

(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 2010/000904 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 31/727 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)
A61K 31/726 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070264

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

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

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

(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.

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

Publicada:

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

[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 TRATAMIENTO DE ÚLCERAS CRÓNICAS

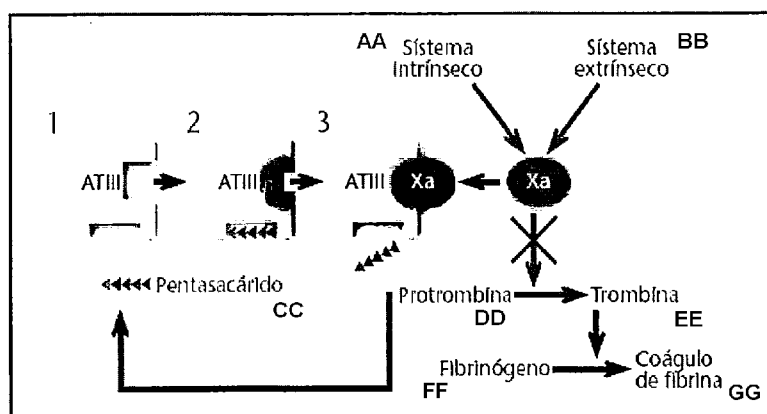


FIGURA 1

AA... Intrinsic System
BB... Extrinsic System
CC... Pentasaccharide
DD... Prothrombin

EE... Thrombin
FF... Fibrinogen
GG... Fibrin coagulum

(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 de bajo peso molecular (HBPM) y heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM) en el tratamiento de úlceras crónicas, en particular de úlceras de pie diabético, y más en concreto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras crónicas, y en particular úlceras de pie diabético y úlceras de presión.



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

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA CON GLICOSAMINOGLICANOS Y SU USO EN TRATAMIENTO DE ULCERAS CRÓNICAS

CAMPO DE LA INVENCIÓN:

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

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

25

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

35

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.

La definición de pie diabético propuesta por el Grupo de Consenso sobre Pie Diabético de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vascular 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".

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. Infect 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.

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.

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 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 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 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 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 beclaplermin (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 cm² según la evaluación por planimetría. El gel de becaplermina 100 µg/g, 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 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 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 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 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.

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 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 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.

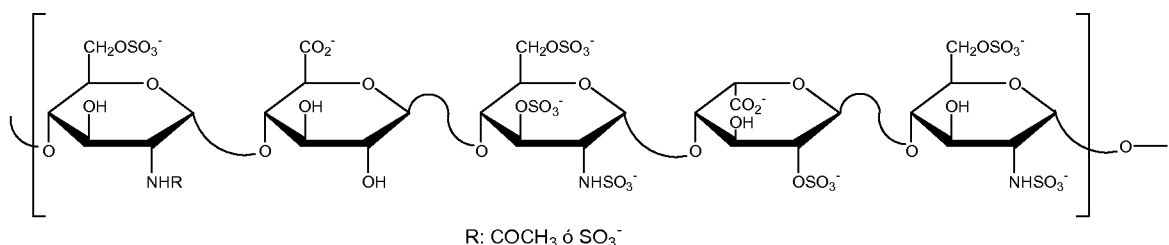
Por lo tanto, la actividad antitrombótica del fondaparinux es consecuencia de la inhibición selectiva del factor Xa, mediada por la antitrombina III (ATIII). Por su unión selectiva a la ATIII, el fondaparinux

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).

5 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
10 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 que el efecto beneficioso cicatrizante de la administración de los
15 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 tres vías principales de administración: parenteral, oral y tópica.

Fue gracias a los trabajos realizados a principio de los años 80 por los grupos de Lindahl y Choay
20 (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):

25



Formula 1

30 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

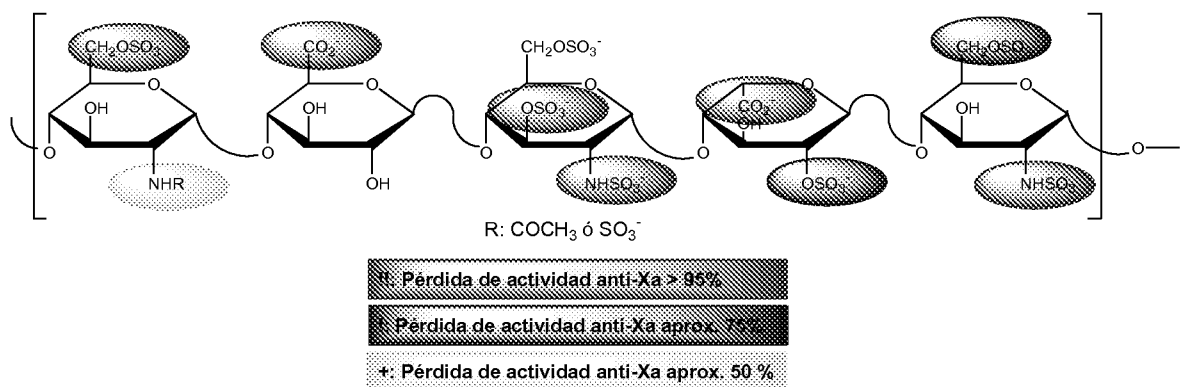
- 7 -

nos permite la determinación de la cantidad de pentasacárido dentro de la estructura general a través de la cuantificación del contenido de una unidad disacáridica específica y exclusiva del pentasacárido llamada Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina ($A_{NS,3S}$). 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).

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.

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



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 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.

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.

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.

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) 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).

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 reperusión 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-reperusión 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 reperusión 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.

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
5 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, Ácido L-Idurónico y Ácido L-Idurónico 2-
10 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.

15 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.

20 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
25 "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
30 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 bemiparina, por ejemplo.

35 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 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 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.

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 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) .

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 proporción de secuencias oligosacarídicas 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 oligosacarídicas que no contienen el 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
10 proximidad de la herida. Por ello, para los fines de la presente invención las vías preferidas de administración son la vía parenteral, la vía oral y la vía tópica no invasiva o de aplicación directa sobre la mucosa a tratar.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

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}C - ^1H HSQC de fondaparinux (pentasacárido responsable de la interacción con antirombina
20 III) registrado a 298 K en agua deuterada (D_2O). 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
25 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%.

Figura 2B: Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del
30 espectro ^{13}C - ^1H HSQC de la heparina de bajo peso molecular bemiparina, registrado a 298 K en agua deuterada (D_2O). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacarídicas 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,
35 **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 oligosacarídicas no presentan el motivo estructural responsable de la interacción con la antitrombina III.

También se han etiquetado las señales:

10 **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}C - ^1H HSQC de la heparina de muy bajo peso molecular RO14 ckw2_13_11L, registrado a 298 K en agua deuterada (D_2O). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacarídicas 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 oligosacarídicas 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.

30 **Figura 2D:** Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro ^{13}C - ^1H HSQC de la heparina de bajo peso molecular enoxaparina, registrado a 298 K en agua deuterada (D_2O). El espectro es mucho más complejo que el obtenido para fondaparinux (ver figura 2A), debido a la presencia de nuevas unidades monosacarídicas 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),
5 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.

10 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}C - ^1H HSQC de la heparina de bajo peso molecular tinzaparina, registrado a 298 K en agua deuterada (D_2O). 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),
15 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
20 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.

30

Figura 2F: Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro ^{13}C - ^1H HSQC de la heparina de muy bajo peso molecular RO14_H13_96_5, registrado a 298 K en agua deuterada (D_2O). 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
35 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.

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}C - ^1H HSQC de la heparina de bajo peso molecular BEMI_99_4, registrado a 298 K en agua deuterada (D_2O). 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}C - ^1H HSQC de heparina sódica, registrado a 298 K en agua deuterada (D_2O). 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.

5 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 13C-1H HSQC de la heparina de bajo peso molecular BEMI_99_2, registrado a 298 K en agua deuterada (D2O). 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).

15

Figura 2J: Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro 13C-1H HSQC de heparina cálcica, registrado a 298 K en agua deuterada (D2O). 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.

20
30 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 13C-1H HSQC de la heparina de bajo peso molecular BP06408-66/27-A, registrado a 298 K en agua deuterada (D2O). El espectro es muy diferente al obtenido para fondaparinux (ver figura 2A),

35

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.

Figura 2L: Representación de la región de las señales anoméricas (correlaciones H1-C1) del espectro ¹³C-¹H HSQC de la heparina de bajo peso molecular BP06408-66/28-A, registrado a 298 K en agua deuterada (D₂O). 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 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.

Figura 3: Muestra el porcentaje de reducción de área ulcerada en los ratones del Ejemplo 2 cuando se administra bemiparina con una relación entre la vida media y la dosis de 1:950, bemiparina con una relación entre la vida media y la dosis de 1:472 y fondaparinux a dosis equivalentes de tratamiento, es decir 5mg/ml, ya que tiene una vida media plasmática de 17 horas en individuos sanos, por lo que en rata wistar es de 0,22 mg por rata.

Figura 4: Muestra la evolución de los ratones control diabéticos del Ejemplo 4 con respecto a los ratones tratados con bemiparina sódica. El área de la herida se ha representado a la derecha de cada animal.

Figura 5: Muestra la evolución del tanto por ciento de cicatrización de la herida con el tiempo en los ratones del Ejemplo 4.

Figura 6. Microfotografías de las secciones de las heridas de los ratones del Ejemplo 4 tras la tinción con hematoxilina-eosina. A control diabético. B animal diabético tratado con fondaparinux sódico, C animal diabético tratado con bemiparina sódica.

Figura 7: 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 y una composición tópica de fondaparinux sódico , una composición tópica de heparina no fraccionada.

5 **Figura 8:** Muestra la evolución de los ratones control no diabéticos del Ejemplo 5 con respecto a los ratones tratados con heparina cálcica. El área de la herida se ha representado a la derecha de cada animal.

Figura 9: Muestra la evolución del tanto por ciento de cicatrización de la herida con el tiempo en los ratones del Ejemplo 5.

10

Figura 10: Microfotografías de las secciones de las heridas de los ratones del Ejemplo 5 tras la tinción con hematoxilina-eosina. A control no diabético. B animal no diabético tratado con bemiparina sódica, C animal no diabético tratado con heparina cálcica.

15 **Figura 11:** Se representa el porcentaje de reducción de área ulcerada en rata wistar diabética cuando se le administra una solución control por vía oral, una suspensión oral de bemiparina sódica de 100 mg/kg y una suspensión de fondaparinux sódico de 10 mg/kg

20 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

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

25 La solución se basa en que los inventores han identificado que una composición farmacéutica de glicosaminoglicanos por vía subcutánea o parenteral, vía oral y/o 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 composición):

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

y que está caracterizada porque la proporción de la unidad disacáridica 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
35 miembro, y es efectiva como tratamiento terapéutico y no solo en profilaxis.

Otro aspecto de la invención se refiere también al uso de una composición de glicosaminoglicanos por vía subcutánea o parenteral, vía oral y/o 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, Ácido 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.

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 de pie diabético 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 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, entendiendo como dosis de tratamiento, aquellas en las que 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, 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 subcutánea o parenteral, vía oral y/o 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%
- Ácido L-Idurónico: 0-35%
- 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 subcutánea o parenteral, vía oral y/o vía tópica, en particular HBPM y HMBPM, para tratamiento de úlcera de pie diabético que contienen la siguiente proporción de los

- 20 -

siguientes monosacáridos:

- N-sulfo-D-Glucosamina: 25-50%
- N-acetil-D-Glucosamina: 0-10%
- 5 - Ácido L-Idurónico: 0-10%
- 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 subcutánea o parenteral, vía oral y/o 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%
- 15 - N-acetil-D-Glucosamina: 0,1-8%
- Ácido L-Idurónico: 1-10%
- 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 subcutánea o parenteral, vía oral y/o 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.

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

- 5 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

- 20 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 Ácido L-Idurónico y Ácido L-Idurónico 2-sulfatado, y

- 22 -

una proporción de la unidad disacáridica 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%

- 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.

- 10 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 disacáridica Ácido D-
15 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
20 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.

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

- 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
35 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 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.

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.

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 modifican química y/o enzimáticamente los monosacáridos seleccionados del grupo formado por N-sulfo-D-Glucosamina, N-acetil-D-Glucosamina, Ácido 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 cuantitativamente los monosacáridos anteriormente mencionados no obtenemos una buena actividad cicatrizante y/o regenerativa tisular.

EJEMPLOS

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.

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 HPBM en las que la relación entre el tiempo de vida media plasmática de cada HPBM y la dosis en UI de la HPBM es entre 1:800 y 1:5.000 proporcionan las

ventajas indicadas de la invención.

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

5 Productos comerciales:

- 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.
- 10 - 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 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.
- 15 - Enoxaparina: Heparina de bajo peso molecular obtenida por despolimerización por un método de β -eliminación en medio acuoso de los ésteres bencílicos 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
- 20 - 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.
- 30 - Heparina Sódica: Heparina no Fraccionada. Entre otras presenta las siguientes características (Ph. Eur. 6th Edition): Actividad anticoagulante: ≥ 150 UI/mg
- Heparina Cálcica: Heparina no Fraccionada. Entre otras presenta las siguientes características (Ph. Eur. 6th Edition): Actividad anticoagulante: ≥ 150 UI/mg

Productos en fase de investigación:

- RO-14: Heparina de muy bajo peso molecular obtenida por despolimerización por un método de β -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.

- 5 - 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 afectado cualitativa y cuantitativamente.

10 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
15 150 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% 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
20 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 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
25 reacción se mantiene 3 h a 55 °C. Transcurrido 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 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
30 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
35 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 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.

- 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

- 27 -

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.

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.

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

- 10 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.

ESTUDIO DE CUANTIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE FRACCIONES POR RMN

Determinación de las proporciones monosacáridicas de los productos

- 15 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.

- 20 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 ^{13}C - ^1H HSQC (heteronuclear single quantum coherence) cuantitativos, según el método descrito por Marco Guerrini et al. El incremento de resolución que se consigue con la
25 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 ^1H que dificultan la determinación de las áreas de picos aislados en el 1D para su cuantificación.

- 30 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
35 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}C - ^1H HSQC de fondaparinux y de distintos GAGs se muestran en las Figuras 2A a 2L adjuntas, en las que la señal de correlación ^1H - ^{13}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 monosacarídicas, como son los anillos de ácido idurónico sin sulfatar (I) o glusaminas 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.

- 29 -

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
ANS,3S	20	2,4	3,1	3,0	0	0	<0,1	0	2,2	2,3	1,0	2,2	<20
G-ANS,3S	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 2-sulfatado
 I: Ácido L-Idurónico G-Ácido D-Glucurónico
 ANS,3S: N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina
 G-ANS,3S: Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina.

ESTUDIO EN RATA WISTAR POR VÍA PARENTERAL

Ejemplo 1:5 Diabetización de ratas wistar.

Para realizar el presente ejemplo se administraron dosis de estreptozocina (STZ) por vía intramuscular de 45 mg/kg de estreptozocina para hacer diabéticas a un lote de 8 ratas (Andrades Ja et al. Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth Factors. 2001;18(4):261-75)

10

Se emplearon ratas wistar macho con un peso medio de 250 g por rata a las que se les administró una dosis 11.25 mg STZ por rata mediante la administración intramuscular de 100 µL en pata izquierda de cada rata.

15

A todas las ratas se les administró agua azucarada (350 mg/dL) durante tres días y se realizaron mediciones de glucosa con un glucómetro todos los días para comprobar que las ratas efectivamente estaban diabetizadas. Por eso, antes de la administración y a tiempo 4 días tras la administración de estreptozocina, se extrajo una gota sangre de la vena de la cola de la rata para la posterior cuantificación de la glucemia y ver si eran diabéticas antes de comenzar el ensayo de ulceración.

20

Tabla 1: Medida peso-glucemia ratas wistar

RATA	PESO (g)	Glucemia Día 0 (mg/dL)	Glucemia día 4 (mg/dL)	Glucemia día 9 (mg/dL)
1	250	120	>350	>350
2	245	129	>350	----
3	255	119	>350	----
4	250	135	>350	----
5	240	136	>350	----
6	260	171	>350	>350
7	270	124	>350	----
8	245	133	>350	----

Ulceración de ratas wistar y medida del grado de cicatrización

25

Para este ejemplo se escogieron 3 grupos con 8 ratas Wistar macho en total:

Grupo control:	2 ratas
Grupo 1: Dosis alta de heparina (217 UI)	3 ratas
Grupo 2: Dosis baja de heparina (108 UI)	3 ratas

La selección de las ratas incluidas en cada grupo se realizó al azar.

Una vez diabetizadas las ratas, se les realizaron 4 úlceras de 1 cm de diámetro cada una gracias a un bisturi. Se siguió un protocolo de anestesia/analgesia con Ketamina/xilacina siguiendo las recomendaciones del libro: "Handbook of laboratory animal management and welfare":

- Anestesia: 10mg/kg xilacina + 90 mg/kg ketamina IP
- Analgesia: 300 mg/kg paracetamol vía oral (disuelto en el agua)

En el presente ejemplo, al día siguiente de la ulceración todas las ratas incluidas en el estudio excepto una del Grupo 1 y otra del Grupo 2 aparecieron muertas. La causa de la muerte no se debió a fenómenos de infección, sino que posiblemente fue debido al efecto de la anestesia. Por tanto se continuó el experimento con dos ratas con cuatro úlceras cada rata una de dosis alta de Bemiparina y otra de dosis baja de Bemiparina, por lo que se continuó con el experimento para observar diferencias en la cicatrización y superficie ulcerada entre las distintas dosis.

Durante 9 días tras la ulceración se realizaron curas con agua y limpieza en las úlceras.

Las administraciones de bemiparina se realizaron mediante una solución de bemiparina por vía subcutánea (100 µL) para el tratamiento de las úlceras.

Se cuantificó el diámetro de la úlcera mediante el calcado de la úlcera en transparencia para ver el progreso de la cicatrización.

En la Tabla 2 se muestra el cálculo de porcentaje de disminución de área del día 9 respecto al día 1:

Tabla 2

Rata 108 UI		Rata 217 UI	
E	43.23% *	A	26.2 %
F	17.36 %	B	20.14 %
G	32.24 %	C	25.64 %
H	23.59 %	D	37.43 %
Media: 24.39±7.47		Media: 27.35±7.25	

(*Se excluye de la media por cuantificación errónea)

Progreso de la cicatrización

- 5 Cuantitativamente no se aprecia mucha diferencia en cuanto al área de las úlceras entre las dos ratas. Sin embargo, el proceso de cicatrización de la rata D=217 UI es mucho mejor macroscópicamente ya que el cierre de la úlcera presentaba mayor calidad en la regeneración del tejido dérmico o de granulación con menor contenido fibroso que la rata D=108 UI, por lo que se aprecia una mejora cualitativa en cuanto a la cicatrización y regeneración del tejido ulcerado con la administración D=217.

Ejemplo 2:10 Diabetización de ratas wistar

Para realizar el presente ejemplo de realización se administraron dosis de estreptozocina (STZ) por vía intramuscular de 45 mg/kg de estreptozocina para hacer diabéticas a un lote de 8 ratas (Andrades Ja et al. Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth Factors. 2001;18(4):261-75).

15

Se emplearon ratas wistar macho con un peso medio de 250 mg por rata a las que se les administró una dosis 11.25 mg STZ por rata mediante la administración intramuscular de 100 µL en pata izquierda de cada rata.

- 20 A todas las ratas se les administró agua azucarada (350 mg/dL) durante tres días y se realizaron mediciones de glucosa con un glucómetro todos días para comprobar que las ratas efectivamente estaban diabetizadas. Por eso, antes de la administración y a tiempo 4 días tras la administración de estreptozocina, se extrajo una gota sangre de la vena de la cola de la rata para la posterior cuantificación de la glucemia y ver si eran diabéticas para comenzar con el ensayo de ulceración.

25

Tabla 3: Medida peso-glucemia ratas wistar

RATA	PESO (g)	Glucemia Día 0 (mg/dL)	Glucemia día 4 (mg/dL)	Glucemia día 9 (mg/dL)
1	240	128	>350	1
2	240	132	>350	2
3	250	121	>350	3
4	260	138	>350	4
5	250	142	>350	5
6	245	136	>350	6
7	265	129	>350	7
8	245	141	>350	8

Ulceración de ratas wistar y medida del grado de cicatrización

Para este ejemplo se escogieron 3 grupos con 8 ratas Wistar macho en total:

Grupo control Fondaparinux	2 ratas
Grupo 1: Dosis alta de heparina (217 UI)	2 ratas
Grupo 2: Dosis baja de heparina (108 UI)	2 ratas

5

La selección de las ratas incluidas en cada grupo se realizó al azar.

Una vez diabetizadas las ratas, se les realizaron 2 úlceras de 1 cm de diámetro cada una gracias a un bisturi. Se siguió un protocolo de anestesia/analgesia con Ketamina/xilacina siguiendo las recomendaciones del libro: "Handbook of laboratory animal management and welfare":

10

- Anestesia: 10mg/kg xilacina + 90 mg/kg ketamina IP
- Analgesia: 300 mg/kg paracetamol vía oral (disuelto en el agua)

Durante 9 días tras la ulceración se realizaron curas con agua y limpieza en las úlceras.

15

Las administraciones de bemiparina y de fondaparinux se realizaron mediante una solución de bemiparina por vía subcutánea (100 µL) para el tratamiento de las úlceras.

Se cuantificó el diámetro de la úlcera mediante el calcado de la úlcera en transparencia para ver el progreso de la cicatrización.

20

En la Tabla 4 se muestra el cálculo de porcentaje de disminución de área del día 9 respecto al día 1:

Tabla 4

Ratas 217 UI Lote 1		Ratas 108 UI Lote 2		Ratas Fondaparinux Lote 3	
A	29,31 %	E	16,96 %	H	17,00 %
B	31,85 %	F	13,26 %	I	20,69 %
C	28,40 %	G	19,14 %	J	21,32 %
D	24,89 %	H	19,71 %	K	23,81 %
Media: 27.35±7.25		Media: 24.39±7.47		Media: 20,70±7.20	

25

Las medias de los tres lotes de este ensayo se muestran en la Figura 3.

Progreso de la cicatrización

En este ensayo, ya se parecía una reducción del área ulcerada entre el día 0 al día 9 (ver figura 3); además, igual que en el ejemplo 1, sí se aprecia una diferencia cuantitativa de forma macroscópica respecto al tipo de cicatrización del tejido ulcerado: el proceso de cicatrización de la rata D=217 UI es mucho mejor macroscópicamente que en el caso de fondaparinux, en el que la herida no presentaba apenas variación el día 9 respecto al día 0. En el caso de la rata con D=217 el cierre de la úlcera presentaba mayor calidad en la regeneración del tejido dérmico o de granulación con menor contenido fibroso que la rata D=108 UI, por lo que se aprecia una mejora cualitativa en cuanto a la cicatrización y regeneración del tejido ulcerado con la administración D=217 y la rata con fondaparinux.

Ejemplo 3:Diabetización de ratas wistar

Para realizar el presente ejemplo de realización se administraron dosis de estreptozocina (STZ) por vía intramuscular de 45 mg/kg de estreptozocina para hacer diabéticas a un lote de 10 ratas (Andrades Ja et al. Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth Factors. 2001;18(4):261-75)

Se emplearon ratas wistar macho con un peso medio de 250 g por rata a las que se les administró una dosis 11.25 mg STZ por rata mediante la administración intramuscular de 100 µL en pata izquierda de cada rata.

De todas las ratas a 6 se les indujo diabetes y 4 de ellas se dejaron como control no diabético, para probar el resultado de la cicatrización de úlceras crónicas no originadas por diabetes.

A las ratas diabéticas se les administró agua azucarada (350 mg/dL) durante tres días y se realizaron mediciones de glucosa con un glucómetro todos días para comprobar que las ratas efectivamente estaban diabetizadas. Por eso, antes de la administración y a tiempo 4 días tras la administración de estreptozocina, se extrajo una gota sangre de la vena de la cola de la rata para la posterior cuantificación de la glucemia y ver si eran diabéticas para comenzar con el ensayo de ulceración.

Tabla 5: Medida peso-glucemia ratas wistar

- 35 -

RATA	PESO (g)	Glucemia Día 0 (mg/dL)	Glucemia día 4 (mg/dL)
1	250	138	>350
2	255	145	>350
3	250	129	>350
4	260	122	>350
5	255	146	>350
6	260	140	>350
RATAS NO DIABÉTICAS			
RATA	PESO (g)	Glucemia Día 0 (mg/dL)	Glucemia día 4 (mg/dL)
7	245	135	141
8	260	149	137
9	245	152	129
10	250	148	138

Ulceración de ratas wistar y medida del grado de cicatrización

Para este ejemplo se escogieron 5 grupos con 10 ratas Wistar macho en total:

Grupo control no diabético	2 ratas
Grupo control diabético	2 ratas
Grupo 1: Bemiparina no diabético (217 UI/rata)	2 ratas
Grupo 2: Bemi 99_2 diabetico (2.2 mg/rata)	2 ratas
Grupo 3: Fondaparinux diabético (0.22 mg/rata)	2 ratas

5

La selección de las ratas incluidas en cada grupo se realizó al azar.

Una vez listas las ratas, se les realizaron 2 úlceras de 1 cm de diámetro cada una gracias a un bisturi. Se siguió un protocolo de anestesia/analgesia con Ketamina/xilacina siguiendo las recomendaciones del libro: "Handbook of laboratory animal management and welfare":

10

- Anestesia: 10mg/kg xilacina + 90 mg/kg ketamina IP
- Analgesia: 200 mg de ibuprofeno vía oral (disuelto en 1L de agua)

15

En el presente ejemplo al día siguiente de la ulceración, una de las ratas diabéticas del grupo 3 apareció muerta. La causa de la muerte no se debió a fenómenos de infección, sino que posiblemente fue debido al efecto de la anestesia. Por tanto se continuó el experimento con 8 ratas con dos úlceras cada rata de los grupos control diabético, control no diabético, grupo 1 y grupo 2 y con 1 rata con dos úlceras del grupo 3, por lo que se continuó con el experimento para observar diferencias en la cicatrización y superficie ulcerada entre las distintas dosis.

20

Durante 9 días tras la ulceración se realizaron curas y limpieza en las úlceras. Se administró una solución correspondiente a cada grupo por vía SC (100 µL) para el tratamiento de las úlceras. Se cuantificó el diámetro de la úlcera mediante el calcado de la úlcera en transparencia para ver el progreso de la cicatrización.

5

En la Tabla 6 se muestra el calculo de porcentaje de cicatrización del día 9 respecto al día 1:

Tabla 6

Control no diabético	Grupo 1	Control Diabético	Bemi 99_2	Fondaparinux
A 39,85%	A 75,05%	A 56,70%	A 51,98%	A 50,99%
B 46,12%	B 69,83%	B 57,24%	B 37,08%	B 49,55%
C 51,02%	C 72,56%	C 47,41%	C 68,21%	--
D 43,74%	D 69,83%	D 51,82%	D 62,12%	--
Media : 45,18%	Media : 71,82%	Media : 53,29%	Media : 54,85%	Media : 50,22%

En este ensayo se ha realizado un estudio del porcentaje de cicatrización: como se puede observar, las ratas, en un proceso de estudio de 9 días, tienen un porcentaje de cicatrización de un 50% aproximadamente, es decir que en 9 días la herida se reduce a la mitad. Sin embargo, como se aprecia en los ejemplos anteriores, cuando se les administra una composición de oligosacáridos con mayor porcentaje de los monosacáridos:

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

15

en la que la proporción de la unidad disacáridica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina no es superior al 20%, se observa que la cicatrización aumenta a un 70 % aproximadamente, y aún más si la dosis es superior (mayor cantidad en relación con la totalidad de monosacáridos).

20

En aquellas ratas no diabéticas, la cicatrización es similar a las ratas diabetizadas. Es decir, no se observa diferencia entre la cicatrización de los controles diabéticos y los no diabéticos.

25

Cuando se les administra fondaparinux, el porcentaje de cicatrización se mantiene igual, es decir no presenta mejoras frente a su control diabético, por lo que se concluye que realmente este producto no favorece la cicatrización de las úlceras.

Cuando se administra la heparina de bajo peso molecular alterada Bemi_99_2, la respuesta es prácticamente igual que su control diabético, por lo que se concluye que realmente este producto no

favorece la cicatrización de las úlceras debido a que tiene alterados aquellos monosacáridos responsables de la cicatrización de las úlceras.

5 En el caso de la administración de Bemiparina no diabético (217 UI/rata), es decir, las ratas del Grupo 1, se observa que la cicatrización se reduce sustancialmente en un 71,82% frente a su control no diabético, por lo que se concluye que en el caso de úlceras crónicas de pacientes no diabéticos (como las úlceras por presión) la administración de una composición de oligosacáridos con mayor porcentaje de los monosacáridos:

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

en la que la proporción de la unidad disacáridica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina no es superior al 20%, se observa que la cicatrización de un 70 % aproximadamente.

15 Como conclusiones generales cualitativas de los estudios se resalta que el proceso de cicatrización de la s ratas del Grupo 1 es mucho mejor macroscópicamente ya que el cierre de la úlcera presentaba mayor calidad en la regeneración del tejido dérmico o de granulación con menor contenido fibroso que en el resto de grupos.

20 ESTUDIO EN RATA WISTAR POR VÍA ORAL

El objetivo de este estudio es evaluar la actividad cicatrizante de los productos de ensayo: fondaparinux sódico y bemiparina tras su administración por vía oral en el modelo de heridas en rata diabética.

25 Ambos tratamientos se administraron por vía oral a un volumen de administración de 10 mL/kg. En el caso del fondaparinux se administró una dosis de 10 mg/kg y en el caso de bemiparina 100 mg/kg.

El grupo control recibió únicamente el vehículo utilizado para preparar el producto de ensayo. El vehículo para la preparación del producto de ensayo es una solución de bicarbonato al 1,5 % (p/v) en agua para inyecciones. Se comprobó que el pH de las formulaciones preparadas estuviera por encima de 8,00.

30

Diabetización de ratas wistar

Al inicio del ensayo, se indujo una diabetes mellitus a todos los animales. Para ello, recibieron una única inyección intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg, 10 mL/kg). 72 horas después, se comprobó el establecimiento de la diabetes analizando los niveles de glucosa en sangre. Para ello, se anestesiaron los
35 animales con isoflurano y se extrajeron 0.8 mL de sangre del seno retroorbicular. Los animales debían

tener valores de glucosa superiores a los 15 mmol/L. Una semana después de la inducción de la diabetes se procedió a la realización de la herida.

5 Se anestesiaron los animales (Ketamina + Xilacina, 90 + 10 mg/kg, i.m.). Se les rasuró y limpió el lomo con desinfectante (povidona yodada) y se marcó la zona donde se realizaría la herida, mediante plantilla para homogeneizar su posición en todos los animales.

10 La herida se realizó mediante una incisión circular de aproximadamente 1,5 cm de diámetro, extirpándose la piel de la zona media dorsal. 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 suministró analgesia (paracetamol, 1 mg/mL) en el agua de bebida.

15 Al día siguiente de la realización de la herida y durante un total de 14 días, los animales se administraron con los tratamientos asignados. Se realizó el seguimiento de los animales valorándose macroscópicamente la evolución de las heridas 2 veces por semana, mediante fotografía digital de la herida. Se registró también el peso corporal de los animales dos veces por semana.

20 Al día siguiente de la última administración, se sacrificaron los animales con sobredosis anestésica (pentobarbital sódico). Se procedió a extraer el área donde se realizó la herida. La mitad anterior se congeló en nitrógeno líquido y se conservó en congelador ($-80 \pm 5^\circ\text{C}$) y la mitad posterior se conservó en formol para su posterior procesamiento histológico.

Medida del grado de cicatrización

25 El área de las heridas se calculó como el porcentaje de reducción de la misma para evaluar el grado de curación de las mismas, mediante la fórmula estandarizada:

$$\% \text{ curación} = \frac{(A_{\text{basal}} - A_{\text{tiempo}})}{(A_{\text{basal}})} \times 100$$

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

Ratas no diabetizadas

Al día siguiente y durante un total de 14 días, los animales se administraron con 10 mL/kg por vía oral.

Para ello, previamente los animales se distribuyeron homogéneamente, según el peso corporal, en los siguientes grupos de tratamiento, con al menos 5 animales por grupo:

Tratamiento	Dosis
Control no diabético	-
Rata tratada con fondaparinux sódico	10 mg/kg
Rata tratada con bemiparina sódica	100 mg/kg

- 5 Al día siguiente de la realización de la herida y durante un total de 14 días, los animales se administraron con los tratamientos asignados.

Se realizó el seguimiento de los animales valorándose macroscópicamente la evolución de las heridas 2 veces por semana, mediante fotografía digital de la herida. Se registró también el peso corporal de los animales dos veces por semana.

Medida del área de la herida.

Los valores correspondientes al área de la herida no fueron significativos. En este caso, las ratas tratadas con Bemiparina sódica redujeron el área de ulceración más o menos en igual medida que los animales testigo.

Evaluación histopatológica.

El día 15 del estudio se sacrificaron los animales y la zona de la piel dónde se produjo la herida se conservó en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina).

A cada corte se le dio una puntuación histológica en el rango grado I a grado V, donde I significa herida sin curar y V herida completamente epitelizada. La puntuación se basa en el grado de invasión celular, la formación tejido de granulación, vascularización y epitelización.

25 Las puntuaciones histopatológicas obtenidas para los distintos grupos se muestran en la siguiente tabla:

Tratamiento	Puntuación	Grado
Control no diabético	10,0	III
Animal diabético tratado con fondaparinux sódico	9,5	III

Animal diabético tratado con bemiparina sódica

9,0

III

Todas las muestras pertenecientes a los animales sacrificados a los 15 días del inicio del tratamiento presentaban actividad cicatrizante evolucionada, con clara presencia de tejido de granulación, neovascularización y reepitelización más o menos completa de la ulceración cutánea inducida.

5

En este caso, todos los animales muestran un grado de cicatrización media más o menos igual; sin embargo, en el grupo control y en el grupo tratado con fondaparinux, se observa que hay mucha variabilidad en los datos con los que se hace la media. En todo caso, los 5 animales del grupo tratado con bemiparina sódica obtuvieron un valor histológico de 9,0 con lo que se observa que el grado de cicatrización es sorprendentemente homogéneo.

10

Además, en el caso de los grupos tratado con bemiparina, se observa un proceso de costra mucho más acusado que en los animales tratados con fondaparinux. En este sentido cabe destacar que la formación de costra es fundamental en el proceso de cicatrización de la herida, ya que cumple con el objetivo de limitar la pérdida de agua transdérmica y de actuar como barrera frente a bacterias y patógenos externos, impidiendo la infección de la herida.

15

En este ejemplo, las ratas que han formado costra en días anteriores muestran en el análisis histopatológico de la cicatriz que el patrón de la dermis es más cercano a la normalidad, comparado con las heridas de los animales en donde no se ha formado o la costra es menor. A pesar de que, tras su caída, el área de cicatrización es mayor y por lo tanto la medida no es concluyente frente a los animales que no han formado costra. Por tanto, la formación de costra es un buen indicador del proceso natural de cicatrización, que en este caso particular sólo se observa macroscópicamente en el grupo tratado con bemiparina.

20

25

Estudio de la relación de la actividad inhibitoria del factor Xa del glicosamiglicano y su poder cicatrizante por vía oral en rata diabética

Al día siguiente y durante un total de 14 días, los animales se administraron con 10 mL/kg por vía oral.

30

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

Tratamiento	Dosis
-------------	-------

- 41 -

Control diabético	-
Rata tratada con fondaparinux sódico	10 mg/kg
Rata tratada con bemiparina sódica	100 mg/kg

Al día siguiente de la realización de la herida y durante un total de 14 días, los animales se administraron con los tratamientos asignados.

- 5 Se realizó el seguimiento de los animales, valorándose macroscópicamente la evolución de las heridas 2 veces por semana mediante fotografía digital de la herida. Se registró también el peso corporal de los animales dos veces por semana.

Medida del área de la herida.

- 10 En la Figura 11 se muestra la evolución de las ratas control diabetizadas respecto a las ratas diabetizadas tratadas con bemiparina sódica y fondaparinux. En esta gráfica se muestra cómo las ratas tratadas con bemiparina cicatrizan mucho mejor que las tratadas con fondaparinux. En relación con las áreas de las úlceras, cuando comparamos todos los productos se observa cómo los glicosaminoglicanos que tienen mayor proporción de monosacáridos de la región regular tienen un
- 15 efecto beneficioso en la cicatrización de las heridas.

Evaluación histopatológica.

- El día 15 del estudio se sacrificaron los animales y la zona de la piel dónde se produjo la herida se
- 20 conservó en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina).

A cada corte se le dio una puntuación histológica en el rango grado I a grado V, donde I significa herida sin curar y V herida completamente epitelizada. La puntuación se basa en el grado de invasión celular, la formación tejido de granulación, vascularización y epitelización.

25

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.

- 42 -

III	7-9	<i>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.</i>
IV	10-12	<i>Tejido de granulación grueso y vascular dominado por fibroblastos y deposición extensiva de colágeno, el epitelio cubre la herida parcial o totalmente.</i>
V	13-15	<i>Área correspondiente a la herida totalmente epitelizado, sin presentar, más o menos, rastros de la herida.</i>

Las puntuaciones histopatológicas obtenidas para los distintos grupos se muestran en la siguiente tabla:

Tratamiento	Puntuación	Grado
Control diabético	10,0	III
Animal diabético tratado con fondaparinux sódico	9,5	III
Animal diabético tratado con bemiparina sódica	11,3	IV

5

Todas las muestras pertenecientes a los animales sacrificados a los 15 días del inicio del tratamiento presentaban actividad cicatrizante evolucionada, con clara presencia de tejido de granulación, neovascularización y reepitelización más o menos completa de la ulceración cutánea inducida.

10

Se observa un tejido de granulación más evolucionado, intensa neovascularización, con un mayor índice de cicatrización en el grupo tratado con bemiparina sódica, aparte de una mayor homogeneidad en los resultados obtenidos en todos los animales. Los animales hiperglucémicos tratados con bemiparina sódica han mostrado unos índices de cicatrización incluso superiores a los del grupo Control normoglucémico.

15

Estos resultados quedan apoyados por los hallazgos histológicos al obtenerse un mayor índice de cicatrización en los animales diabéticos tratados con bemiparina sódica.

20

ESTUDIO DE ÚLCERA DEL PIE DIABÉTICO EN RATÓN DIABÉTICO CON DIABETES INDUCIDA GENÉTICAMENTE POR VÍA SUBCUTANEA

Ejemplo 4:

Ulceración del ratón diabético C57BL/KS BKS.Cg-m +Lepr^{db} /+Lepr^{db}/J, medida del grado de cicatrización y evaluación histopatológica.

El ratón diabético C57BL/KsJ-db/db se ha empleado como modelo de diabetes tipo II que presenta una cicatrización alterada, a diferencia del ratón 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*). El ratón genéticamente diabético desarrolla resistencia a la insulina e hiperglucemia similares a las observadas en la diabetes del adulto. Las heridas de grosor total realizadas en el lomo de estos animales tardan más tiempo en formar el tejido granulación y en cerrarse que las mismas heridas producidas en animales no diabéticos.

El primer día del ensayo se anestesiaron los animales (Ketamina + Xilacina, 100 + 10 mg/kg, i.m.). Se rasuró el lomo del animal, 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.

El área de las heridas se calculó como el porcentaje de reducción de la misma para evaluar el grado de curación de las mismas, mediante la formula estandarizada:

$$\% \text{ curación} = \frac{(A_{\text{basal}} - A_{\text{tiempo}})}{(A_{\text{basal}})} \times 100$$

Se utilizó como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención o incisión. Al día siguiente y durante un total de 14 días, los animales se administraron con los tratamientos asignados.

Estudio de la relación de la actividad inhibitoria del factor Xa del glicosaminoglicano y su poder

cicatrizante por vía subcutánea.

Al día siguiente y durante un total de 14 días, los animales se administraron con 10 mL/kg por vía subcutánea en el lomo del animal, evitando la zona de la herida.

5

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

Tratamiento	Dosis
Control diabético	-
Animal diabético tratado con fondaparinux sódico	1 mg/kg
Animal diabético tratado con bemiparina sódica	1000 UI Xa/kg
Animal diabético tratado con heparina cálcica	600 UI Xa/Kg
Animal diabético tratado con BP06408-66/28-A	10 mg/Kg
Animal diabético tratado con RO-14	1000 UI Xa/Kg

- 10 Se realizó el seguimiento de los animales hasta un período de 21 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.

Medida del área de la herida.

- 15 En la Figura 4 se muestra la evolución de los ratones control diabéticos respecto a los ratones tratados con bemiparina sódica. El área de la herida se ha representado a la derecha de cada animal.

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

- 20 Los animales diabéticos no tratados son los que presentan una velocidad de curación más lenta, ya que no alcanzan al 90% de cicatrización en el día 21, seguidos por los animales tratados con fondaparinux que tampoco alcanzan la curación completa, que llegan al 96% en el día 21. Los animales tratados con bemiparina alcanzan la curación completa a tiempo 21 días y presentan valores de cicatrización del 98 % desde el día 18.

25

Estos resultados indican que no existe una relación entre la actividad anti-Xa (determinada por el presencia del pentasacárido responsable de la unión a la antitrombina III) de los glicosaminoglicanos empleados y su efecto beneficioso en la cicatrización, ya que la bemiparina sódica es el producto con

menor contenido de pentasacárido en su estructura (sólo un 1.5% del contenido de monosacáridos total corresponde al ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina característico del pentasacárido) y sin embargo presenta tiempos de cicatrización menores que fondaparinux (pentasacárido puro, ácido D- Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina representa el 20 % del contenido total de monosacáridos).

En relación con las áreas de las úlceras, cuando comparamos todos los productos se observa cómo los glicosaminoglicanos que tienen mayor proporción de monosacáridos de la región regular tienen un efecto beneficioso en la cicatrización de las heridas. Este hecho se observa en la figura 5, donde se aprecia que la heparina no fraccionada así como la bemiparina sódica favorecen la cicatrización, obteniendo un porcentaje por encima del 80% a partir del día 11 de administración.

Evaluación macroscópica.

En los datos extraídos se aprecian diferencias macroscópicas importantes entre los grupos Heparina cálcica no fraccionada, RO-14 y Bemiparina apreciándose un comportamiento distinto a partir del quinto día de observación. De este modo se puede ver cómo el grupo tratado con Bemiparina muestra una diferencia clara en la calidad de la cicatriz a partir del quinto día de tratamiento, observándose en la herida un lecho cubierto de tejido de granulación, hecho que no ocurre en el grupo control, y parcialmente en el grupo tratado con fondaparinux.

Este hecho diferencial marca la velocidad en el proceso y la calidad de la cicatrización (tal y como se observa en la Figura 5), 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.

Además, en el grupo control se observa que no se produce tejido de granulación (la base de la herida es clara y brillante), y en el grupo tratado con Fondaparinux solo se aprecia en los bordes de las heridas. Por lo que el cierre de las heridas de los ratones diabéticos control y los tratados con fondaparinux se produce por contracción de los bordes de las heridas, siendo este proceso más lento que el que se produce por la formación de tejido de granulación. Adicionalmente, la herida del grupo tratado con bemiparina se cierra el día 18, mientras que en el grupo control la herida permanece abierta con el consiguiente riesgo de infecciones y de complicaciones.

Evaluación histopatológica.

El día 21 del estudio se sacrificaron los animales y la zona de la piel donde se produjo la herida se conservó en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina).

A cada corte se le dio una puntuación histológica en el rango grado I a grado V, donde I significa herida sin curar y V herida completamente epitelizada. La puntuación se basa en el grado de invasión celular, la formación tejido de granulación, vascularización y epitelización.

5

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 7.

Tabla 7

Tratamiento	Puntuación	Grado
Control diabético	6.7	III
Animal diabético tratado con fondaparinux sódico	7,2	III
Animal diabético tratado con bemiparina sódica	11.5	IV
Animal diabético tratado con heparina Ca	8,0	III
Animal diabético tratado con BP06408-66/28-A	9.0	III

10

El estudio morfológico de las secciones correspondientes a las muestras cutáneas puso de manifiesto la evolución normal de los procesos de reparación cicatricial en todos los grupos. En los grupos tratados, el tejido de granulación está plenamente constituido obteniendo la mejor puntuación la bemiparina sódica, ya que, en este caso, se llega a observar un estructura celular completamente nueva por restitución ab integrum (ver Figura 6 panel C) en la que se observan los siguientes resultados:

15

A Reepitelización completa. Escaso infiltrado inflamatorio en dermis. Moderada presencia de fibroblastos en dermis. Neovascularización moderada, en dermis.

B Reepitelización completa. Moderado infiltrado inflamatorio, polimorfonucleares neutrófilos en dermis.

5 Moderada presencia de fibroblastos en dermis. Neovascularización moderada en dermis.

C Estructura celular completamente regenerada.

De los resultados obtenidos por determinación del área de la herida y evaluación histopatológica podemos concluir que el mejor de los productos ensayados es bemiparina porque es el que tiene un
 10 tiempo de cicatrización menor y una calidad del tejido mayor. Otro producto que parece funcionar bastante bien es el producto experimental BP06408-66/28-A. Por lo tanto, se demuestra nuevamente que una mayor actividad inhibitoria del factor Xa no se correlaciona con un mejor efecto en la cicatrización.

15 Estudio de la relación de la actividad inhibitoria del factor Xa del glicosaminoglicano y su poder cicatrizante por vía tópica.

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.

20

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.

25

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

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

30

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 7 muestra los valores globales de la evolución del porcentaje de reducción de la herida de los grupos de tratamiento frente al grupo control. Tal y como se observa en la gráfica, la mejor de las heridas se observó con la bemiparina, obteniéndose un valor de reducción del área superior al 60% al finalizar el tratamiento.

Evaluación macroscópica

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 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.

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 procesamiento histológico (tinción de hematoxilina-eosina).

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:

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

Tratamiento	Puntuación	Grado
Control diabético	6.7	III

- 49 -

Animal diabético tratado con Bemiparina	8.7	III
Animal diabético tratado con Fondaparinux	8.6	III
Animal diabético tratado con HNF	9.4	IV

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 evolucionada, con un tejido de granulación más evolucionado, mayor presencia de fibroblastos y neovascularización dérmica.

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 5:

Ulceración del ratón C57BL/KS.Cg-m Lepr^{db} +/+ m, medida del grado de cicatrización y evaluación histopatológica. Estudio del efecto cicatrizante de una HNF y una HBPM en animales no diabéticos. Determinación de la potencial aplicación de las heparinas en el tratamiento de úlceras crónicas en pacientes no diabéticos, por vía oral, subcutánea y tópica.

El ratón C57BL/KS.Cg-m Lepr^{db} +/+ m es el análogo no diabético del ratón empleado en el ejemplo anterior.

- 50 -

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

- 5 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.

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

El área de las heridas se calculó como el porcentaje de reducción de la misma para evaluar el grado de curación de las mismas, mediante la formula estandarizada:

15
$$\% \text{ curación} = \frac{(A_{\text{basal}} - A_{\text{tiempo}})}{(A_{\text{basal}})} \times 100$$

Se utilizó como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención o incisión. Al día siguiente y durante un total de 14 días, los animales se administraron con los tratamientos asignados.

20

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

25 Al día siguiente y durante un total de 14 días, los animales se administraron con 10 mL/kg por vía subcutánea en el lomo del animal, evitando la zona de la herida.

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

Tratamiento	Dosis
Control no diabético	-
Animal no diabético tratado con bemiparina Na	1000 UI Xa/kg
Animal no diabético tratado con heparina Ca	600 UI Xa/kg

Animal no diabético tratado con BP06408-66/28-A

10 mg/Kg

Se realizó el seguimiento de los animales hasta un período de 21 días. La valoración se realizó mediante fotografía digital de la herida y análisis posterior de la imagen.

- 5 En la Figura 8 se muestra la evolución de los ratones control no diabéticos respecto a los ratones tratados con heparina cálcica. El área de la herida se ha representado a la derecha de cada animal.

En la Figura 9 se muestra la evolución del tanto por ciento de cicatrización de la herida con el tiempo.

- 10 Los animales no diabéticos sin tratar alcanzan valores de reducción de la herida superiores al 90 % a partir del día 14. El tratamiento con bemiparina sódica no mejora la velocidad de cicatrización. Sin embargo, los animales tratados con heparina cálcica sí mejoran respecto al control, alcanzando el 90 % de cicatrización en el día 11.

15 Evaluación macroscópica.

Los tres grupos de animales tienen un proceso de cicatrización normal, estando las heridas curadas en el día 21. Sin embargo, parece que el grupo de ratones tratados con heparina cálcica el proceso se ha acelerado ya que el día 11 la herida está seca y cerrada, y el día 21 cubierta de pelo.

20 Evaluación histopatológica.

El día 21 del estudio se sacrificaron los animales y la zona de la piel dónde se produjo la herida se conservó en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina).

- 25 A cada corte se le dio una puntuación histológica en el rango grado I a grado V, donde I significa herida sin curar y V herida completamente epitelizada. La puntuación se basa en el grado de invasión celular, la formación 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	<i>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.</i>
IV	10-12	<i>Tejido de granulación grueso y vascular dominado por fibroblastos y deposición extensiva de colágeno, el epitelio cubre la herida parcial o totalmente.</i>
V	13-15	<i>Área correspondiente a la herida totalmente epitelizado, sin presentar, más o menos, rastros de la herida.</i>

Las puntuaciones histopatológicas obtenidas para los distintos grupos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Tratamiento	Puntuación	Grado
Control no diabético	11.7	IV
Animal no diabético tratado con bemiparina Na	8	III
Animal no diabético tratado con heparina cálcica	15	V
Animal no diabético tratado con BP06408-66/28-A	12.8	V

5

El estudio morfológico de las secciones correspondientes a las muestras cutáneas puso de manifiesto la evolución normal de los procesos de reparación cicatricial en todos los grupos. En todos los grupos tratados el tejido de granulación está plenamente constituido, obteniendo la mejor puntuación en el tratamiento con heparina cálcica, ya que, en este caso, se llega a observar una estructura celular completamente nueva por restitución ab integrum. Por otro lado, para el caso de animales no diabéticos, la puntuación obtenida con la muestra del producto de investigación BP06408-66/28A que apenas tiene presencia del pentasacárido en su estructura es especialmente buena con una estructura celular completa y un grado de epitelización muy alto, lo que demuestra nuevamente que para el tratamiento de úlceras crónicas no es necesario una mayor actividad inhibitoria del factor Xa puesto que no se correlaciona con un mejor efecto en la cicatrización.

10

15

En la Figura 10 se muestran microfotografías de las secciones de las heridas tras la tinción con hematoxilina-eosina: A control no diabético. B animal no diabético tratado con bemiparina sódica, C animal no diabético tratado con heparina cálcica. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

20

A Reepitelización completa. No se observan alteraciones.

- 53 -

B Reepitelización completa. Leve infiltrado inflamatorio, polimorfonucleares neutrófilos en dermis. Presencia de células gigantes multinucleadas en dermis. Moderada presencia de fibroblastos en dermis. Neovascularización moderada, en dermis.

C Estructura celular completamente regenerada.

5

De los resultados obtenidos por determinación del área de la herida y evaluación histopatológica podemos concluir que el tratamiento con heparina cálcica tiene un efecto beneficioso en la cicatrización de los animales no diabéticos, tiempo de cicatrización menor y estructura celular completamente regenerada, seguido de los resultados obtenidos con el producto en fase de
10 investigación BP06408-66/28-A. Por tanto, los glicosaminoglicanos objeto de la presente invención pueden utilizarse para tratar otras úlceras crónicas distintas de las del pie diabético.

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
15 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

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%caracterizada porque la proporción de la unidad disacáridica Ácido D-Glucurónico enlazado a N-sulfo-3-sulfo-D-Glucosamina no es superior al 20%.
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.
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.
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.
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.
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.
8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque la proporción de ácido

- 55 -

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. 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.

10 11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 precedentes caracterizada porque comprende una heparina de muy bajo peso molecular.

12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 precedentes caracterizada porque comprende una heparina no fraccionada.

15 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.

20 14. Uso según la reivindicación 13, en el que la úlcera crónica es una úlcera de pie diabético.

15. Uso según la reivindicación 13, en el que la úlcera crónica es una úlcera de presión.

25 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.

30 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.

35 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.

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.
- 5
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.
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.
- 10
22. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-19 anteriores en el que la heparina de bajo peso molecular se administra por vía oral.
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.
- 15

1/12

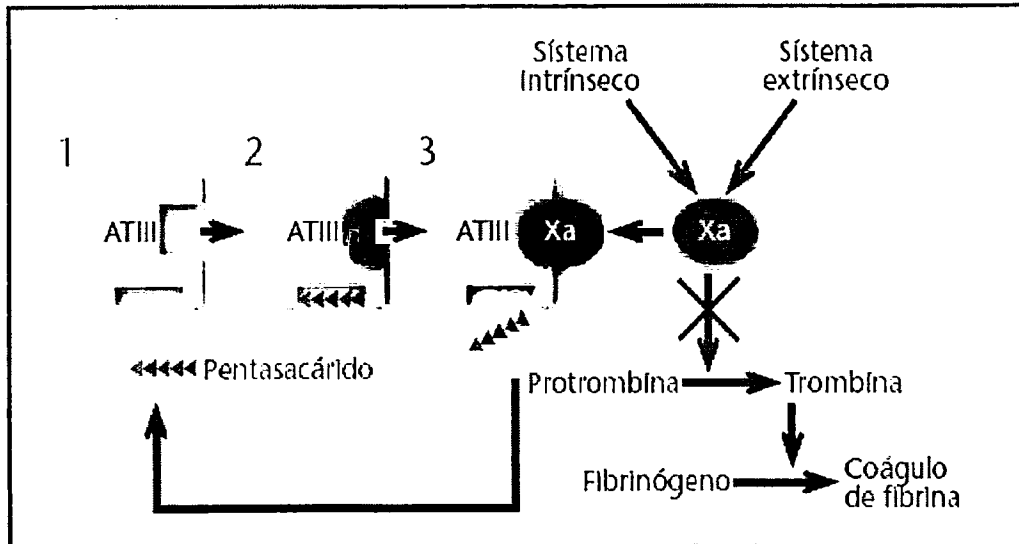


FIGURA 1

2/12

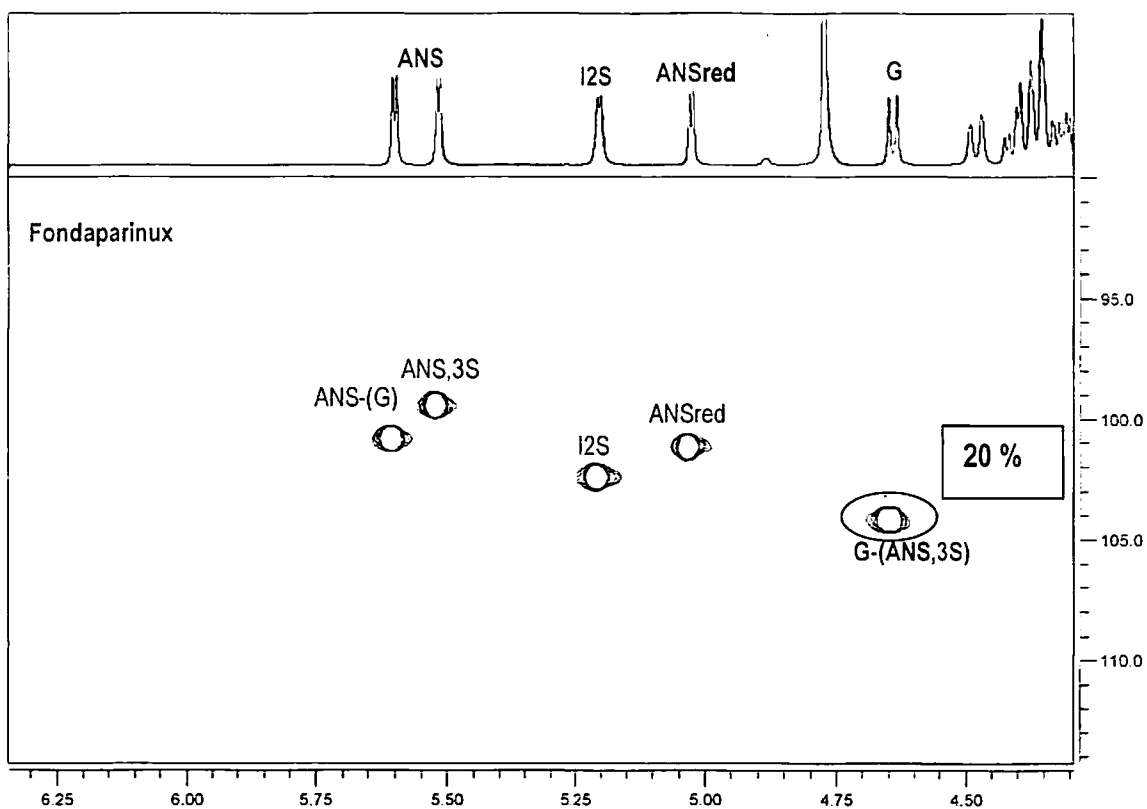


FIGURA 2A

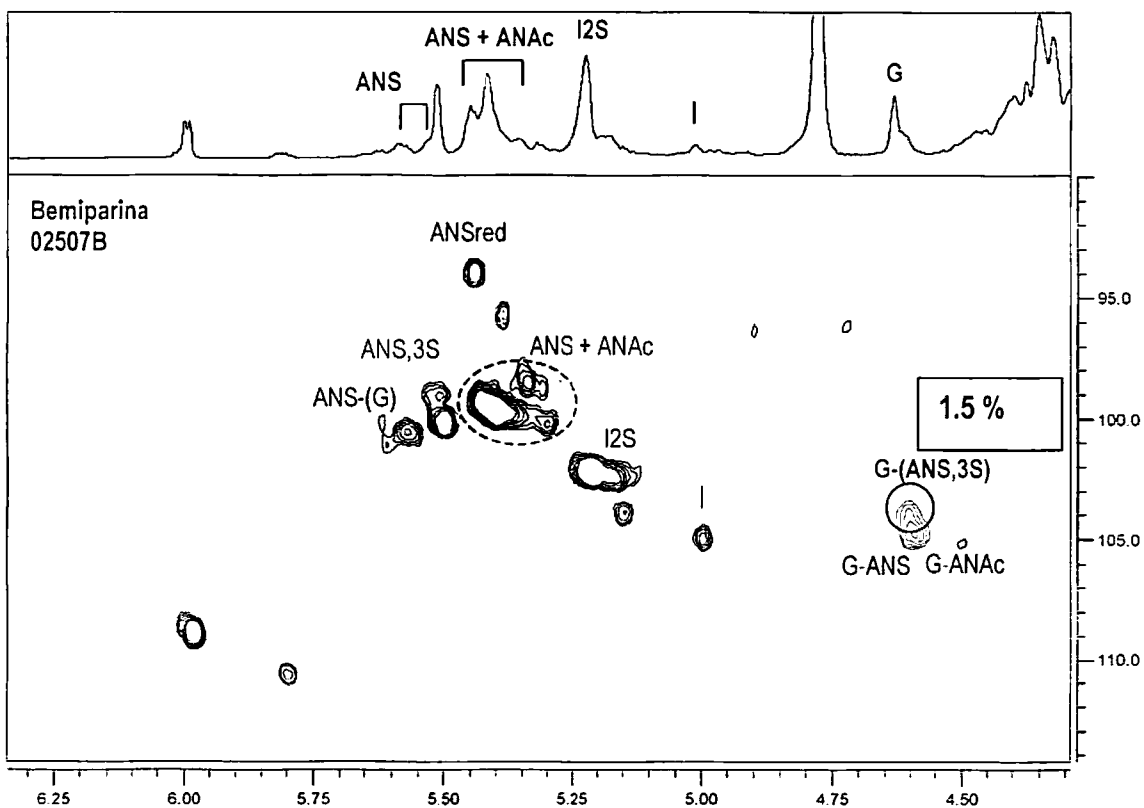


FIGURA 2B

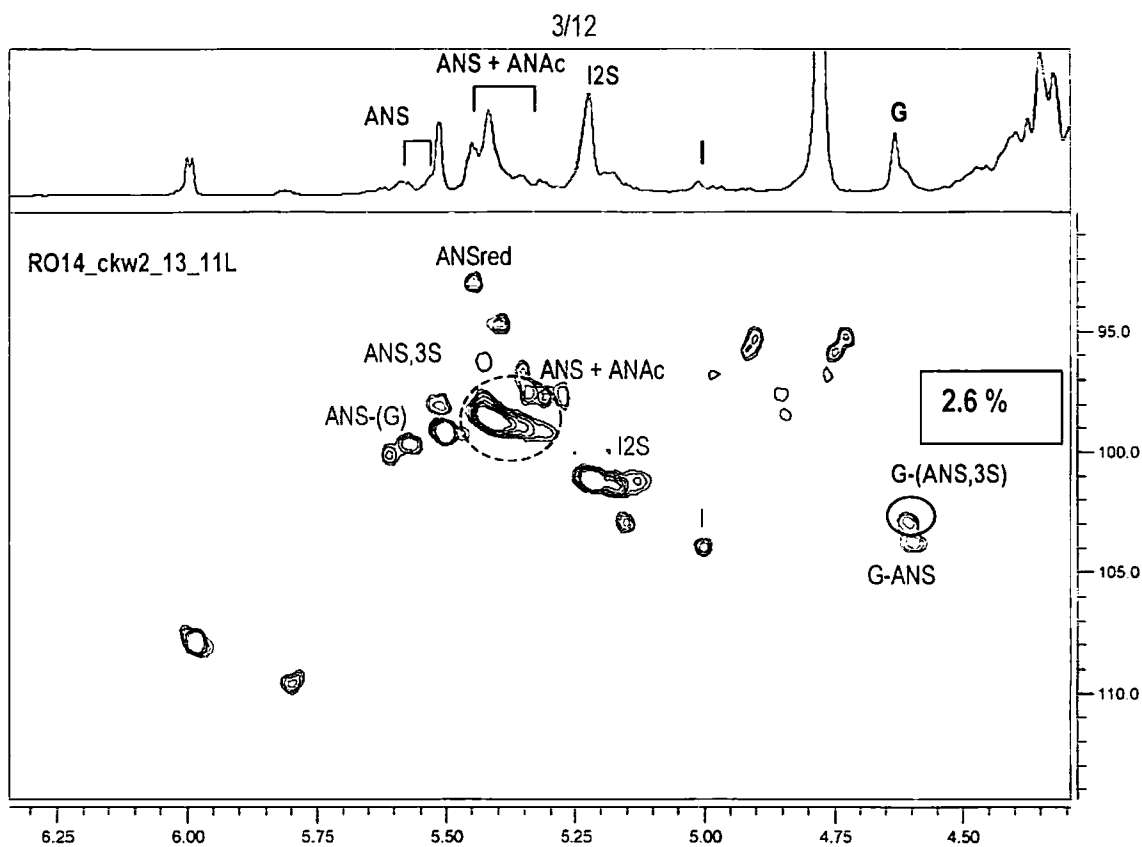


FIGURA 2C

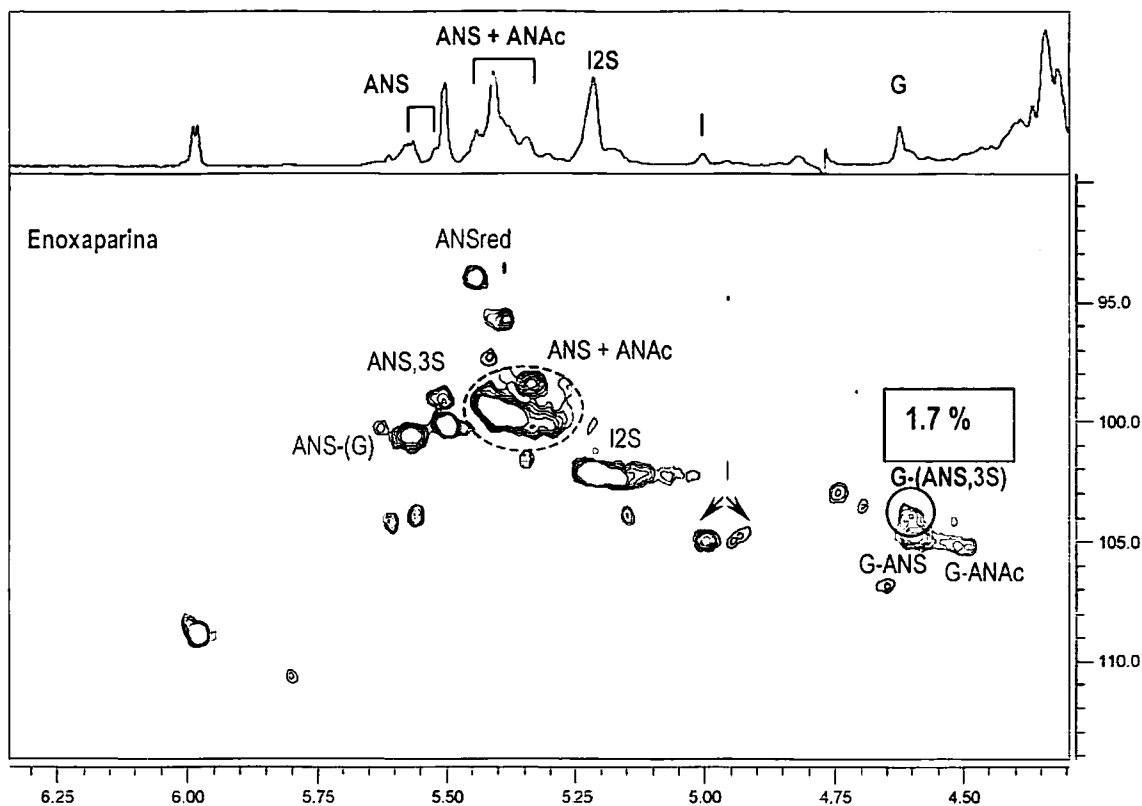


FIGURA 2D

4/12

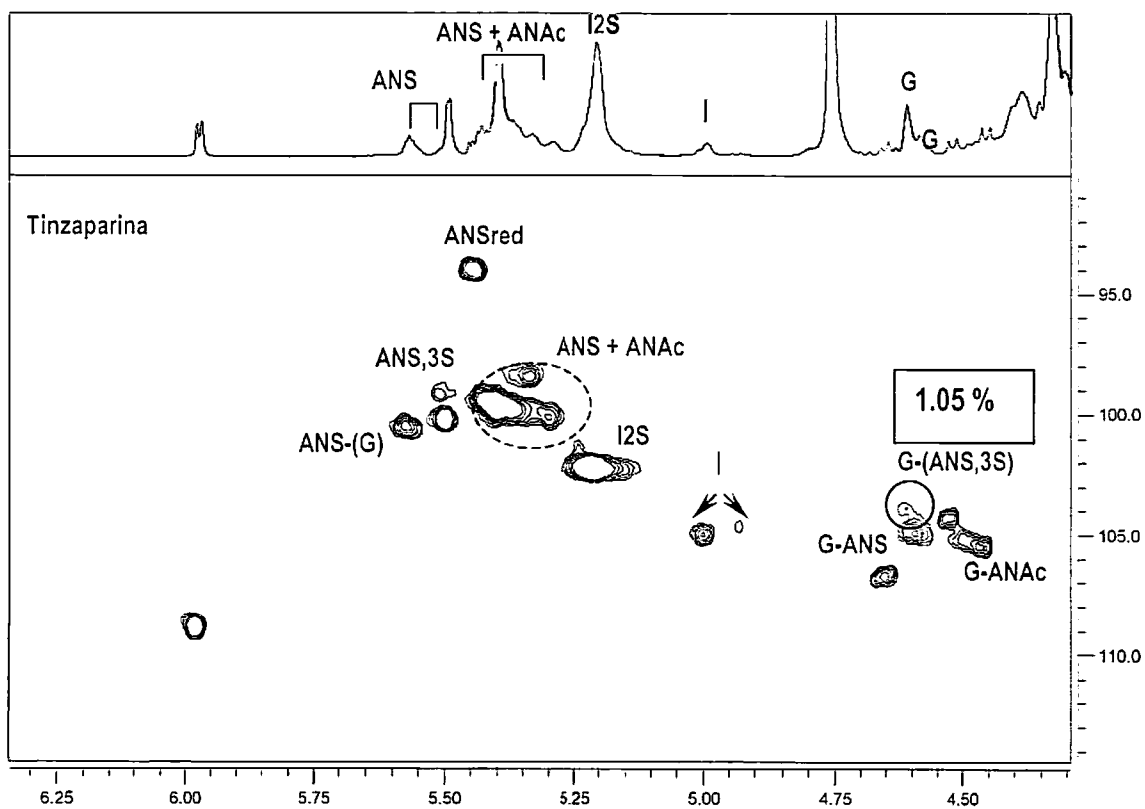


FIGURA 2E

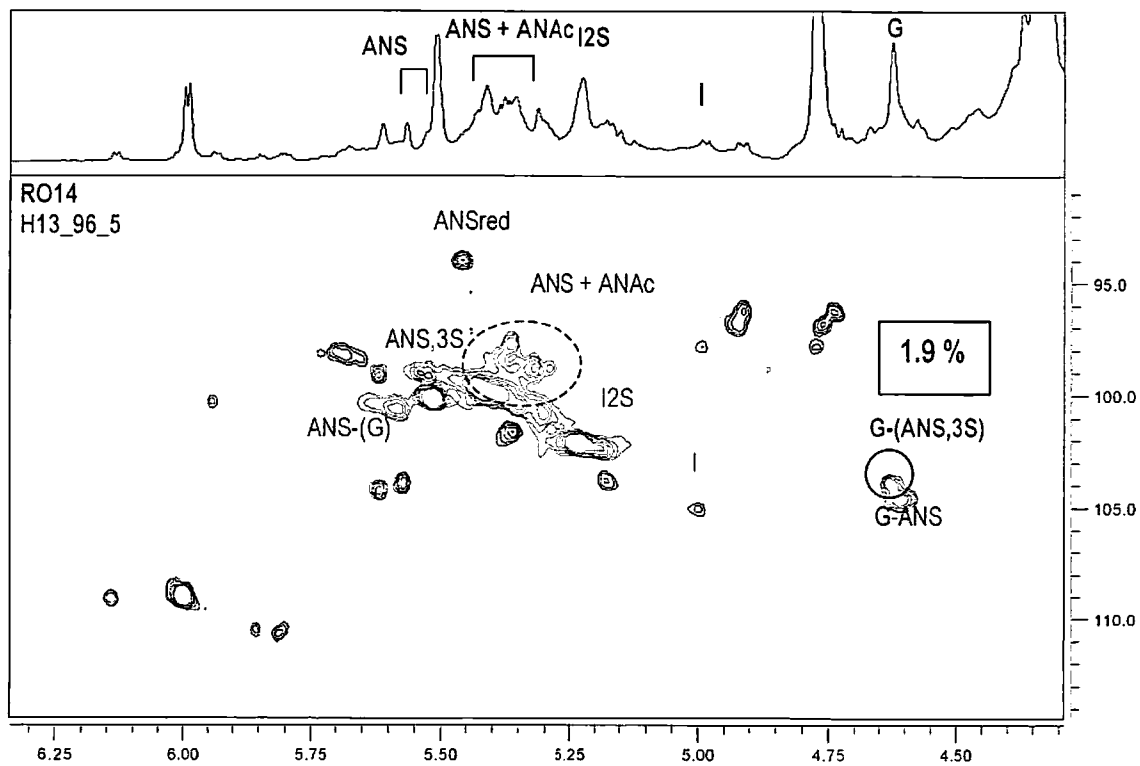


FIGURA 2F

5/12

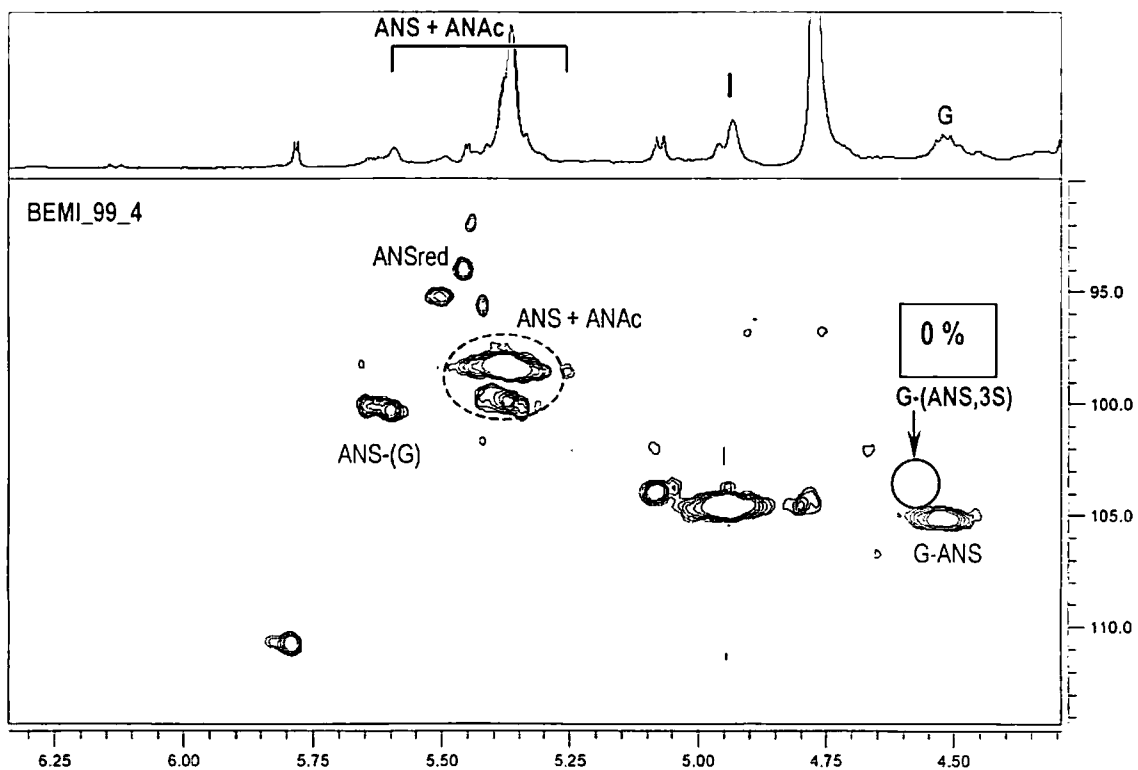


FIGURA 2G

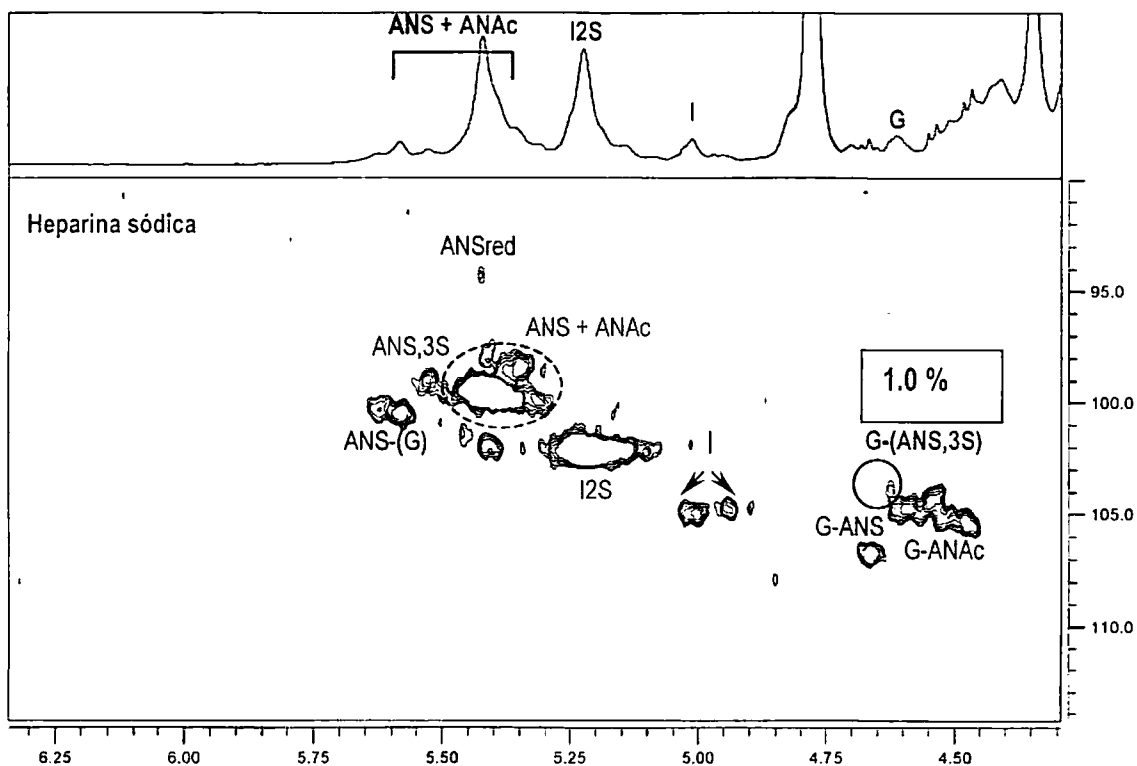


FIGURA 2H

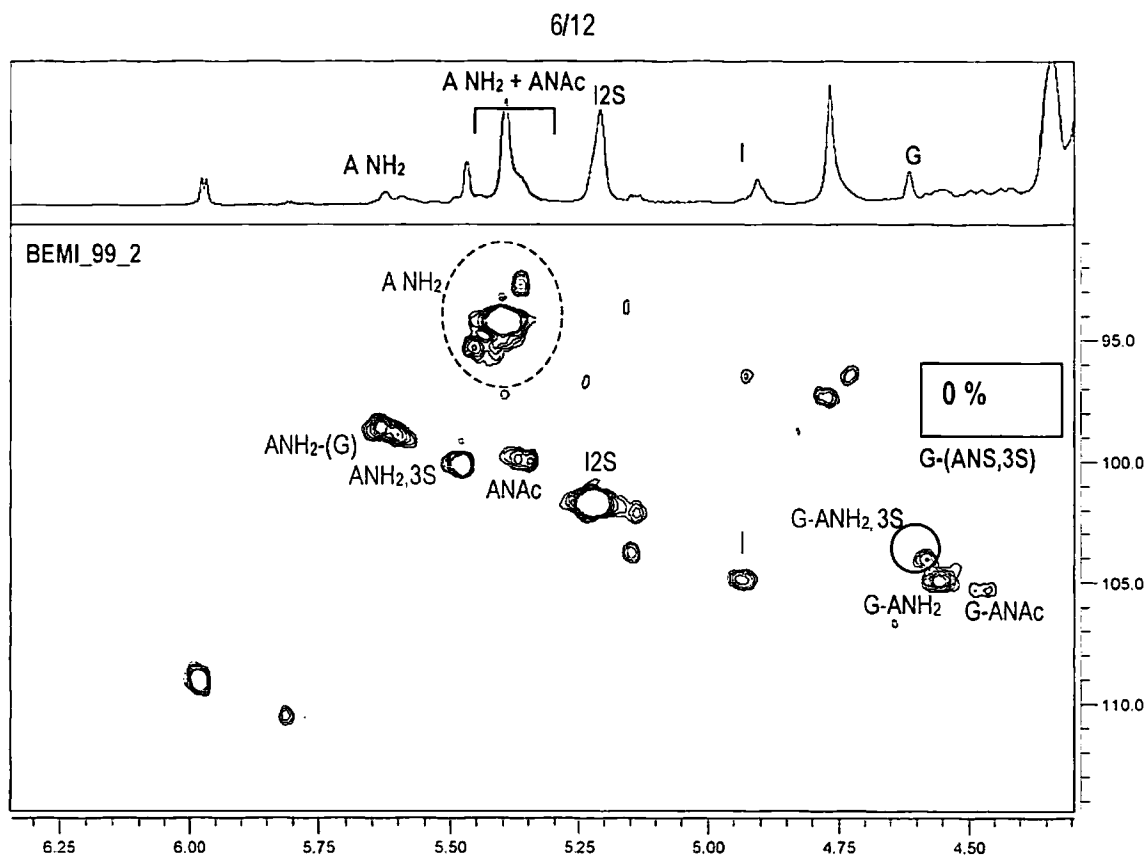


FIGURA 2I

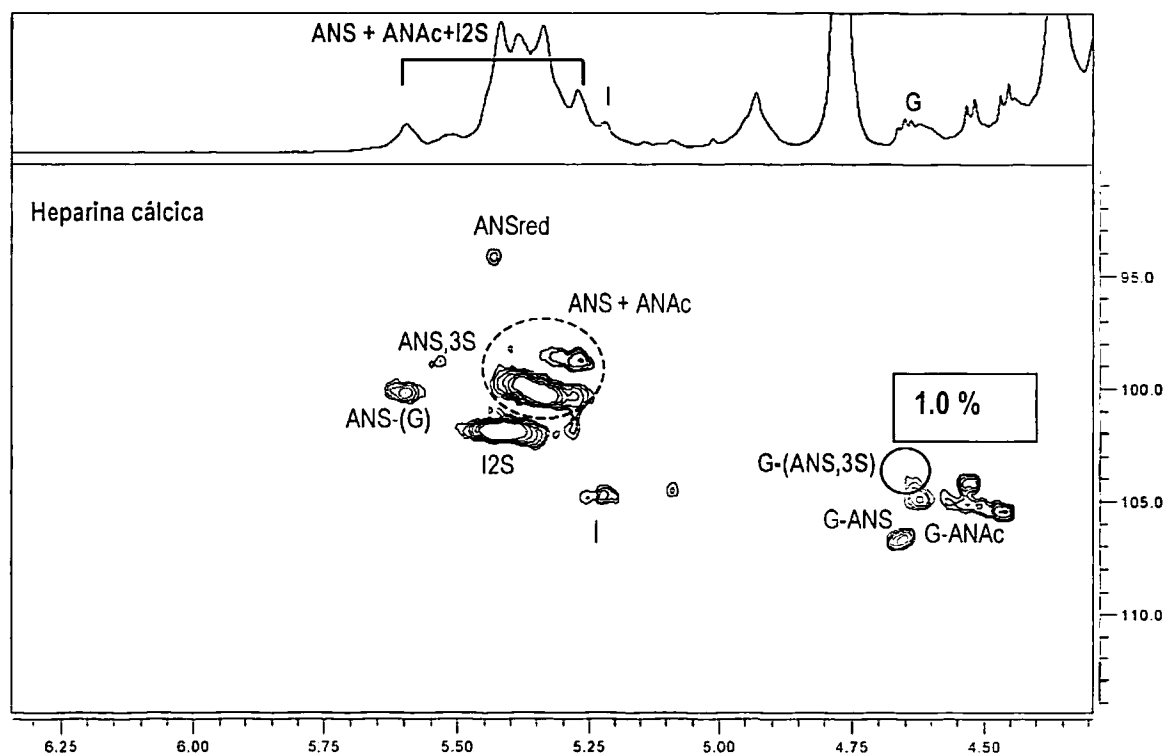


FIGURA 2J

7/12

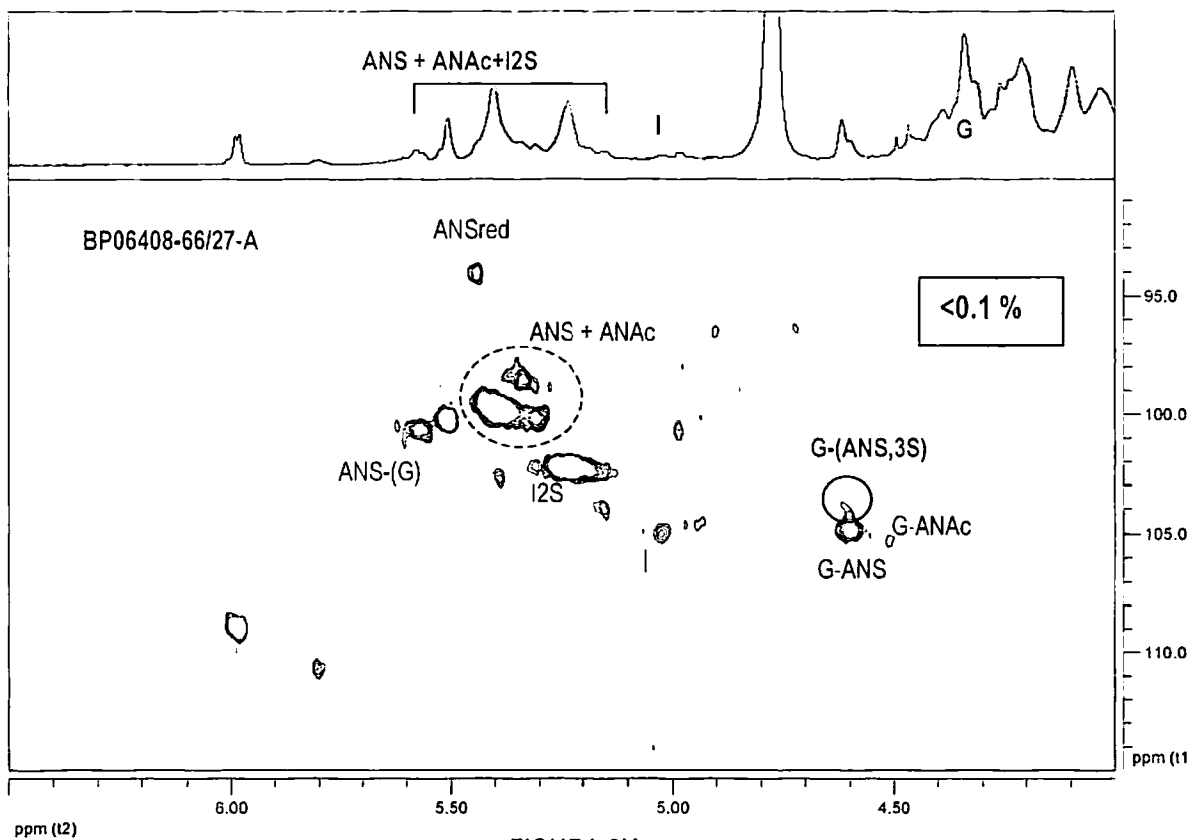


FIGURA 2K

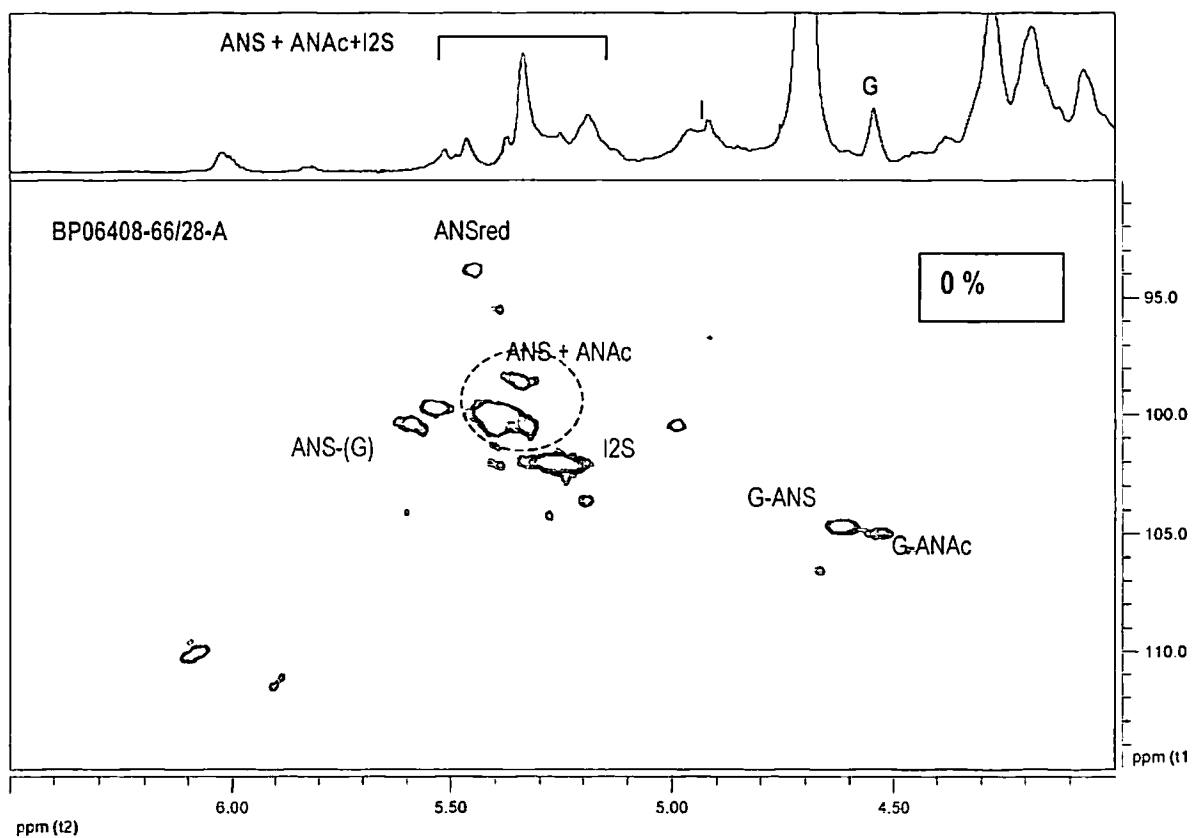
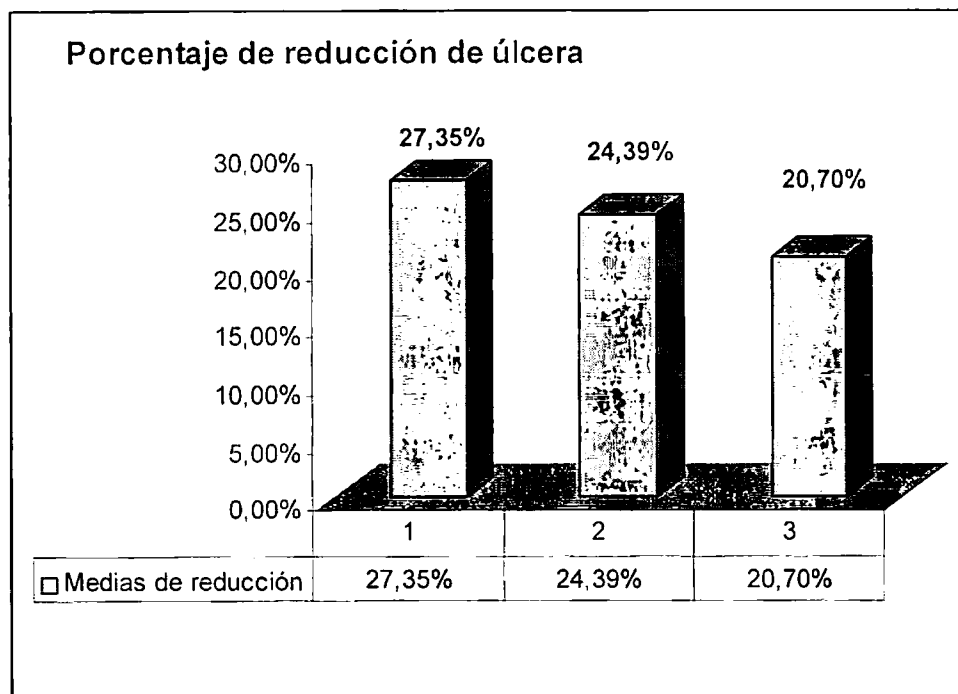


FIGURA 2L

8/12

FIGURA 3

9/12

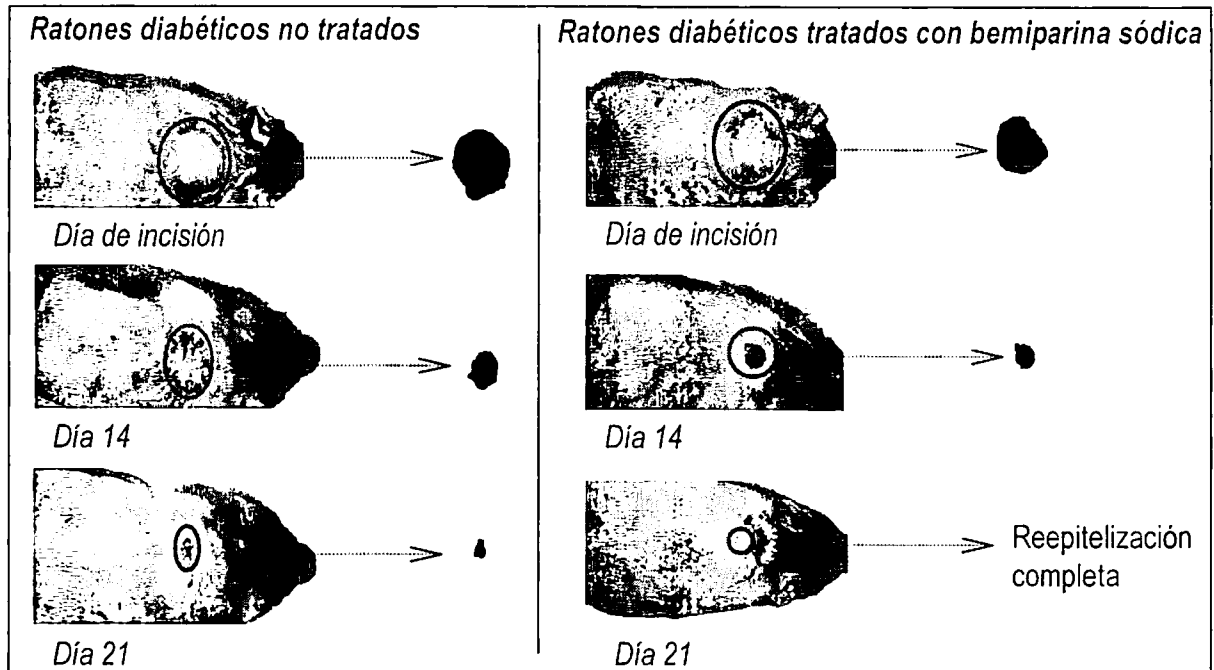


FIGURA 4

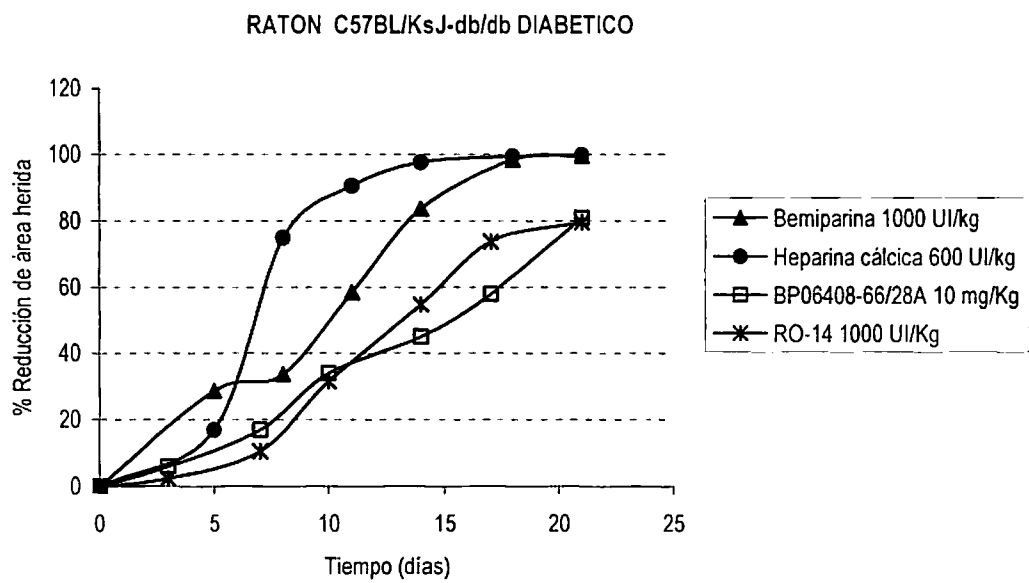


FIGURA 5

10/12

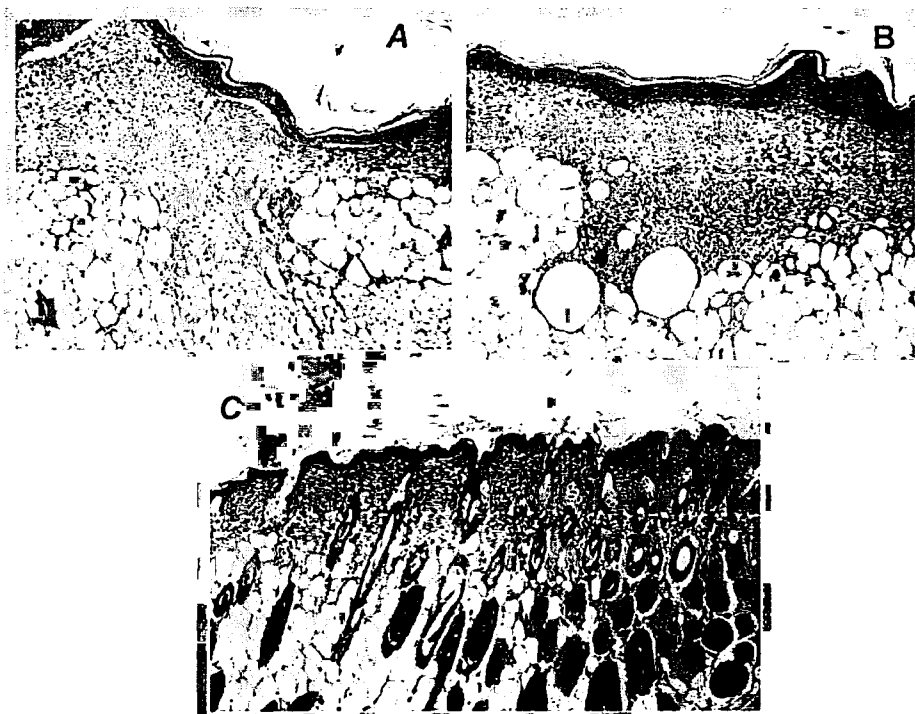


FIGURA 6

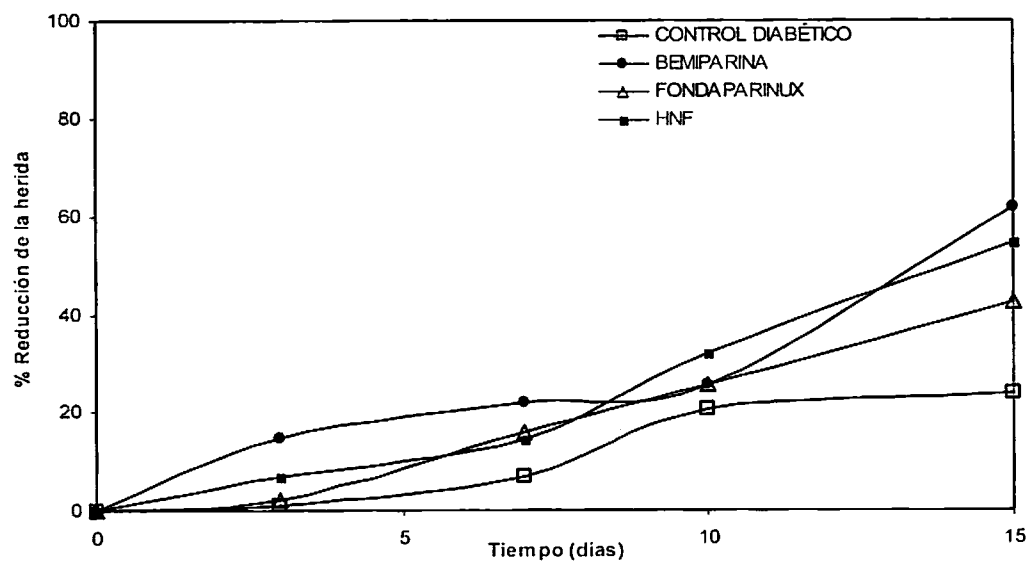


FIGURA 7

11/12

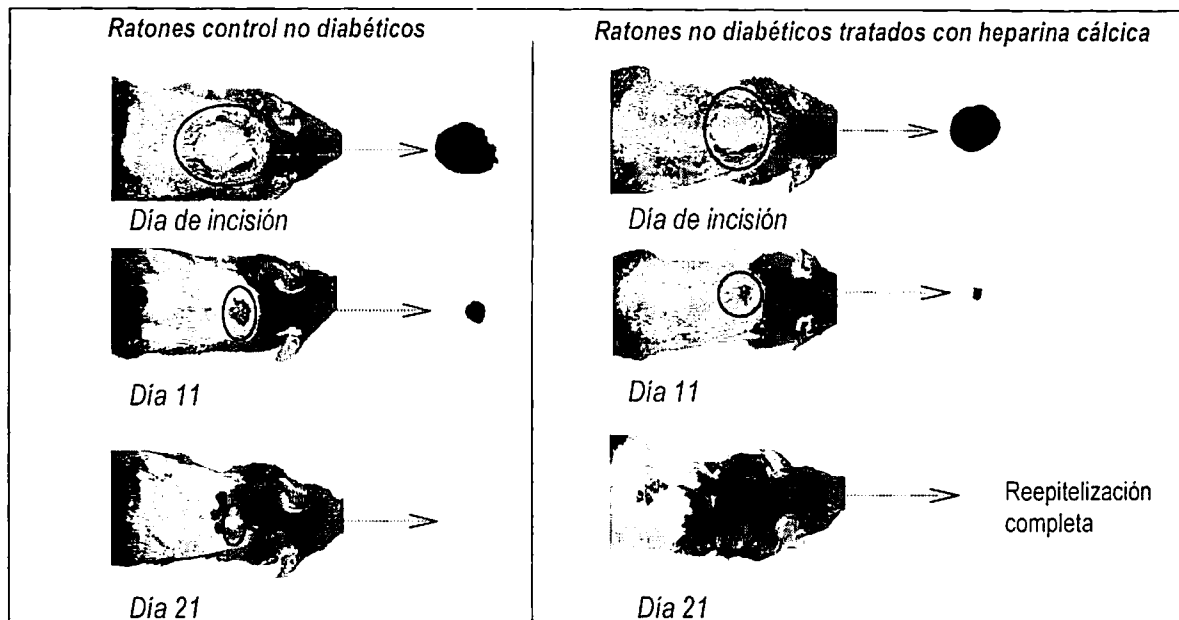


FIGURA 8

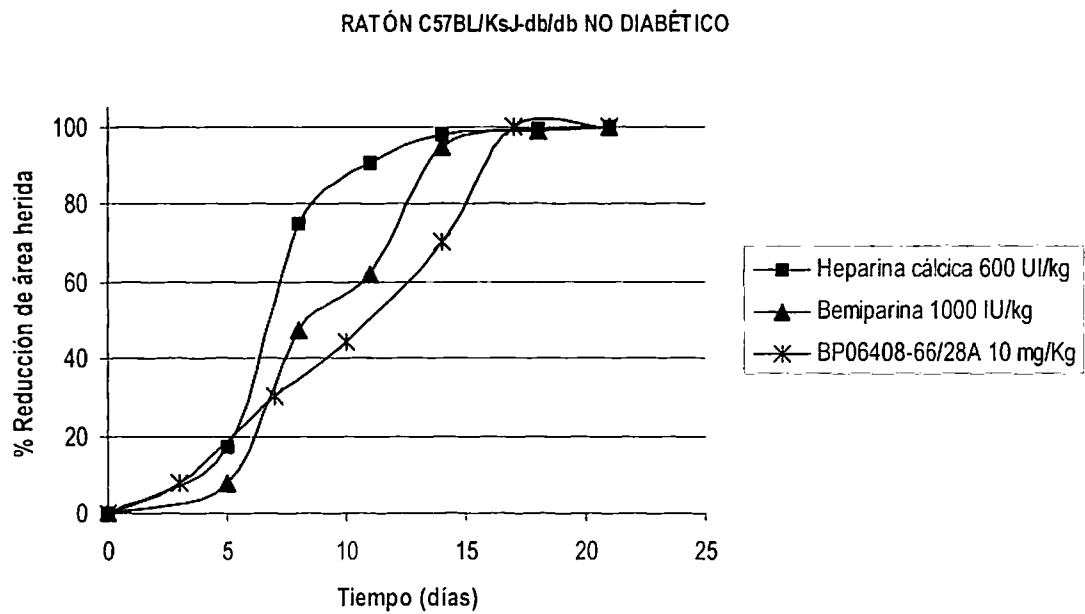


FIGURA 9

12/12

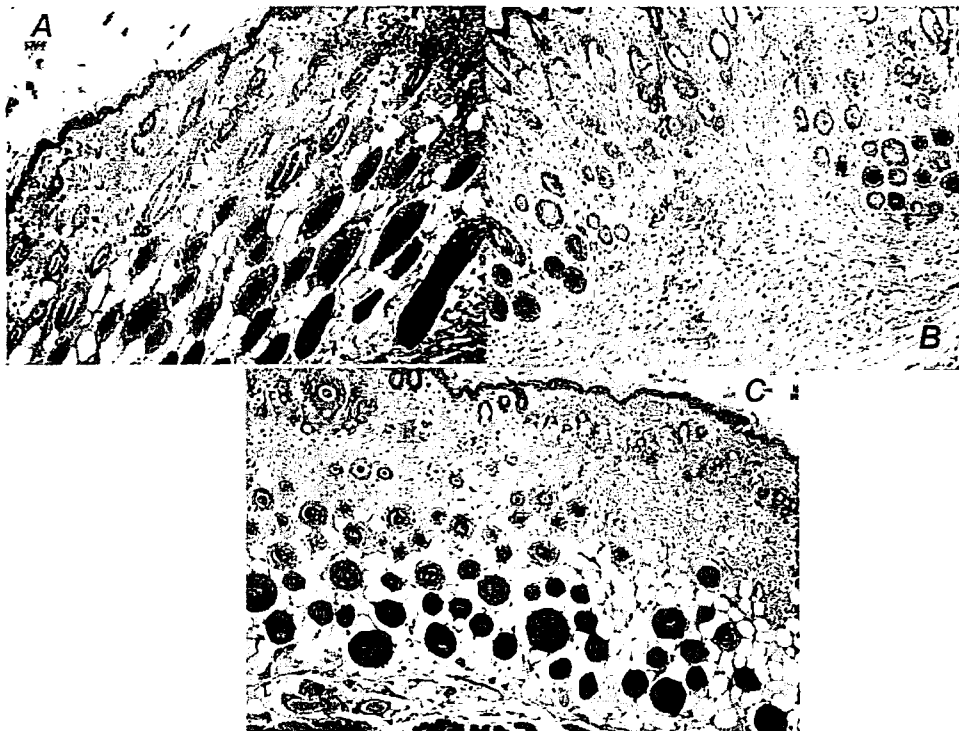


FIGURA 10

RATA WISTAR DIABETIZADA

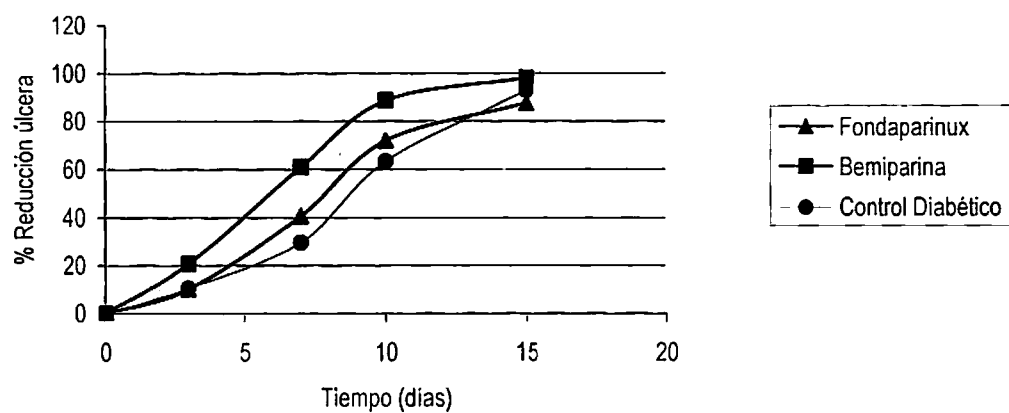


FIGURA 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2009/070264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/727 A61K31/726 A61K9/08

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

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KALANI M. ET AL.: "Effect of dalteparin on healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease" DIABETES CARE, vol. 26, no. 9, September 2003 (2003-09), pages 2575-2580, XP002556862 the whole document	1-23
X	KALANI M. ET AL.: "Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 120, 2007, pages 653-661, XP002556863 the whole document	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "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)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "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
- "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
- "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 such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 2009

Date of mailing of the international search report

10/12/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Giménez Miralles, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2009/070264

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JIVEGARD L ET AL: "Effects of Three Months of Low Molecular Weight Heparin (dalteparin) Treatment After Bypass Surgery for Lower Limb Ischemia-A Randomised Placebo-controlled Double Blind Multicentre Trial" EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY, SAUNDERS, LONDON, GB, vol. 29, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 190-198, XP004707848 ISSN: 1078-5884 the whole document	1-23
X	ROZIN A.P. ET AL.: "Recalcitrant leg ulcer due to mixed connective tissue disease" THE NETHERLANDS JOURNAL OF MEDICINE, vol. 64, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 91-94, XP009126220 the whole document	1-23
X	RULLAN M. ET AL.: "Ensayo clínico, controlado con placebo, triple ciego, para evaluar la eficacia de una heparina de bajo peso molecular (bemiparina) en el tratamiento de las úlceras tórpidas del pie diabético, en atención primaria" ATEN PRIMARIA, vol. 31, no. 8, 2003, pages 539-544, XP002556864 the whole document	1-23
X	US 2006/040896 A1 (KENNEDY THOMAS P [US]) 23 February 2006 (2006-02-23) paragraphs [0069], [0070]	1-23
A	EP 0 513 513 A (ALFA WASSERMANN SPA [IT]) 19 November 1992 (1992-11-19) page 3, line 49 - page 4, line 11	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2009/070264

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006040896 A1	23-02-2006	WO 2006023397 A2	02-03-2006
EP 0513513 A	19-11-1992	CA 2066785 A1	18-11-1992
		DE 69212620 D1	12-09-1996
		DE 69212620 T2	28-11-1996
		IT 1245907 B	25-10-1994
		US 5236910 A	17-08-1993

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2009/070264

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A61K31/727 A61K31/726 A61K9/08

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A61K

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) **EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	KALANI M. ET AL.: "Effect of dalteparin on healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease" DIABETES CARE, vol. 26, no. 9, September 2003 (2003-09), p. 2575-2580, XP002556862 todo el documento	1-23
X	KALANI M. ET AL.: "Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers" THROMBOSIS RESEARCH, vol. 120, 2007, P. 653-661, XP002556863 todo el documento	1-23
	----- -/--	

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"I"	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.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"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).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"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" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

23 de Noviembre de 2009

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

10 de Diciembre de 2009

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Nº de fax

Funcionario autorizado

Giménez Miralles, J

Nº de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2009/070264

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	JIVEGARD L ET AL: "Effects of Three Months of Low Molecular Weight Heparin (dalteparin) Treatment After Bypass Surgery for Lower Limb Ischemia-A Randomised Placebo-controlled Double Blind Multicentre Trial" EUROPEAN JOURNAL OF VASCULAR AND ENDOVASCULAR SURGERY, SAUNDERS, LONDON, GB, vol. 29, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), p. 190-198, XP004707848 ISSN: 1078-5884 todo el documento	1-23
X	ROZIN A.P. ET AL.: "Recalcitrant leg ulcer due to mixed connective tissue disease" THE NETHERLANDS JOURNAL OF MEDICINE, vol. 64, no. 3, March 2006 (2006-03), p. 91-94, XP009126220 todo el documento	1-23
X	RULLAN M. ET AL.: "Ensayo clínico, controlado con placebo, triple ciego, para evaluar la eficacia de una heparina de bajo peso molecular (bemiparina) en el tratamiento de las úlceras tórpidas del pie diabético, en atención primaria" ATEN PRIMARIA, vol. 31, no. 8, 2003, p. 539-544, XP002556864 todo el documento	1-23
X	US 2006/040896 A1 (KENNEDY THOMAS P [US]) 23 February 2006 (2006-02-23) párrafo [0069], [0070]	1-23
A	EP 0 513 513 A (ALFA WASSERMANN SPA [IT]) 19 November 1992 (1992-11-19) p. 3, línea 49 - p. 4, línea 11	1-23

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2009/070264

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 2006040896 A1	23-02-2006	WO 2006023397 A2	02-03-2006
EP 0513513 A	19-11-1992	CA 2066785 A1	18-11-1992
		DE 69212620 D1	12-09-1996
		DE 69212620 T2	28-11-1996
		IT 1245907 B	25-10-1994
		US 5236910 A	17-08-1993