Vol 22, N° 2. Páginas 137-142. ISSN 0301- 1526	20
Y	Ficha técnica Fragmin. Marzo 2008. [recuperado el 27-10-2009] Recuperado de internet < URL: <a href="https://sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas.do?metodo=buscar&amp;version=new">https://sinaem4.agemed.es/consaem/fichasTecnicas.do?metodo=buscar&amp;version=new</a>	20
A	EP 1070503 A1 (LABORATORIOS FARMACEUTICOS ROVI, S.A) 24.01.2001, página 2, líneas 31-58	11
A	KALANI M., APELQVIST J.; BLOMBÄCK M. et all.Effect of Dalteparin on Healing of Chronic Foot Ulcers in Diabetic Patients With Pheripheral Arterial Occlusive Disease. Diabetes care. September 2003, Vol 26, N° 9, Sep 2003, páginas 2575-2580, todo el documento, ISSN 0149- 5992	13-15, 20-23
A	EP1033375 A1 (Yamashina, Ikuo) 6.09.2000; todo el documento	1-15
A	DE SANCTIS M.T, CESARONE M.R, INCANDELA L. et all. Four-week treatment with Essaven Gel in Diabetic Microangiopathy. A Placebo-Controlled, Randomized Study. Angiology. Diciembre 2001. Vol 52, suplemento 3. Páginas S49- S55. ISSN 0003-3197	1-15, 23

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070266

## Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1.  Las reivindicaciones N°s:  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
  
2.  Las reivindicaciones N°s: 16-19  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:  
Las reivindicaciones 16-19 no son claras, puesto que la relación tiempo de vida media plasmática y la dosis varían en función de las dosis utilizadas. Además en estas reivindicaciones se mezcla un uso de la composición con un parámetro que pretende caracterizar la propia composición per se, por lo que las reivindicaciones no resultan claras.
  
3.  Las reivindicaciones N°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

## Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1.  Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
  
2.  Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
  
3.  Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
  
4.  Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

### Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070266

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación		
WO 8001383 A1	10.07.1980	EP 0014184 A	06.08.1980		
		EP 19800850002	07.01.1980		
		NO 802626 A	05.09.1980		
		NO 150801 B	10.09.1984		
		NO 150801 C	27.12.1984		
		DK 380280 A	05.09.1980		
		DK 160764 B	15.04.1991		
		DK 160764 C	23.09.1991		
		JP 56500066 T	22.01.1981		
		JP 63044764 B	06.09.1988		
		US 4303651 A	01.12.1981		
		CA 1136620 A	30.11.1982		
		AT 8998 T	15.09.1984		
		SU 1209033 A	30.01.1986		
		NL 930104 I	01.10.1993		
		EP 0040144 A1	18.11.1981	PT 73024 AB	01.06.1981
				IE 51283 B	26.11.1986
IE 811074 L	14.11.1981				
DK 211981 A	15.11.1981				
DK 168824 B	20.06.1994				
FI 811469 A	15.11.1981				
FI 67865 B	28.02.1985				
FI 67865 C	10.06.1985				
NO 811632 A	16.11.1981				
NO 156129 B	21.04.1987				
NO 156129 C	29.07.1987				
EP 19810400728	08.05.1981				
AU 7051981 A	19.11.1981				
FR 2482611 AB	20.11.1981				
MA 19143 A	31.12.1981				
JP 57010601 A	20.01.1982				
JP 60051482 B	14.11.1985				
JP 1324284 C	27.06.1986				
ZA 8103176 A	26.05.1982				
ES 8206555 A	16.11.1982				
AR 229510 A	15.09.1983				
AU 535791 B	05.04.1984				
IN 152828 A	14.04.1984				
IL 62866 A	29.06.1984				
NZ 197081 A	31.07.1984				
KR 840001753 B	19.10.1984				
GR 82283 A	13.12.1984				
CA 1181744 A	29.01.1985				
HU 34769 A	28.04.1985				
HU 188667 B	28.05.1986				
MX 6537 E	04.07.1985				
AT 384428 B	10.11.1987				
AT 213681 A	15.04.1987				
DZ 294 A	13.09.2004				

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070266

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
EP 1070503 A1	24.01.2001	EP 19990500184 BR 9905820 A JP 2001187802 A ES 2161615 AB US 6384021 B AT 309693 T PT 1070503 E ES 2244165 T DK 1070503 T DE 69925821 T	13.10.1999 13.03.2001 10.07.2001 01.12.2001 07.05.2002 15.07.2005 31.10.2005 01.12.2005 05.12.2005 18.05.2006
EP 1033375 A1	06.09.2000	WO 9926984 A CA 2310422 A AU 1173599 A EP 19980954731 JP 3342007 B US 6569840 B	03.06.1999 03.06.1999 15.06.1999 18.11.1998 05.11.2002 27.05.2003

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K 31/726** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)