



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 645**

51 Int. Cl.:
A61K 38/40 (2006.01)
C07K 14/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03752398 .2**
96 Fecha de presentación : **16.09.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1545587**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Composiciones de lactoferrina y métodos de tratamiento de la úlcera diabética.**

30 Prioridad: **16.09.2002 US 410981 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.05.2011

73 Titular/es: **AGENNIX INCORPORATED**
8 Greenway Plaza, Suite 910
Houston, Texas 77046, US

72 Inventor/es: **Engelmayer, Jose y**
Varadhachary, Atul

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 645 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de lactoferrina y métodos de tratamiento de la úlcera diabética

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos No. 60/410.981 presentada el 16 de septiembre de 2002.

Campo técnico

La presente invención se refiere a composiciones de lactoferrina para uso en un método de tratamiento de una úlcera diabética. Las composiciones se pueden administrar solas o en combinación con otras terapias convencionales de cicatrización de las heridas. Todavía más, las composiciones pueden comprender también un quelante de metales.

Antecedentes de la invención

Se han desarrollado relativamente pocos productos de biotecnología para el tratamiento de heridas, tales como las quemaduras de espesor parcial. La mayor parte de los esfuerzos se han dirigido hacia las heridas crónicas, que requieren un nivel apropiado de factores de crecimiento celular para la cicatrización. La opción más convencional de tratamiento de las úlceras crónicas incluye un fuerte desbridamiento para separar todos los tejidos no viables, un régimen sin carga, apósitos humedecidos con solución salina cambiados dos veces al día en cuyo momento se limpia la piel de alrededor de la úlcera con jabón suave y agua. El tratamiento avanzado actual para las úlceras crónicas incluye factores de crecimiento, terapia de reemplazamiento de la piel, desbridamiento enzimático y mecánico para limpiar el tejido isquémico, apósitos de heridas humedecidos, limpiadores no antibióticos, antibióticos (Edmonds *et al.*, 2000, Lipsky and Berendt 2000, Moulin *et al.*, 1998, Mandracchia *et al.*, 2001). Sin embargo, la terapia actual para las heridas crónicas no es completamente eficaz. De hecho, el Regranex™ gel o becaplermina (factor BB de crecimiento humano recombinante derivado de las plaquetas), el único producto biológico que se encuentra en el mercado para heridas crónicas (úlceras neuropáticas diabéticas), ha presentado solamente un 9-23 % de mejora sobre el placebo y un 4-22 % de mejora sobre un buen cuidado de la úlcera sólo (Mandracchia *et al.*, 2001, Edmonds *et al.*, 2000, Wieman 1998). Por lo tanto, se necesita un tratamiento eficaz para las heridas, crónicas y/o agudas.

La lactoferrina es una proteína humana inmunomoduladora expresada en todo el cuerpo y que se encuentra en las más altas concentraciones en la leche y los calostros. La lactoferrina humana recombinante (rhLF) es una glucoproteína recombinante producida en *Aspergillus niger* (*A. niger*), un hongo filamentoso. La rhLF es estructuralmente idéntica en todos los aspectos materiales a la lactoferrina nativa y tiene una amplia selección de funciones relacionadas con los mecanismos de defensa del hospedante. Por ejemplo, se ha descrito que la lactoferrina activa los linfocitos agresores naturales (NK), induce la actividad estimuladora de colonias, activa los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), regula la granulopoyesis, aumenta la citotoxicidad de las células dependiente de anticuerpos, estimula la actividad de los linfocitos agresores activados por linfocinas (LAK), y potencia la toxicidad de los macrófagos. Nakajima Mitsunari *et al.* (Journal of Cellular Physiology 170: 101-105, 1997) describe que la lactoferrina es un supresor de la migración celular de las líneas de células gastrointestinales.

La lactoferrina humana recombinante ha sido descrita previamente como purificada después de la expresión en una variedad de organismos procariontas y eucariotas incluyendo *aspergillus* (Patente de Estados Unidos No. 6.080.559), ganado (Patente de Estados Unidos No. 5.919.913), arroz, maíz, *Sacharomcyes* (Patente de Estados Unidos No. 6.228.614) y *Pichia pastoris* (Patentes de Estados Unidos Nos. 6.455.687, 6.277.817, 6.066.469). También se han descrito sistemas de expresión para la expresión de lactoferrinas humanas de longitud completa (por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.100.054). En todos los casos, parte de lo descrito es la expresión del cDNA de longitud completa y la purificación de la proteína intacta cuyo N-terminal, después del procesado del péptido líder, es el aminoácido glicina. Nuijens *et al.* (Patente de Estados Unidos No. 6.333.311) describe por separado variantes de lactoferrina humana pero su objetivo principal se limita a la delección o sustitución de los residuos de arginina encontrados en el dominio N-terminal de la lactoferrina.

El EDTA (ácido etilendiaminetetraacético) es un compuesto sintético que tiene características bien conocidas de unión a metales. El EDTA es el compuesto más comúnmente usado para la terapia de quelación, un tratamiento que incluye la administración intravenosa repetida de EDTA para sacar toxinas del torrente sanguíneo. La administración de EDTA es el tratamiento aceptado médicamente para el envenenamiento por metales pesados tales como plomo, mercurio, arsénico y talio y ha sido aprobado por la Food and Drug Administración (FDA) para este uso.

El EDTA ha sido propuesto también como tratamiento para la cardiopatía. Los que proponen la terapia de quelación para la cardiopatía reivindican que el EDTA, en combinación con vitaminas y minerales orales, ayuda a disolver las placas y depósitos minerales asociados con la aterosclerosis. Aunque muchos americanos con cardiopatía han pasado a la terapia de quelación por EDTA para mejorar su enfermedad, la FDA no ha aprobado esta terapia como

tratamiento alternativo para la cardiopatía. Se cree que la quelación por EDTA puede ayudar a fortalecer el sistema inmunitario al secuestrar impurezas del torrente sanguíneo.

Breve resumen de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición de lactoferrina para uso en un método de tratamiento de una úlcera diabética. El método de tratamiento incluye la administración de la composición de lactoferrina, que se puede aplicar tópicamente, oralmente o parenteralmente. La composición de lactoferrina se puede administrar también en combinación con terapias convencionales de cicatrización de las heridas. La invención proporciona además:

- el uso de la lactoferrina para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una úlcera diabética; y
- 10 - el uso de un antiácido para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una úlcera diabética en combinación con la lactoferrina administrada oralmente.

15 La composición de lactoferrina puede comprender una variante de lactoferrina de N-terminal. Más específicamente, la composición puede comprender una variante de lactoferrina recombinante. Tales variantes de lactoferrina de N-terminal incluyen variantes que carecen al menos del residuo de glicina N-terminal o que contienen una sustitución en el residuo de glicina N-terminal. La sustitución puede comprender sustituir el residuo de glicina N-terminal por un residuo de aminoácido natural o artificial. Por ejemplo, la sustitución puede comprender sustituir el residuo de glicina N-terminal por un residuo de aminoácido positivo o por un residuo de aminoácido negativo o sustituir el residuo de glicina N-terminal por un residuo de aminoácido neutro distinto de glicina. Otras variantes de lactoferrina de N-terminal incluyen lactoferrina que carece de uno o más residuos en el N-terminal o que tiene una o más sustituciones en el N-terminal.

20 En realizaciones específicas, la variante de lactoferrina de N-terminal constituye al menos el 1 % de la lactoferrina de la composición, al menos el 5 % de la composición de lactoferrina, al menos el 10 % de la composición de lactoferrina, al menos el 25 % de la composición de lactoferrina, al menos el 50 % de la composición de lactoferrina o cualquier intervalo intermedio.

25 La composición de lactoferrina de la presente invención está preferiblemente en forma de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de lactoferrina y un polímero farmacéuticamente aceptable que tiene una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 12.000.000 cP a temperatura ambiente, donde la cantidad de lactoferrina es suficiente para proporcionar una mejoría de la herida. La lactoferrina es lactoferrina de mamífero, tal como humana o bovina. Más específicamente, la lactoferrina es lactoferrina recombinante. Todavía más, la composición de lactoferrina comprende una variante de la misma en la que al menos la glicina N-terminal está truncada y/o sustituida. La variante de lactoferrina de N-terminal constituye al menos el 1 % de la composición de lactoferrina, al menos el 5 % de la composición de lactoferrina, al menos el 10 % de la composición de lactoferrina, al menos el 25 % de la composición de lactoferrina, al menos el 50 % de la composición de lactoferrina o cualquier intervalo intermedio.

35 En realizaciones específicas, el polímero se selecciona del grupo que consiste en polímero de vinilo (esto es, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, polivinil-pirrolidona y alcohol polivinílico), polímero de tipo polisacárido (esto es, celulosa, derivados de celulosa, glucosaminoglucanos, agar, pectina, ácido alginico, dextrano, almidón, y quitosán), polímero de tipo glucosaminoglucano (esto es, ácido hialurónico, condroitina, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, dermatan sulfato, keratan sulfato, heparina sulfato y heparina), polímero de tipo proteína (esto es, colágeno, gelatina y fibronectina), polímero de tipo polioxi-etileno-polioxi-propileno (esto es, copolímero de bloque de polioxi-etileno-polioxi-propileno) y polímero de acrilamida (esto es, poli-acrilamida o poli-metacrilamida). Preferiblemente, el copolímero de bloque de polioxi-etileno-polioxi-propileno es F88 o F127.

40 En otras realizaciones, la concentración de lactoferrina (lactoferrina o variante de lactoferrina de N-terminal en la que al menos el residuo de glicina N-terminal está truncado o sustituido) de la composición farmacéutica está dentro del intervalo de aproximadamente 0,0001 % (p/p) a aproximadamente 30 % (p/p). Más particularmente, la concentración de polímero es de aproximadamente 0,5 % (p/p) a aproximadamente 3,0 % (p/p) y el polímero tiene un peso molecular medio de aproximadamente 500 a aproximadamente 13.000.000.

45 En una realización preferida la composición de lactoferrina comprende una cantidad de lactoferrina humana recombinante (lactoferrina rhLF o una de sus variantes de lactoferrina de N-terminal de tal tipo que al menos el residuo de glicina N-terminal está truncado o sustituido) que es suficiente para proporcionar una mejoría de una herida, y un polímero, donde el polímero se selecciona del grupo que consiste en un polímero de vinilo, polímero de tipo polisacárido, polímero de tipo glucosaminoglucano, polímero de tipo proteína, polímero de tipo polioxi-etileno-polioxi-propileno, y polímero de acrilamida, donde la composición es un gel acuoso que tiene una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 12.000.000 cP a temperatura ambiente. La concentración de polímero es de aproximadamente 0,5 % (p/p) a aproximadamente 3,0 % (p/p) y el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 13.000.000.

- 5 En otra realización preferida la composición de lactoferrina comprende una cantidad de lactoferrina que es suficiente para proporcionar una mejoría de una herida y un polímero farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste en polímero de vinilo, polímero de tipo polisacárido, polímero de tipo glucosaminoglucano, polímero de tipo proteína, polímero de tipo polioxietileno-polioxipropileno, y polímero de acrilamida que tiene una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,5 % (p/p) a aproximadamente 3,0 % (p/p) y que tiene un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 13.000.000, donde la composición es un gel acuoso que tiene una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 12.000.000 cP a temperatura ambiente.
- 10 La composición de la invención es para uso en un método para tratar una úlcera diabética, que comprende preferiblemente la etapa de administrar a un sujeto una composición de lactoferrina en una cantidad suficiente para proporcionar una mejoría de la úlcera diabética. La composición de lactoferrina se dispersa típicamente en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la composición de lactoferrina se destina a la administración en combinación con otras terapias convencionales para cicatrización de las heridas. La composición de lactoferrina se puede administrar durante al menos una semana, seis semanas, 12 semanas, 36 semanas, etc. o cualquier intervalo intermedio.
- 15 En otras realizaciones, se puede administrar también con la composición de lactoferrina un quelante de metales dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los quelantes de metales preferidos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o ácido [etilenbis(oxietilenonitrilo)]tetraacético (EGTA). Más preferiblemente, el quelante de metales es el EDTA.
- 20 En otras realizaciones, la lactoferrina se destina a la administración tópica, oral o parenteral. Todavía más, un antiácido se puede destinar también a la administración conjunta con dicha composición de lactoferrina.
- 25 En realizaciones específicas, la cantidad de la composición de lactoferrina (lactoferrina o variante de lactoferrina de N-terminal de tal tipo que al menos el residuo de glicina N-terminal está truncado o sustituido) que se administra es de aproximadamente 0,0001 µg a aproximadamente 100 g al día. La cantidad del EDTA que se administra es de aproximadamente 1 ng a aproximadamente 1 g al día.
- 30 En otras realizaciones, la composición de lactoferrina es un gel tópico, una solución, cápsula o comprimido que tiene una concentración de lactoferrina de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 30 %. El gel tópico está compuesto de un polímero seleccionado del grupo que consiste en polímero de vinilo, polímero de tipo polisacárido, polímero de tipo glucosaminoglucano, polímero de tipo proteína, polímero de tipo polioxietileno-polioxipropileno, y polímero de acrilamida. La concentración de polímero es de aproximadamente 0,5 % (p/p) a aproximadamente 3,0 % (p/p) y el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 a aproximadamente 13.000.000.
- 35 Se describe aquí un método de tratamiento de una herida que comprende la etapa de enriquecer el sistema inmunitario local de un sujeto administrando tópicamente la cantidad de lactoferrina en la proximidad de la herida. La lactoferrina produce la destrucción de las bacterias que infectan la herida.
- 40 Se describe también un método para mejorar el sistema inmunitario local de un sujeto que sufre de una herida que comprende la etapa de administrar tópicamente al sujeto una composición de lactoferrina. La lactoferrina produce la destrucción de las bacterias que infectan la herida. La lactoferrina estimula la producción de una citocina o una quimiocina. Los ejemplos de citocinas que pueden ser estimuladas por la lactoferrina incluyen, pero sin limitarse a ellas, interleucina-18 (IL-18), interleucina-12 (IL-12), factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), e interferón gamma (IFN-γ). Los ejemplos de quimiocinas incluyen, pero sin limitarse a ellas, la proteína 3 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-3α), la proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1α), o la proteína beta inflamatoria de macrófagos (MIP-1β).
- 45 La composición de lactoferrina de la presente invención puede producir también la inhibición de una citocina o quimiocina. La citocina se selecciona del grupo que consiste en interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10), y factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α). Todavía más, la composición de lactoferrina puede inhibir también la producción de las metaloproteinasas de la matriz (las MMP).
- 50 Todavía más, la interleucina-18 o factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos estimula la producción o la actividad de las células inmunitarias. Las células inmunitarias se seleccionan del grupo que consiste en linfocitos T, células agresoras naturales, macrófagos, células dendríticas, y células polimorfonucleares. Más específicamente, las células polimorfonucleares son neutrófilos y los linfocitos T se seleccionan del grupo que consiste en células T CD4+, CD8+ y CD3+.
- 55 También se describe que la interleucina-18 o factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos estimula la producción o la actividad de las células implicadas en la reparación de las heridas. Las células implicadas en la reparación de las heridas se seleccionan del grupo que consiste en queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, células dendríticas y miofibroblastos. La inhibición de TNF-alfa inhibe además la migración y la maduración de las células dendríticas. Las células dendríticas son células de Langerhans.

También se describe un método de tratamiento de una herida que comprende la etapa de enriquecer el sistema inmunitario sistémico de un sujeto aumentando la cantidad de lactoferrina en la circulación sistémica administrando la composición de lactoferrina por una vía parenteral que se selecciona del grupo que consiste en vía intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intraocular, intraarticular, y un campo quirúrgico.

- 5 También se describe un método para mejorar el sistema inmunitario sistémico de un sujeto que sufre de una herida que comprende la etapa de administrar parenteralmente al sujeto una composición de lactoferrina.

Se describe también un método de tratamiento de una herida que comprende la etapa de enriquecer el sistema inmunitario mucosal en un sujeto aumentando la cantidad de lactoferrina en el tracto gastrointestinal del sujeto administrando oralmente una composición de lactoferrina.

- 10 Se describe también un método para mejorar el sistema inmunitario mucosal de un sujeto que sufre de una herida que comprende administrar oralmente al sujeto una composición de lactoferrina.

El texto anterior ha descrito bastante ampliamente las características y ventajas técnicas de la presente invención con el fin de que la descripción detallada de la invención que sigue, pueda ser entendida mejor. De aquí en adelante se describirán características y ventajas adicionales de la invención que forman el objeto de las reivindicaciones de la invención. Se debe apreciar que la concepción y las realizaciones específicas descritas se pueden utilizar fácilmente como base para modificar o diseñar otras estructuras para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención. También se debe entender que tales construcciones equivalentes no se separan de la invención como se indica en las reivindicaciones adjuntas. Las nuevas características que se cree que son específicas de la invención, tanto para su organización como para su método de operación, junto con otros objetos y ventajas serán mejor entendidas a partir de la siguiente descripción cuando se consideren junto con las figuras que las acompañan. Se debe entender expresamente, sin embargo, que se proporciona cada una de las figuras con fines de ilustración y descripción solamente y que no se pretende que sean una definición de los límites de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

- 25 Para un entendimiento más completo de la presente invención, se hace referencia ahora a las siguientes descripciones tomadas conjuntamente con los dibujos que las acompañan.

La FIG. 1 presenta la incidencia del 75 % de cierre de las heridas con y sin administración de geles de carbopol de lactoferrina humana recombinante en ratones sanos y en ratones diabéticos.

- 30 Las FIG. 2A y FIG. 2B muestran el tiempo de cicatrización de la herida con y sin administración tópica de la solución de lactoferrina humana recombinante en ratones sanos. Se utilizaron CGS-21680 (FIG. 2A) o Regranex™ (FIG. 2B) como un control positivo. En la FIG. 2A, * se refiere a significativo comparado con el tampón ($p < 0,05$), ** se refiere a muy significativo comparado con el tampón ($p < 0,01$) y # se refiere a significativo comparado con CGS-21680 ($p < 0,05$). En la FIG. 2B, * se refiere a significativo comparado con el tampón ($p < 0,05$), ' se refiere a significativo comparado con rhPDGF [Regranex™] ($p < 0,05$), ** muy significativo comparado con el tampón ($p < 0,01$), y " se refiere a muy significativo comparado con rhPDGF [Regranex™] ($p < 0,01$).

- 35 La FIG. 3 muestra el efecto de la rhLF tópica sobre la incidencia del 75 % de cierre de las heridas en ratones sanos. Se utilizó Regranex™ como control positivo.

Las FIG. 4A, FIG. 4B y FIG. 4C muestran el efecto de la rhLF oral sobre la incidencia del 75 % de cierre de las heridas en ratones sanos (FIG. 4A) y en ratones diabéticos (FIG. 4B), y sobre la incidencia del 100 % de cierre de las heridas en ratones diabéticos (FIG. 4C).

- 40 Las FIG. 5A y FIG. 5B muestran la incidencia del 75 % de cierre de las heridas en heridas infectadas cicatrizadas con y sin administración tópica (FIG. 5A) u oral (FIG. 5B) de solución de lactoferrina humana recombinante. Se utilizó Regranex™ como control positivo tópico (FIG. 5A).

Descripción detallada de la invención

- 45 Será muy claro para los expertos en la técnica que se pueden hacer diferentes realizaciones y modificaciones de la invención descrita en esta solicitud sin separarse del alcance y espíritu de la invención.

A. Definiciones

Como se usa aquí, el uso de la palabra "un" cuando se usa conjuntamente con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno," pero también es consistente con el significado de "uno o más," "al menos uno," y "uno o más de uno."

- 50 El término "herida aguda" como se usa aquí se refiere a una herida que cicatriza en un corto espacio de tiempo. Los ejemplos de heridas agudas incluyen, pero sin limitarse a ellas, quemaduras de espesor parcial, laceración, herida de bala o herida infectada.

5 El término "herida crónica" como se usa aquí se refiere a heridas que necesitan mucho tiempo para cicatrizar o que no cicatrizan sin intervención externa. Todavía más, como se usa aquí, una "herida crónica", denominada también "úlceras crónicas" se puede clasificar en líneas generales en tres tipos principales: úlceras diabéticas, úlceras por insuficiencia venosa, úlceras de decúbito o úlceras por presión. Todavía más, una herida crónica puede incluir también las heridas infectadas que tardan largo tiempo en cicatrizar.

10 El término "citocina" como se usa aquí se refiere a proteínas que son producidas por células que afectan el comportamiento de otras células, por ejemplo que estimulan o inhiben la proliferación celular. Por ejemplo, las citocinas que son producidas por linfocitos se denominan a menudo linfocinas o interleucinas. Un experto en la técnica puede comprender que el término citocina es un término genérico usado en la bibliografía para referirse a proteínas que son producidas por células que pueden afectar al comportamiento de otras células.

El término "quimioquina" como se usa aquí se refiere a citocinas pequeñas que están implicadas en la migración y activación de células, por ejemplo células fagocíticas y linfocitos. Un experto en la técnica puede comprender que las quimioquinas desempeñan un papel central en los procesos de respuesta inflamatoria e inmunitaria.

15 El término "lactoferrina" o "LF" como se usa aquí se refiere a la lactoferrina nativa o recombinante. La lactoferrina nativa se puede obtener por purificación a partir de leche o calostro de mamífero o de otras fuentes naturales. La lactoferrina recombinante (rLF) se puede preparar por expresión recombinante o producción directa en animales, plantas, hongos, bacterias, u otras especies procariotas o eucariotas, genéticamente alterados o por medio de síntesis química.

20 El término "composición de lactoferrina" como se usa aquí se refiere a una composición que tiene lactoferrina o una parte de la misma, en la que al menos el residuo de glicina N-terminal está truncado o sustituido.

25 El término "quelante de metales" como se usa aquí se refiere a un compuesto que se une a los metales. Los quelantes de metales que se pueden usar en la presente invención incluyen los quelantes de metales divalentes, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido [etilenbis(oxietileno)nitrito]tetraacético (EGTA), ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido hidroxietileno-triamino-diacético, (HEDTA) o sales de los mismos.

30 El término "variante de lactoferrina de N-terminal" como se usa aquí se refiere a lactoferrina en la que al menos la glicina N-terminal ha sido truncada y/o sustituida. Las variantes de lactoferrina de N-terminal incluyen también, pero sin limitarse a ellas, la delección y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácido N-terminal, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16 residuos de aminoácido N-terminal, etc. Por lo tanto, las variantes de lactoferrina de N-terminal comprenden al menos delecciones o truncaciones y/o sustituciones de 1 a 16 residuos de aminoácido N-terminal. La delección y/o sustitución de al menos la glicina N-terminal de la lactoferrina media en los mismos efectos biológicos que la lactoferrina de longitud completa y/o puede aumentar la actividad biológica de la lactoferrina, por ejemplo estimulando la producción de diferentes citocinas (esto es, IL-18, MIP-3 α , GM-CSF o IFN- γ), inhibiendo diferentes citocinas, (esto es, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, y TNF- α), y/o estimulando o promoviendo la cicatrización de la herida.

35 El término "administración parenteral" como se usa aquí incluye cualquier forma de administración en la que el compuesto se absorbe en el sujeto sin implicar la absorción a través del intestino. Los ejemplos de administraciones parenterales que se usan en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellas, la administración intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intraocular, o intraarticular. Todavía más, la administración parenteral incluye también la administración en un campo quirúrgico.

40 El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa aquí incluye uno cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en el caso en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células de la presente invención, se contempla su uso en composiciones terapéuticas. Se pueden incorporar también a las composiciones, ingredientes activos suplementarios.

45 El término "composición farmacéutica" como se usa aquí se refiere a una composición de lactoferrina que se dispersa en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición de lactoferrina puede comprender lactoferrina o una variante de lactoferrina de N-terminal en la que al menos el residuo de aminoácido glicina N-terminal está truncado o sustituido.

50 El término "administración oral" como se usa aquí incluye la administración oral, bucal, entérica o intragástrica, pero sin limitarse a ellas.

55 El término "sujeto" como se usa aquí, se usa para significar cualquier sujeto mamífero al que se administra oralmente una composición de lactoferrina humana según los métodos descritos en esta memoria. En una realización específica, la composición de la presente invención se emplea para tratar a un sujeto humano.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa aquí se refiere a una cantidad que da como resultado una mejora o remedio de los síntomas de la enfermedad o condición.

El término "administración tópica" como se usa aquí incluye la administración tópica, dérmica (por ejemplo, transdérmica o intra-dérmica), epidérmica, o subcutánea, pero sin limitarse a ellas.

- 5 El término "tratar" y "tratamiento" como se usa aquí se refiere a administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de lactoferrina humana recombinante para que el sujeto tenga una mejoría de la enfermedad. La mejoría es cualquier mejora o remedio de los síntomas. La mejoría es una mejora observable o medible. Por lo tanto, un experto en la técnica puede comprender que un tratamiento puede mejorar la enfermedad, pero puede no ser una cura completa de la enfermedad.
- 10 El término "herida" como se usa aquí se refiere a cualquier lesión, tal como una úlcera, como resultado de una enfermedad o trastorno, o como resultado de un accidente, incidente, o procedimiento quirúrgico. Las heridas se pueden definir además como agudas y/o crónicas.

B. Lactoferrina

- 15 La lactoferrina usada según la presente invención se puede obtener mediante aislamiento y purificación a partir de fuentes naturales, por ejemplo, leche de mamífero, pero sin limitarse a ella. La lactoferrina es preferiblemente lactoferrina de mamífero, tal como lactoferrina bovina o humana. En realizaciones preferidas, la lactoferrina se produce recombinantemente utilizando métodos de ingeniería genética bien conocidos y usados en la técnica, tales como la expresión recombinante o la producción directa en animales, plantas o eucariotas alterados genéticamente, o la síntesis química. Véase, a saber, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.571.896; 5.571.697 y 5.571.691.

- 20 En ciertos aspectos, la presente invención proporciona variantes de lactoferrina que tienen mejores actividades biológicas que la LF natural y o la rLF, por ejemplo, la capacidad para estimular y/o para inhibir citocinas o quimiocinas. En particular, la invención proporciona variantes de lactoferrina para las cuales al menos el residuo de glicina N-terminal ha sido sustituido y/o truncado. Las variantes de lactoferrina de N-terminal se pueden presentar naturalmente o pueden ser modificadas mediante la sustitución o delección de uno o más aminoácidos.

- 25 Las variantes delecionesales se pueden producir por proteólisis de lactoferrina y/o por expresión de un polinucleótido que codifica una lactoferrina truncada como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6.333.311.

- Las variantes sustitucionales o variantes de reemplazamiento contienen típicamente el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína. Las sustituciones pueden ser conservadoras, esto es, se reemplaza un aminoácido con uno de similar forma y carga. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de alanina a serina; de arginina a lisina; de asparragina a glutamina o histidina; de aspartato a glutamato; de cisteína a serina; de glutamina a asparragina; de glutamato a aspartato; de glicina a prolina; de histidina a asparragina o glutamina; de isoleucina a leucina o valina; de leucina a valina o isoleucina; de lisina a arginina; de metionina a leucina o isoleucina; de fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; de serina a treonina; de treonina a serina; de triptófano a tirosina; de tirosina a triptófano o fenilalanina; y de valina a isoleucina o leucina.
- 30
- 35

- Para hacer tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir la función biológica interactiva sobre una proteína es generalmente conocida en la técnica (Kyte and Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, DNA, anticuerpos, antígenos, y similares.
- 40

- Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga (Kyte and Doolittle, 1982), estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparragina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).
- 45

- Es conocido en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático o puntuación similar y todavía dan como resultado una proteína con actividad biológica similar, esto es, todavía se obtiene una proteína biológica funcionalmente equivalente. Para hacer tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están comprendidos dentro de los límites ± 2 , son particularmente preferidos los que están dentro de los límites ± 1 , y son aún más particularmente preferidos los que están dentro de los límites $\pm 0,5$.
- 50

- Se entiende también en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares se puede hacer de modo efectivo sobre la base de su hidrofiliidad. La patente de Estados Unidos No. 4.554.101, indica que la mayor hidrofiliidad media local de una proteína, regulada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, está correlacionada con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la patente de Estados Unidos No. 4.554.101, se han
- 55

asignado a los residuos de aminoácidos los siguientes valores de hidrofiliidad: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparragina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina -0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

5 Todavía más, se entiende que un aminoácido puede sustituir a otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y todavía se obtiene una proteína biológica e inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están comprendidos dentro de los límites ±2, son particularmente preferidos los que están dentro de los límites ±1, y son aún más particularmente preferidos los que están dentro de los límites ±0,5.

10 Por lo tanto, en la presente invención, las variantes o reemplazamientos sustitucionales se pueden producir utilizando técnicas convencionales de mutagénesis, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.220.007; 5.284.760; 5.354.670; 5.366.878; 5.389.514; 5.635.377; 5.789.166, y 6.333.311. Se prevé que al menos el residuo de aminoácido glicina N-terminal se puede reemplazar o sustituir con cualquiera de los veinte aminoácidos que se presentan en la naturaleza, por ejemplo un aminoácido cargado positivamente (arginina, lisina, o histidina), un aminoácido neutro (alanina, asparragina, cisteína, glutamina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina) y/o un aminoácido cargado negativamente (ácido aspártico o ácido glutámico). Todavía más, se contempla que cualquier residuo de aminoácido dentro del intervalo de N1 a N16 puede ser reemplazado o sustituido. Se prevé que al menos hasta 16 de los residuos de aminoácidos de N-terminal se pueden reemplazar o sustituir siempre que la proteína retenga la actividad biológica y/o funcional, que estimula la producción de diferentes citocinas, tales como IL-18, MIP-3 α , GM-CSF o IFN- γ , o que inhibe la producción de diferentes citocinas, tales como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, y TNF- α , o que promueve la cicatrización de la herida. Por lo tanto, las variantes de lactoferrina de N-terminal de la presente invención se consideran equivalentes funcionales de la lactoferrina.

25 En términos de equivalentes funcionales, es bien entendido por los expertos que es inherente a la definición de una proteína "equivalente biológicamente funcional" el concepto de que hay un límite del número de cambios que se pueden realizar dentro de una porción definida de la molécula a la vez que se retiene una molécula con un nivel aceptable de actividad biológica equivalente y/o se aumenta la actividad biológica de la molécula de lactoferrina. Los equivalentes biológicamente funcionales se definen por tanto aquí como aquellas proteínas en las que se pueden sustituir aminoácidos (o codones) seleccionados. La actividad funcional se define como la capacidad de la lactoferrina para estimular o inhibir diferentes citocinas o quimiocinas y/o estimular o promover la cicatrización de las heridas.

30 Todavía más, los residuos de aminoácido N-terminal se pueden sustituir con aminoácidos modificados y/o inusuales. A continuación se da una tabla de ejemplos, pero no limitantes, de aminoácidos modificados y/o inusuales.

| Abreviatura | Aminoácido | Abreviatura | Aminoácido |
|-------------|---|-------------|---------------------------|
| Aad | Ácido 2-aminoadípico | EtAsn | N-Etilasparragina |
| BAad | Ácido 3-aminoadípico | Hyl | Hidroxilisina |
| BAIa | beta-alanina, ácido beta-amino-propiónico | AHyl | alo-Hidroxilisina |
| Abu | Ácido 2-aminobutírico | 3Hyp | 3-Hidroxiprolina |
| 4Abu | Ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico | 4Hyp | 4-Hidroxiprolina |
| Acp | Ácido 6-aminocaproico | Ide | Isodesmosina |
| Ahe | Ácido 2-aminoheptanoico | Aile | alo-Isoleucina |
| Aib | Ácido 2-aminoisobutírico | MeGly | N-Metilglicina, sarcosina |
| BAib | Ácido 3-aminoisobutírico | Melle | N-Metiisoleucina |
| Apm | Ácido 2-aminopimélico | MeLys | 6-N-Metilisina |
| Dbu | Ácido 2,4-diaminobutírico | MeVal | N-Metilvalina |
| Des | Desmosina | Nva | Norvalina |
| Dpm | Ácido 2,2'-diaminopimélico | Nle | Norleucina |
| Dpr | Ácido 2,3-diaminopropiónico | Orn | Ornitina |
| EtGly | N-Etilglicina | | |

35 La presencia y la proporción relativa de variantes de lactoferrina de N-terminal (deleciones y/o sustituciones) en una preparación de lactoferrina (composición de lactoferrina) se puede establecer por determinación de la secuencia del aminoácido N-terminal mediante el proceso de degradación de Edman utilizando métodos convencionales. Una proporción relativa de la variante de lactoferrina de N-terminal comprende al menos el 1 % de la composición de lactoferrina, al menos el 5 % de la composición de lactoferrina, al menos el 10 % de la composición de lactoferrina,

al menos el 25 % de la composición de lactoferrina, al menos el 50 % de la composición de lactoferrina o cualquier intervalo intermedio.

En este método, se hace reaccionar la proteína con fenilisotiocianato (PITC), que reacciona con el residuo de aminoácido en el amino terminal en condiciones básicas para formar un derivado de feniltiocarbamilo (PTC-proteína). El ácido trifluoroacético separa entonces por escisión el primer aminoácido como su derivado de anilinoalinalona (ATZ-aminoácido) y deja el nuevo amino terminal para el siguiente ciclo de degradación.

El porcentaje de variante de lactoferrina de N-terminal se puede determinar más precisamente utilizando una reacción de dansilación. En resumen, la proteína se somete a dansilación utilizando cloruro de dansilo que reacciona con la proteína en condiciones alcalinas (pH 10). Después de la dansilación, las mezclas de reacción se secan como pelets, y después se hidrolizan completamente en HCl 6 N. La proporción de aminoácidos de N-terminal se identifica por RP HPLC utilizando un fluorímetro en línea en comparación con patrones preparados de aminoácidos dansilados conocidos.

C. Composiciones farmacéuticas

La composición de lactoferrina de la invención se dispersa típicamente en un vehículo farmacéutico. La lactoferrina que está contenida en la composición de la presente invención comprende lactoferrina o una variante de lactoferrina de N-terminal en la que al menos el residuo de glicina N-1 terminal está truncado o sustituido. Más específicamente, la variante de lactoferrina de N-terminal comprende al menos el 1 % de la composición, al menos el 5 % de la composición, al menos el 10 % de la composición, al menos el 25 % de la composición, al menos el 50 % de la composición o cualquier intervalo intermedio.

Todavía más, la composición comprende preferiblemente lactoferrina en combinación con un quelante de metales dispersado en un vehículo farmacéutico. Por lo tanto, la presente invención se dirige a una composición de lactoferrina con o sin un quelante de metales que se dispersa en un vehículo farmacéutico. Un experto en la técnica entiende que ambas composiciones (por ejemplo, lactoferrina sola o lactoferrina en combinación con un quelante de metales) están dentro del alcance de la presente invención y se pueden usar de forma intercambiable dependiendo del tipo de respuesta que se desee. Se prevé que la adición de un quelante de metales a la composición de lactoferrina mejore el secuestro de los iones metálicos y por lo tanto fortalezca el sistema inmunitario o aumente el efecto de la lactoferrina.

Los quelantes de metales que se pueden usar en combinación con lactoferrina, incluyen los quelantes de metales divalentes, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido [etilenbis(oxietilennitrilo)]tetraacético (EGTA), ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido hidroxietileno-triamino-diacético, (HEDTA) o cualquiera de sus sales. Más preferiblemente, se usa el EDTA en combinación con lactoferrina.

Además, de acuerdo con la presente invención, la composición de la presente invención adecuada para administración, se proporciona típicamente en un vehículo farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El vehículo debe ser asimilable e incluye vehículos, líquidos, semi-sólidos, esto es, pastas, o sólidos. Excepto en el caso en que cualquier medio, agente, diluyente o vehículo convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de una composición que lo contiene, el uso del mismo es apropiado en una composición administrable para uso en la práctica de los métodos descritos en esta memoria. Los ejemplos de vehículos o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, agentes de carga y similares, o combinaciones de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, la composición se combina con el vehículo de cualquier manera conveniente y práctica, esto es, por solución, suspensión, emulsión, mezcla, encapsulación, absorción y similares. Tales procedimientos son rutinarios para los expertos en la técnica.

En una realización específica de la presente invención, la composición se combina o se mezcla cuidadosamente con un vehículo semi-sólido o sólido. La mezcla se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente tal como la trituración. Se pueden añadir también agentes estabilizantes en el proceso de mezcla con el fin de proteger la composición de la pérdida de actividad terapéutica, esto es, desnaturalización en el estómago o en el entorno de la herida abierta. Los ejemplos de estabilizantes para uso en la composición incluyen tampones, aminoácidos tales como glicina y lisina, carbohidratos tales como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sacarosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc., inhibidores de las enzimas proteolíticas, y similares. Todavía más, se prevé que el quelante de metales divalentes, por ejemplo el EDTA, se puede usar también para estabilizar la composición de la presente invención. Más preferiblemente, para una composición administrada oralmente, el estabilizante puede incluir también antagonistas de la secreción de ácidos estomacales. Todavía más, para una composición administrada tópicamente, el estabilizante puede incluir también antagonistas de los ácidos de la piel.

La composición para administración oral que se combina con un vehículo semi-sólido o sólido se puede formular además en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda, en comprimidos, o en píldoras. Más preferiblemente, las cápsulas de gelatina, los comprimidos, o las píldoras tienen recubrimiento entérico. Los recubrimientos entéricos

evitan la desnaturalización de la composición en el estómago o en el intestino superior donde el pH es ácido. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.629.001. Después de alcanzar el intestino delgado, el pH básico de éste disuelve el recubrimiento y permite que la composición de lactoferrina sea liberada y absorbida por células especializadas, por ejemplo, los enterocitos epiteliales y las células M de las placas de Peyer.

5 Además, la composición para administración tópica que se combina con un vehículo semi-sólido se puede formular también en pomada en gel. Un vehículo preferido para la formación de una pomada en gel es un polímero gel. Los polímeros gel evitan la desnaturalización de la composición en la piel abierta por las proteasas séricas. La formulación en gel de la presente invención proporciona también un sistema de liberación controlada para la lactoferrina o su actividad sobre un sitio de la herida. La administración controlada se refiere a una liberación de fármaco o liberación de actividad suficiente para mantener un nivel terapéutico durante un largo periodo de tiempo, tal como hasta 24 horas o más, preferiblemente en el intervalo de 1 a 12 horas. La presente formulación en gel aumenta el tiempo de contacto de la lactoferrina en el sitio de la herida y proporciona una forma farmacéutica de liberación sostenida necesaria para alcanzar un aumento significativo de la velocidad de cicatrización de la herida. Esta es una importante ventaja porque permite una aplicación menos frecuente de la formulación a la herida y con ello produce menos alteraciones para la herida y sus componentes celulares.

La formulación en gel de la presente invención tiene la ventaja de adherirse a una herida y de ajustarse al contorno irregular del cuerpo o de la herida. Los geles se pueden aplicar directamente al sitio de la herida o conjuntamente con un sustrato amoldable poroso o microporoso, por ejemplo en la forma de un recubrimiento, a ser aplicado al sitio de la herida. Los geles tienen las ventajas adicionales de tener un alto contenido en agua (lo que mantiene la herida húmeda), la capacidad de absorber el exudado de la herida, la fácil aplicación a una herida y la fácil eliminación por lavado. Los geles producen sensación de frío cuando se aplican a una herida y de este modo aumentan el confort del paciente y la aceptación de la formulación, especialmente sobre heridas sensibles.

Los geles acuosos de la presente invención tienen diferentes viscosidades dependiendo de la aplicación del gel que se pretenda. La viscosidad es una medida de la resistencia de un líquido a fluir. Se define como la relación de la tensión de cizalladura a la velocidad de cizalladura. La tensión de cizalladura es la resistencia del líquido a fluir bajo la influencia de una fuerza aplicada, esto es, la resistencia molecular dentro de un cuerpo que se opone a una fuerza externa. La tensión de cizalladura se define como la relación de la fuerza al área de corte. Cuando un líquido se somete a cizallamiento, en el supuesto de flujo laminar, las capas del líquido se mueven a distintas velocidades. La velocidad relativa de moción de las capas es solamente un factor en la velocidad de cizalladura. El otro es la distancia, o aclaramiento entre los planos de cizalladura. Por lo tanto, la velocidad de cizalladura se define como la relación de la velocidad del gel al aclaramiento. La viscosidad tiene las dimensiones de dinas/s/cm². Estas dimensiones se refieren a poises. Las dimensiones de viscosidad dadas aquí, a menos que se indique otra cosa, están en centipoises (cP) medidas utilizando un viscosímetro Brookfield. Todos los valores de viscosidad son a temperatura ambiente, por ejemplo, 22 °C-25 °C, a menos que se indique otra cosa.

35 La cantidad de lactoferrina en la presente invención puede variar desde aproximadamente 1 µg hasta aproximadamente 100 g de lactoferrina. En las realizaciones preferidas, la composición de la presente invención comprende una concentración de lactoferrina de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 30 %. Más preferiblemente, la lactoferrina se administra oralmente en el intervalo de 10 mg a 25 g o la lactoferrina se administra tópicamente en el intervalo de 1 µg a 5 g. La lactoferrina puede comprender lactoferrina o una variante de lactoferrina de N-terminal en la que al menos el residuo de glicina N-1 terminal está truncado y/o sustituido.

Más preferiblemente, la composición de la presente invención contiene también quelantes de metales, por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido [etilenbis(oxietilennitrilo)]tetraacético (EGTA), ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (BAPTA), ácido hidroxietilen-triamino-diacético, (HEDTA) o sus sales. La cantidad del quelante de metales en la composición puede variar desde aproximadamente 1 ng hasta aproximadamente 1 g. Un quelante de metales preferido es el EDTA.

Los materiales formadores de gel de la presente invención pueden ser polímeros solubles en agua capaces de formar una solución acuosa viscosa o polímeros no solubles en agua, hinchables en agua (por ejemplo, colágeno), que pueden formar también una solución viscosa. Los polímeros hinchables son aquellos que absorben agua en lugar de disolverse en agua. Las formas reticuladas del polímero descritas aquí pueden no ser solubles en agua pero pueden ser hinchables en agua. Por lo tanto, las formas reticuladas del polímero están dentro del alcance de la presente invención. La reticulación se refiere a cadenas de polímero unidas covalentemente junto con un reactivo bifuncional tal como glutaraldehído. También, los expertos en la técnica pueden entender que ciertos polímeros se tengan que usar en forma de sal o parcialmente neutralizados con el fin de hacerlos solubles en agua. Por ejemplo, es preferible utilizar ácido hialurónico como hialuronato de sodio para obtener una adecuada solubilidad en agua.

55 En las formulaciones de gel acuoso para cicatrización tópica o incisional de la herida, se puede seleccionar el polímero del grupo que consiste en polímeros vinílicos, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, polímeros de tipo polisacáridos, de tipo proteína, de poli(óxido de etileno), de acrilamida y derivados o sales de los mismos. Se entiende que poli(óxido de etileno) incluye el polietilenglicol. En las formulaciones de gel para uso en la cicatrización

de las heridas de la cámara anterior del ojo, los polímeros pueden ser los mismos excepto que no se prefiere usar copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno ni polímeros de poli(óxido de etileno). También, para uso en la cámara anterior, se prefiere que el polímero sea biodegradable, esto es, que se desintegre en constituyentes inofensivos que puedan ser drenados o metabolizados en la cámara anterior. En las formulaciones acuosas de baja viscosidad para uso en la cicatrización de una herida oftálmica, los polímeros que forman el gel pueden ser los mismos que para la cicatrización tópica o incisional de la herida, excepto que se prefiere no usar el poli(óxido de etileno).

Los polímeros de vinilo útiles en la presente invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, polivinil-pirrolidona y alcohol polivinílico. Los polisacáridos útiles en la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en celulosa o derivados de celulosa, glucosaminoglucanos, agar, pectina, ácido alginico, dextrano, almidón, y chitosán. El almidón se presenta en dos formas, α -amilosa y amilopectina. Se prefiere la α -amilosa, más soluble en agua. Los glucosaminoglucanos se seleccionan del grupo que consiste en ácido hialurónico, condroitina, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato, dermatan sulfato, keratan sulfato, heparina sulfato y heparina. Los glucosaminoglucanos se usan para mejorar la cicatrización de la herida en combinación con cualquier otro polímero formador de gel. Las proteínas útiles en la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en colágeno, gelatina y fibronectina. Los polímeros de acrilamida son polímeros de poli(acrilamida) o de polimetacrilamida. Se prefieren los polímeros de poli(acrilamida) biocompatibles. En otras realizaciones, los carbómeros son los polímeros de poli(acrilamida) preferidos. Los carbómeros son polímeros sintéticos de alto peso molecular de ácido acrílico reticulado con ésteres alquílicos de sacarosa o con pentaeritritol. Los grados de carbómeros adecuados comercialmente disponibles incluyen Carbopol 910, Carbopol 934P, Carbopol 940, Carbopol 941, Carbopol 971P, Carbopol 974P, Carbopol 980, Carbopol 981, Carbopol 1342, Rheogic 252L, Rheogic 250H, y Hostacerin PN73.

En la formulación de gel para cicatrización tópica o incisional de la herida, la viscosidad puede estar dentro del intervalo 1.000-12.000.000 cps a temperatura ambiente. Se prefiere que el intervalo de viscosidad sea 50.000-2.000.000. En una realización de la presente invención, la formulación de gel tópico puede comprender 0,01-5 % en peso de ácido poliacrílico que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 450.000-4.000.000. En una realización preferida, el ácido poliacrílico está presente a 0,5-1,5 % en peso y tiene un peso molecular medio de 2.000.000-4.000.000. El pH del gel de ácido poliacrílico debe estar dentro del intervalo 4,5-8 y más preferiblemente en el intervalo 6,5-7,5.

En otra realización, el gel tópico e incisional de la presente invención puede comprender 15-60 % en peso de un copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 500-50.000. En una realización preferida, el copolímero de bloque está presente a 15-40 % en peso y tiene un peso molecular medio en el intervalo de 1.000-15.000. Los copolímeros de bloque usados en la presente invención son comúnmente conocidos como plurónicos. Los plurónicos preferidos son Plurónico F88 y F127.

En otra realización, el gel tópico o incisional puede comprender 1 a 20 % en peso de un polímero de celulosa que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 a 700.000. En una realización preferida, el polímero de celulosa está presente a 2-8 % en peso y tiene un peso molecular medio en el intervalo de 80.000-240.000. Los polímeros de celulosa preferidos son hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC) y metilcelulosa (MC).

En otra realización, el gel tópico e incisional puede comprender 0,5-10 % en peso de ácido hialurónico que tiene un peso molecular medio en el intervalo de 500.000 a 8.000.000. En una realización preferida, el ácido hialurónico está presente a 1,5-6,0 % en peso y el peso molecular medio es mayor que 1.000.000.

Los polímeros de acrilamida pueden ser útiles para todos los tipos de cicatrización de las heridas, particularmente en la cámara anterior del ojo. Un polímero de acrilamida absorbible, tal como poli(acrilamida), puede ser un buen sustituto para los presentes sistemas de vehículos usados en aplicaciones oftálmicas, tal como el ácido hialurónico. Los polímeros de acrilamida pueden tener un peso molecular medio en el intervalo de 1-13 millones, preferiblemente aproximadamente 4-6 millones. El tanto por ciento en peso del polímero de acrilamida en el gel puede ser 2-5 %, preferiblemente 3,5-4,5 %. Los polímeros de acrilamida sustituidos, tales como polímeros sustituidos con metilo y alquilo están también dentro del alcance de la presente invención.

Para uso en la cámara anterior del ojo, un sistema de administración de gel de acrilamida tiene las siguientes características: todos los productos de la disolución o degradación de la matriz de liberación son no tóxicos y no obstruyen la malla trabecular; el gel es ópticamente transparente; y se puede dejar el gel en la cámara anterior sin causar efectos clínicos adversos tales como un aumento inaceptable de la presión ocular.

Será muy claro para los expertos en la técnica que el intervalo de viscosidad deseado se puede alcanzar variando el peso molecular y el porcentaje de concentración del polímero en la formulación. Por ejemplo, se puede conseguir un gel que tenga una viscosidad baja utilizando un polímero de bajo peso molecular o un porcentaje de concentración más bajo o una combinación de las dos cosas. Se puede conseguir un gel de alta viscosidad utilizando un polímero

de peso molecular más alto y un porcentaje de concentración más alto. Se pueden conseguir viscosidades intermedias variando consecuentemente el peso molecular y el porcentaje de concentración.

La solución de baja viscosidad puede comprender 0,01-2,0 % en peso de ácido poliacrílico que tiene un peso molecular de aproximadamente 100.000-4.000.000. En una realización preferida, el polímero está presente a 0,05-0,5 %. En otra realización, esta solución viscosa diluida puede comprender 2-40 % en peso de un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno que tiene un peso molecular medio de 500-500.000. Preferiblemente, la concentración es de 2-20 % y el peso molecular es de 1.000-15.000. Alternativamente, la solución viscosa diluida puede comprender un polímero de celulosa a 1-20 % y que tiene un peso molecular de aproximadamente 80.000-240.000. Es preferible que la concentración esté en el intervalo de 1-10 %. En otra realización, la solución viscosa diluida puede comprender 0,5-5,0 % en peso de ácido hialurónico que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 500.000-8.000.000. Preferiblemente, la concentración es 0,5-2,0 % y el peso molecular medio es 1.000.000-6.000.000. Si la solución viscosa diluida es para ser usada como gotas oftálmicas, se prefiere que la viscosidad esté en el intervalo de 1-100 cps. Si se usa para otras aplicaciones, tales como para empapar un vendaje, entonces será adecuada cualquier viscosidad en el intervalo de 1,0-5.000.

Después de la formulación, las soluciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz para dar como resultado una mejoría o remedio de los síntomas. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas farmacéuticas tales como soluciones ingeribles, cápsulas de liberación de fármacos, pomadas en gel y similares. Puede tener lugar alguna variación en la dosis dependiendo de la enfermedad del sujeto a ser tratada. La persona responsable de la administración puede determinar, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones cumplen las especificaciones de esterilidad, seguridad general y pureza requeridas por la FDA Office of Biologics standards.

D. Tratamiento de las heridas

De acuerdo con la presente invención, una composición de lactoferrina proporcionada en cualquiera de los vehículos farmacéuticos descritos antes, es preferiblemente para administración oral, tópica, o parenteral a un sujeto sospechoso de tener o que tiene una úlcera diabética. Un experto en la técnica puede determinar la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición a ser administrada a un sujeto basándose en varias consideraciones, tales como la absorción, el metabolismo, el método de administración, la edad, el peso, la gravedad de la enfermedad y la respuesta a la terapia. La administración oral de la composición incluye la administración oral, bucal, entérica o intragástrica. Se prevé también que la composición pueda ser usada como un aditivo alimentario. Por ejemplo, la composición se esparce por el alimento o se añade a un líquido antes de la ingestión. La administración tópica de la composición incluye la administración tópica, dérmica, epidérmica, o subcutánea. La administración parenteral incluye, pero sin limitarse a ellas, la administración intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intraocular o intraarticular o la administración en un campo quirúrgico.

Los tipos de heridas incluyen heridas de la piel, heridas internas, heridas gastrointestinales, heridas orales, heridas óseas, heridas oftálmicas, heridas quirúrgicas, o cualquiera de sus combinaciones. Las heridas se pueden encontrar sobre la piel, órganos internos, estómago e intestinos (gastrointestinales), mucosa oral, y los ojos (heridas oftálmicas, por ejemplo, úlceras corneales, radioqueratotomía, trasplantes de córnea, epiqueratofaquia y otras heridas inducidas quirúrgicamente en el ojo). Dependiendo del proceso que causa las heridas, las heridas se pueden clasificar también como heridas incisionales, heridas excisionales, úlceras diabéticas, úlceras por insuficiencia venosa, úlceras de decúbito o úlceras por presión, heridas químicas, y heridas por quemaduras.

La presente invención se refiere a la administración de la composición de lactoferrina para tratar heridas de la piel. Las heridas de la piel comprenden además heridas de espesor completo y heridas de espesor parcial, pero sin limitarse a ellas. Las heridas de espesor completo incluyen la separación completa de la epidermis y la dermis hasta el fondo de los planos fasciales o grasa subcutánea. En la variedad que pierde la piel, la delgada musculatura del *panniculus carnosus*, que se adhiere firmemente a la base de la dermis, usualmente se separa también. En las heridas de espesor parcial se deja atrás una cantidad sustancial de dermis, la mayor parte reticular, y lo que es más importante, las bases de la mayor parte de los anejos epidérmicos (glándulas sebáceas y sudoríparas, folículos pilosos) permanecen intactas.

Una herida se puede definir también como una herida aguda. Las heridas agudas tienen una velocidad de cicatrización relativamente rápida, especialmente en sujetos sanos. Sin embargo, la cicatrización se puede prolongar en los sujetos ancianos o inmunodeficientes. La cicatrización se prolonga también si se infecta la herida.

Una herida se define también como una herida crónica. Ejemplos de heridas crónicas o úlceras crónicas incluyen, pero sin limitarse a ellas, úlceras diabéticas, úlceras por insuficiencia venosa, úlceras de decúbito o por presión. Todavía más, las heridas crónicas pueden incluir también heridas infectadas. Las heridas crónicas son heridas que no se curan o lo hacen muy lentamente, y presentan una carencia parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Las heridas crónicas o úlceras crónicas se pueden clasificar en líneas

generales en tres tipos principales: úlceras diabéticas, úlceras por insuficiencia venosa, úlceras de decúbito o por presión. Las úlceras diabéticas aparecen a menudo en un pie. El estado diabético crónico y el control deficiente de la glucosa produce una circulación periférica y una microcirculación deficientes debido a la arterioesclerosis progresiva; cambios neuropáticos que dan como resultado una extremidad insensible propensa al traumatismo; y defectos intrínsecos en el proceso de cicatrización de la herida que pueden incluir la reducción de la abundancia y de la respuesta a los factores de crecimiento celular. En el caso de úlceras venosas, la hipertensión venosa causa disturbios en la microcirculación y cambios patológicos de los capilares, niveles persistentes elevados de citocinas pro-inflamatorias y proteasas. Los fibroblastos envejecen y responden menos a los factores de crecimiento, que se distribuyen desfavorablemente. Las enzimas proteolíticas y sus inhibidores están desequilibradas. Las úlceras por presión aparecen cuando la piel está bajo presión sin movimiento que permita que la sangre fluya durante 8-12 horas.

En una realización preferida de la presente invención, la composición de la invención (lactoferrina sola o lactoferrina en combinación con un quelante de metales) es para administración en una cantidad eficaz para sellar, cerrar, mejorar o reparar la herida. Además, se prevé que la composición de la presente invención también puede disminuir, reducir, o inhibir, las infecciones bacterianas de la herida, lo que ayuda en el proceso de cicatrización de una herida.

Los regímenes de tratamiento pueden variar también, y a menudo dependen del tipo de herida, de la localización de la herida, del progreso y/o cicatrización de la herida, y de la salud y edad del paciente. Obviamente, ciertos tipos de heridas requerirán un tratamiento más agresivo, mientras que al mismo tiempo, ciertos pacientes no pueden tolerar protocolos más difíciles. El médico será el más apropiado para tomar tales decisiones basadas en la eficacia y toxicidad (si la hubiere) conocidas de las formulaciones terapéuticas.

En realizaciones específicas, la composición se da en una dosis única o en dosis múltiples. La dosis única se puede administrar diariamente, o múltiples veces al día, o múltiple veces a la semana, o mensualmente o múltiples veces al mes. En otra realización, la composición se administra en una serie de dosis. La serie de dosis se puede administrar diariamente, o múltiples veces al día, semanalmente, o múltiples veces a la semana, o mensualmente, o múltiples veces al mes. Por lo tanto, un experto en la técnica se da cuenta de que dependiendo del tipo de herida, localización, salud del sujeto, etc., la composición de lactoferrina de la presente invención se puede administrar durante cualquier periodo de tiempo dado hasta que la herida cicatrice al menos en un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % o cualquier intervalo intermedio.

Para la administración tópica, la formulación de gel de la presente invención se puede usar para recubrir las fibras de un apósito de gasa absorbente para formar un vendaje para cicatrización de las heridas que se puede colocar sobre una herida. Para este uso se prefiere la formulación de baja viscosidad. El vendaje de cicatrización de la herida se puede preparar empapando un apósito de gasa con una solución de gel acuoso que contiene lactoferrina que tiene actividad de cicatrización de la herida. El vendaje se puede aplicar entonces a la herida de forma que las fibras empapadas de la gasa se pongan en contacto con la herida y estimulen la velocidad de cicatrización de la herida.

En aquellas aplicaciones en las que la presente invención es un gel que se aplica a una herida interna o incisional, se prefiere que el polímero que forma el gel sea biodegradable. Los polímeros que se presentan en la naturaleza son generalmente biodegradables. Ejemplos de estos son el colágeno, los glucosaminoglucanos, la gelatina y el almidón. Los polímeros celulósicos no son biodegradables. Los polímeros sintéticos tales como los polímeros de vinilo no son degradables. La biodegradabilidad de los polímeros descritos en esta memoria es bien conocida por los expertos en la técnica.

Otra realización de la presente invención se refiere a un método para tratar una herida que comprende la etapa de enriquecer el sistema inmunitario local aumentando la cantidad de lactoferrina en la proximidad de la herida. Preferiblemente, la lactoferrina se administra tópicamente a la herida.

Todavía más, la presente invención se refiere también a un método para tratar una herida que comprende la etapa de enriquecer el sistema inmunitario sistémico aumentando la cantidad de lactoferrina en la circulación sistémica. Preferiblemente, la lactoferrina se administra por vía parenteral, que incluye, pero sin limitarse a ellas, la vía intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intraocular, intraarticular o dentro de un campo quirúrgico.

Todavía, una realización adicional se refiere a un método para tratar una herida que comprende la etapa de enriquecer el sistema inmunitario mucosal aumentando la cantidad de lactoferrina en el tracto gastrointestinal del sujeto.

En otras realizaciones, la presente invención se refiere a un método de potenciar el sistema inmunitario de un sujeto que tiene una herida administrando al sujeto una composición de lactoferrina. Dependiendo del modo de administración, se potencian diferentes ramas del sistema inmunitario. Por ejemplo, la administración tópica de la composición da como resultado el reforzamiento del sistema inmunitario local, esto es, en la proximidad de la herida. La administración parenteral de la composición da como resultado el reforzamiento del sistema inmunitario

sistémico. Todavía más, la administración oral de la composición da como resultado el reforzamiento del sistema inmunitario mucosal, lo que también puede producir asimismo efectos sistémicos. En otras realizaciones, la composición de lactoferrina se administra en combinación con un quelante de metales, por ejemplo el EDTA.

5 Se prevé que el sistema inmunitario, ya sea local, sistémico o mucosal, se potencia por la lactoferrina que estimula citocinas y/o quimiocinas. Los ejemplos de citocinas incluyen interleucina-18 y GM-CSF en el tracto gastrointestinal, que se sabe que potencian las células inmunitarias o que estimulan la producción de células inmunitarias. Por ejemplo, la interleucina-18 potencia las células agresoras naturales o linfocitos T, que pueden destruir las bacterias que infectan una herida. En realizaciones específicas, la interleucina-18 (IL-18) potencia las células CD4+, CD8+ y CD3+. Es conocido por los expertos en la técnica que la IL-18 es una citocina Th₁ que actúa sinérgicamente con la interleucina-12 y la interleucina-2 en la estimulación de la producción de IFN-gamma de los linfocitos. Otras citocinas o quimiocinas pueden ser potenciadas también, por ejemplo IL-12, IL-1b, MIP-3α, MIP-1α, o IFN-gamma, pero sin limitarse a ellas. Se pueden inhibir otras citocinas o enzimas, por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α, o las metaloproteinasas de la matriz. Se contempla además que IL-18 o GM-CSF estimulan la producción o la actividad de células implicadas en la reparación de las heridas, por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, queratinocitos, células endoteliales, células dendríticas, fibroblastos, y miofibroblastos. Todavía más, se prevé que la lactoferrina inhiba la producción de TNF-alfa, lo que inhibe las células implicadas en la inflamación.

10 Se prevé además que el refuerzo del sistema inmunitario local en un sujeto al administrar tópicamente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de lactoferrina en la proximidad de la herida puede producir la destrucción de las bacterias que infectan la herida. Todavía más, la administración tópica de una composición de lactoferrina puede estimular la producción de una citocina o una quimiocina. Los ejemplos de citocinas que pueden ser estimuladas por la lactoferrina incluyen, pero sin limitarse a ellas, interleucina-18 (IL-18), interleucina-12 (IL-12), factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), e interferón gamma (IFN-γ). Los ejemplos de quimiocinas incluyen, pero sin limitarse a ellas, la proteína 3 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-3α), la proteína 1 alfa inflamatoria de macrófagos (MIP-1α), o la proteína beta inflamatoria de macrófagos (MIP-1β).

15 La composición de lactoferrina de la presente invención puede dar como resultado también la inhibición de una citocina o quimiocina. Las citocinas incluyen, pero sin limitarse a ellas, interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10), y factor alfa de necrosis tumoral (TNF-α). Todavía más, la composición de lactoferrina puede inhibir también la producción de las metaloproteinasas de la matriz (las MMP).

20 En otras realizaciones, las citocinas, por ejemplo, interleucina-18 o factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, pueden estimular la producción o la actividad de las células inmunitarias. Las células inmunitarias incluyen, pero sin limitarse a ellas, linfocitos T, células agresoras naturales, macrófagos, células dendríticas, y células polimorfonucleares. Más específicamente, las células polimorfonucleares son neutrófilos y los linfocitos T se seleccionan del grupo que consiste en células T CD4+, CD8+ y CD3+.

25 En otra realización, las citocinas, por ejemplo, interleucina-18 o factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, puede estimular también la producción o la actividad de las células implicadas en la reparación de las heridas. Las células implicadas en la reparación de las heridas incluyen, pero sin limitarse a ellas, queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos, células dendríticas, y miofibroblastos. La inhibición del TNF-alfa inhibe además la migración y la maduración de las células dendríticas. Las células dendríticas pueden ser células de Langerhans.

40 E. Tratamientos de combinación

Con el fin de aumentar la eficacia de la composición de la presente invención, puede ser deseable combinar la composición de la presente invención con otros agentes eficaces en el tratamiento de las heridas, tales como factores de crecimiento, terapia de reemplazamiento de piel, desbridamiento enzimático y quirúrgico, apósitos humedecidos para la herida, limpiadores, antibióticos. Tales agentes de cicatrización de las heridas son capaces de afectar negativamente a una herida en un sujeto, por ejemplo, aumentando la velocidad de crecimiento de las células de la piel, aumentando el suministro de sangre a las células de la piel, promoviendo una respuesta inmunitaria frente a las bacterias que infectan la herida, destruyendo las bacterias, limpiando el tejido isquémico, promoviendo el cierre de la herida. Más generalmente, estos otros agentes de cicatrización de las heridas se proporcionan en una cantidad eficaz combinada para estimular la cicatrización de una herida. Este procedimiento puede incluir la administración de la composición de la presente invención y el agente o agentes o múltiples factores al mismo tiempo. Esto se puede conseguir administrando una composición o formulación farmacológica única que incluye ambos agentes, o administrando dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, o a tiempos suficientemente próximos como para producir un solapamiento de este efecto, donde una composición incluye la composición de lactoferrina y la otra incluye el segundo o segundos agentes.

55 Alternativamente, la composición de la presente invención puede preceder o seguir al otro tratamiento con el agente de cicatrización de la herida por intervalos que varían desde minutos a semanas. En las realizaciones en que el otro agente de cicatrización de las heridas y la composición de la invención se administran o aplican por separado a la

herida, se podría asegurar en general que no transcurre un periodo significativo de tiempo entre el tiempo de cada administración, de tal modo que el agente y la composición de lactoferrina humana todavía serían capaces de producir un efecto combinado ventajoso sobre la herida. En tales casos, se contempla que se puede poner en contacto la herida con ambas modalidades de administración dentro de aproximadamente 1-14 días una de otra y más preferiblemente, dentro de aproximadamente 12-24 horas una de otra. En algunas situaciones, puede ser deseable extender el periodo de tiempo para el tratamiento significativamente, sin embargo, cuando transcurran de varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las respectivas administraciones.

1. Factores de crecimiento

Las terapias de cicatrización de las heridas incluyen tratamientos basados en el factor de crecimiento. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, Regranex™ (Becaplermina-BB gel), AuTolo-Gel (liberado de plaquetas autólogas activadas), Procuren (liberado de plaquetas autólogas inducidas por trombina). Los factores de crecimiento actúan sin limitación promoviendo la granulación o la formación de nuevo tejido conjuntivo altamente vascularizado; promoviendo la proliferación, diferenciación y migración de células epiteliales, células endoteliales vasculares y otras células de la piel; aumentando la producción de colágeno, colagenasa, y matriz extracelular.

2. Terapia de reemplazamiento de piel

Los ejemplos incluyen pero sin limitarse a ellos, Apligraf (piel viva de dos capas), Trancyte (sustituto temporal de piel derivado de fibroblastos humanos), Dermagraft (sustituto permanente de piel, de una capa), Epicel (piel artificial viva de una capa), Integra (modelo de regeneración de piel basada en colágeno), AlloDerm (piel artificial de capa única preparada de cadáveres humanos), CCS (piel artificial, viva, cultivada).

3. Desbridamiento enzimático y quirúrgico

El desbridamiento es un proceso o procedimiento para limpiar el tejido isquémico o muerto. Los desbridadores enzimáticos incluyen Accuzyme pomada de desbridación de papaína-urea y Collagenase Santyl. El desbridamiento quirúrgico se refiere a la separación física de al menos parte del tejido isquémico o muerto en una herida. El desbridamiento se puede repetir, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Los tratamientos de desbridamiento enzimático pueden ser de dosis variables también. Se contempla además que la presente invención se puede usar conjuntamente con el desbridamiento enzimático o quirúrgico.

4. Apósitos

Las terapias de cicatrización de las heridas incluyen una variedad de tratamientos basados en apósitos. Las categorías de apósitos incluyen pero sin limitarse a ellos, hidrogeles amorfos, hojas de hidrogel, absorbtivos, alginatos, apósitos biológicos y sintéticos, colágenos, composites, capas de contacto, gasas elásticas, espumas, gasas y apósitos no tejidos, hidrocoloides, apósitos impregnados, hojas de gel de silicona, apósitos de plata, láminas transparentes, rellenadores de heridas.

5. Limpiadores

Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, Biolex, Lamin, Wound Wash Saline, Techni-Care, CarraKlenz, DiaB Klenz, MicroKlenz, RadiaCare Klenz, UltraKlenz, Comfee Sea-Clens, Optipore Sponge, Saf-Clens, Shur-Clens, Dermagran, DermaKlenz, Dumex, Gene Klenz, GRX, Allclenz, Restore, Hyperion, Medi Tech, Skintegrity, MPM Antimicrobial, ClinsWound, Septicare, Lobana Saline.

6. Antimicrobianos

Los ejemplos de antimicrobianos incluyen, pero sin limitarse a ellos, Sulfamylon crema, Thermazene crema (sulfadiazina de plata al 1 %), almohadillas o gel de cadexómero yodado. Los ejemplos de antimicrobianos intravenosos incluyen, pero sin limitarse a ellos, imipenem/cilastatina, inhibidores de β -lactama/ β -lactamasa (ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam), y cefalosporinas de amplio espectro (cefoxitina, ceftizoxima, ceftazidima). Otros ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, Bensal HP, Barri-Care, Care-Creme, Formula Magic, Baza, Micro-Guard, Ca-Rezz, Diabet-X productos, Mitrazol Polvo, PiercingCare, Triple Care productos, y diferentes cremas y polvos antifúngicos.

7. Compresión

Los ejemplos de compresión dinámica, incluyen bombas y manguitos tales como ArtAssist, ArterialFlow, EdemaFlow, PulStar, Circulator Boot, Flowplus, Flowpress, Flowtron, pero sin limitarse a ellos. Los ejemplos de compresión estática incluyen, pero sin limitarse a ellos, vendas para piernas, guantes, calcetines, medias, soportes de piernas, manguitos de brazos, almohadillas de estasis, medias de compresión, bandas no elásticas, vendajes de alta compresión, vendajes impregnados de cinc, vendajes elásticos.

8. Terapia de oxígeno

Los ejemplos de terapia sistémica de oxígeno hiperbárico incluyen, pero sin limitarse a ellos, compartimentos para que un paciente se tumbé, para que un paciente se incorpore con un ángulo de 25 grados, para que un paciente se incorpore con un ángulo de 90 grados, para que más de un paciente sean tratados simultáneamente. Los ejemplos de terapia tópica de oxígeno hiperbárico incluyen, pero sin limitarse a ellos, sistemas tópicos de oxígeno hiperbárico de un solo uso para úlceras de las extremidades, sistemas tópicos de oxígeno hiperbárico de un solo uso para heridas de decúbito, heridas post-operación y post-traumáticas.

9. Hidroterapia, terapia eléctrica

Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a máquinas de hidroterapia seca; sistemas de cuidado térmico sin contacto de las heridas para uso en heridas de espesor parcial y de espesor completo que mantienen el calor y la humedad en el área de la herida; sistemas que proporcionan energía electromagnética con altos picos de potencia, alta frecuencia pulsada, no térmica, para tratar el edema y el dolor en heridas agudas y crónicas; sistemas que usan presión negativa localizada, controlada, y soporte para la cicatrización de la herida húmeda; irrigadores pulsátiles con presiones controlables inferiores a 103,4 KPa para tratamiento específico del sitio de diferentes heridas con variedad de puntas; diferentes sistemas de irrigación de las heridas y sistemas de hidromasaje.

10. Productos de terapia nutricional

Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a la alimentación por sonda isotónica, alta en proteínas, que contiene fibra, para ayudar a la cicatrización de la herida; suplementos nutricionales ricos en proteína, libres de colesterol.

11. Parches cohesivos, adhesivos, sellantes

Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, Dermabond, CoStasis, CoSeal, BioGlue, FibRx, FocalSeal, FloSeal, AutoSeal, Indermil, Syvek, LiquiSheild, LiquiBand, Quixil, CryoSeal, VIGuard Fibrin Sealant, y diferentes vendas, cierres, y productos de seguridad.

12. Promotores tópicos de cicatrización de las heridas

Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a aerosoles tópicos que estimulan el lecho capilar de las heridas crónicas; protectores de la piel con formulaciones nutrientes de cinc; geles tópicos para ayudar a que las escaras sean más blandas y más suaves; pomadas hidrófilas que limpian las proteínas degradadas, estimulan la granulación saludable, controlan la inflamación local y reducen el olor de las heridas; emulsiones aceite en agua en vendajes de heridas que reclutan selectivamente los macrófagos.

13. Otros agentes de bioterapia

Se puede usar también terapia adyuvante conjuntamente con la presente invención. El uso de de agentes adyuvantes o inmunomoduladores incluyen, pero sin limitarse a ellos, el factor de necrosis tumoral, interferón alfa, beta, y gamma; IL-2 y otras citocinas; F42K y otros análogos de citocina; o MIP-1, MIP-1beta, MCP-1, RANTES, y otras quimiocinas.

F. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Se podrá apreciar por los expertos en la técnica que los métodos descritos en los ejemplos que siguen, representan métodos descubiertos por el inventor que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen los modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, a la luz de la presente descripción, apreciarán que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que están descritas y que todavía se puede obtener un resultado parecido o similar sin separarse del espíritu ni del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de geles de carbómero de la rhLF

Se prepararon geles de ácido poliacrílico o de carbómero de grado 980 (Carbopol 980) según la presente invención.

Se prepararon seis geles de rhLF de 30 gramos que tienen concentraciones teóricas de 0 %, 0,1 %, 0,3 %, 1 %, 2,5 %, y 8,5 %. Los geles tenían la fórmula general que se muestra en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Fórmula general de geles de rhLF

| | % (p/p) | Lote de 30 g (g) |
|--|-------------------|-------------------|
| Tampón de fosfato con rhLF** | 86,6700 | 26,00** |
| Carbopol 980 | 1,0000 | 0,30 |
| Edetato disódico, dihidrato, USP | 0,1000 | 0,03 |
| Fenoxietanol | 1,0000 | 0,30 |
| Glicerina, USP | 4,0000 | 1,20 |
| Propilenglicol, USP | 5,0000 | 1,50 |
| Dimeticona NF 350 centistokes | 0,4000 | 0,12 |
| Ácido cítrico, monohidrato granular, USP | 0,0956 | 0,03 |
| Hidróxido de sodio al 20 % | c.s.p. pH 6,5-7,5 | c.s.p. pH 6,5-7,6 |
| Agua purificada, USP | c.s.p. 100 % | c.s.p. 30 g |

** Véase el volumen total en la Tabla 2

Tabla 2. Volumen de tampón fosfato y de stock de rhLF usado para preparar los geles

| RHLF (% p/p) | Peso de rhLF en lote de 30 g (g) | Volumen de stock (ml)* | Volumen de tampón fosfato (ml) | **Volumen total añadido (ml) |
|--------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 26 | 26 |
| 0,1 | 0,03 | 0,3 | 25,7 | 26 |
| 0,3 | 0,09 | 0,39 | 25,1 | 26 |
| 1 | 0,3 | 3 | 23 | 26 |
| 2,5 | 0,75 | 7,5 | 18,5 | 26 |
| 8,5 | 2,55 | 25,5 | 0,5 | 26 |

**100 mg/ml de rhLF en tampón fosfato Lote # E01764-03L

5 Se mezclaron los geles en vasos de precipitados de acero inoxidable de 125 ml pre-pesados y se mezclaron utilizando un mezclador Caframo programable (Modelo BDC1850, Ontario, Canada). La velocidad de mezclado habitual fue de 600 rpm utilizando una varilla de agitación con paletas de 1,27 cm de diámetro. Se prepararon los geles añadiendo Carbopol 980 a tampón fosfato (fosfato de sodio monobásico monohidrato 6 mM, fosfato de sodio dibásico heptahidrato 9 mM, NaCl 50 mM, pH 7). El volumen de tampón fosfato utilizado para preparar el gel inicial se muestra en la 4ª columna (encabezada con "Volumen de tampón fosfato") de la Tabla 2. Una vez que se hubo hidratado completamente el Carbopol 980 (normalmente en 45 minutos), se añadieron la glicerina, el propilenglicol, y el fenoxietanol seguido por ácido cítrico y después edetato de disodio. Finalmente, se añadió la dimeticona. El pH de estos geles estaba en el intervalo de pH 3-3,5. En este punto, se añadió hidróxido de sodio al 20 % para subir el pH. Cuando el pH alcanzó aproximadamente 6, se añadió la rhLF (como se muestra en la Tabla 2, 3ª columna "Volumen de stock"). Se subió entonces el pH a 7. La única desviación con respecto al procedimiento anterior estuvo con el gel de rhLF al 8,5 % p/p. Puesto que el volumen de stock necesario era grande, se añadió el Carbopol 980 directamente a 26 ml de tampón fosfato que contenía la rhLF. De este modo, la rhLF en el gel al 8,5 % p/p estuvo expuesta a un pH de 3-3,5 durante un periodo de aproximadamente 30-45 minutos.

15 Se utilizó un Brookfield DV-III + reómetro para medir la viscosidad de los geles por triplicado (0,5 ml de cada gel). Las condiciones fueron: temperatura: 25 °C; tiempo de equilibrio: 5 min; velocidad de rotación: 1,7 RPM; tiempo de rotación: 5 min. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Viscosidad del gel

| Gel de rhLF | Rep 1 (cP) | Rep 2 (cP) | Rep 3 (cP) | Viscosidad media | SD | % RSD |
|-------------|------------|------------|------------|------------------|-----|-------|
| Placebo | 16634 | 16517 | 16751 | 16634 | 117 | 0,70 |
| 0,10 % | 13190 | 13132 | 13482 | 13268 | 188 | 1,41 |
| 0,30 % | 16459 | 16400 | 16634 | 16498 | 122 | 0,74 |
| 1,00 % | 17509 | 17334 | 17626 | 17490 | 147 | 0,84 |
| 2,50 % | 19494 | 19611 | 19669 | 19591 | 89 | 0,46 |
| 8,50 % | 45641 | 45758 | 44240 | 45213 | 845 | 1,87 |

Para la curva estándar, se prepararon patrones de rhLF de 1,563-25 µg/ml diluyendo el stock de rhLF de 100 mg/ml (lote# E01764-03L) en agua desionizada (DI). Se tomaron todas las muestras activas de la parte superior, del medio y del fondo de tubos rígidos de aluminio de 3 ml y se prepararon a una concentración teórica de aproximadamente 10 µg/ml de rhLF en agua desionizada. Todos los geles activos cumplieron la especificación de uniformidad de contenido (+/-10 %).

Ejemplo 2

Biodisponibilidad de la rhLF a partir de los geles de carbómero en heridas abiertas de espesor completo

Se utilizaron cinco grupos de tres ratones machos ICR (con un peso de 22 ± 2 gramos). Bajo anestesia con hexobarbital (90 mg/Kg, IP), se afeitó la región de los hombros y la espalda. Se utilizó un sacabocados agudo (12 mm de diámetro interno) para separar la piel incluyendo el *panniculus carnosus* y los tejidos adherentes.

Se aplicaron inmediatamente después de la lesión una dosis baja y una dosis alta de lactoferrina humana recombinante (rhLF) administrada tópicamente (formulación de gel de carbopol-980) o una dosis administrada intravenosamente (solución líquida), como se indica en la Tabla 4. Las dosis de rhLF se administraron a los ratones de 20 gramos inmediatamente después de las lesiones. Se utilizaron las siguientes dosis: (1) placebo, 0,04 ml/ratón, tópico; (2) 50 mg/Kg, 0,04 ml de un gel al 2,5 %; (3) 170 mg/Kg, 0,04 ml de un gel al 8,5 %. Se sacrificaron tres animales (un macho y dos hembras) a los 0, 15, 30, 60, 120, y 240 minutos después de la aplicación del compuesto de ensayo. Se desangraron los animales sacrificados; se anticoaguló la sangre utilizando EDTA, se separó el plasma de la sangre con EDTA, y se congelaron rápidamente las muestras y se conservaron a -80.

Tabla 4: Biodisponibilidad de la rhLF – Diseño experimental y métodos

| Tratamiento | Vía | Dosis | Sexo | Preparación del plasma, minutos después del tratamiento | | | | | | | |
|-----------------------------------|---------|---------------|------|---|----|----|----|----|-----|-----|----|
| | | | | 0 | 5 | 15 | 30 | 60 | 120 | 240 | |
| Ninguno | Ninguna | 0 | M | A1 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | | | H | A1 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| | | | H | A1 | -- | -- | -- | -- | -- | -- | -- |
| Vehículo (gel placebo) | TOP | 0,04 ml/ratón | M | -- | B1 | -- | -- | B2 | B3 | -- | -- |
| | | | H | -- | B1 | -- | -- | B2 | B3 | -- | -- |
| | | | H | -- | B1 | -- | -- | B2 | B3 | -- | -- |
| PT# 1028377 (AGX-6) (gel de rhLF) | TOP | 50 mg/kg | M-- | -- | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | |
| | | | H | -- | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | |
| | | | H | -- | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | |
| | TOP | 170 mg/kg | M-- | -- | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | |
| | | | H | -- | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | |
| | | | H | -- | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | |
| PT# 1023296-ADD (AGX-1) (rhLF) | IV | 5 mg/kg | M-- | -- | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | |
| | | | H | -- | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | |
| | | | H | -- | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 | |

Se determinaron las concentraciones de rhLF en plasma utilizando el kit de Lacto F EIA BIOXITECH® de OXIS Health Products, Inc, siguiendo las instrucciones dadas por el fabricante. Se obtuvieron los resultados midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm.

Se calculó el pico de concentración en plasma alcanzado con respecto a los picos de las concentraciones plasmáticas de rhLF después de la administración IV. El pico de concentración de rhLF ajustada a la dosis después de la aplicación tópica del gel sobre heridas abiertas de espesor completo a dosis de 50 mg/Kg (151 ng/ml) y 170 mg/Kg (75,1 ng/ml) fue menor que el 0,5 % del pico de concentración normalizada después de 5 mg/kg IV de rhLF (92.455,1 ng/ml) (véase la Tabla 5). La biodisponibilidad total en plasma, calculada por el área media bajo la curva de concentración (AUC) normalizada a 170 mg/Kg, de la permanencia de la rhLF en plasma con la dosis de gel tópico de 50 mg/Kg fue de 18,4 µg.min/ml, indicando una biodisponibilidad sistémica absoluta de menos del 0,5 %. El AUC para la dosis de gel tópico de 170 mg/Kg fue de 9,6 µg.min/ml, correspondiente también a un valor de biodisponibilidad sistémica absoluta de menos del 0,5 % (véase la Tabla 5).

Tabla 5: Farmacocinética de la rhLF aplicada tópicamente a heridas abiertas en ratones

| | Dosis bajas de gel tópico (50 mg/kg) | Dosis altas de gel tópico (170 mg/kg) | Solución intravenosa de rhLF (5 mg/kg) |
|---|---|--|---|
| Pico de concentración plasmática (ng/mL) | 44 | 75 | 2,719 |
| Tiempo alcanzado (min) | 60 | 60 | 5 |
| Cantidad-normalizada* (ng/mL) | 151 | 75 | 92,456 |
| % normalizado de IV | 0,2 % | 0,1 % | NA |
| AUC (µg.min/mL) | 5,4 | 9,6 | 152 |
| AUC-N (µg.min/mL)** | 18,4 | 9,6 | 5,174 |
| Biodisponibilidad absoluta | 0,4 % | 0,2 % | NA |
| *Valores normalizados a 170 mg/kg | | | |
| **AUC calculada con valores normalizados a 170 mg/kg. | | | |

Ejemplo 3

Eficacia de los geles de carbopol de la rhLF en experimentos de cicatrización de las heridas

5 Los geles de carbopolímero de rhLF se aplicaron a concentraciones de 2,5 % y 8,5 % directamente a heridas abiertas de espesor completo en ratones normales y en ratones diabéticos db/db. Los ratones diabéticos (db/db) expresan niveles más bajos de varios factores de crecimiento y receptores, que explican, al menos en parte, la reducción de la velocidad de cicatrización.

10 Se anestesiaron los ratones, se afeitó la región de los hombros y la espalda de cada animal, y se utilizó un sacabocados agudo (12 mm de diámetro interno) para separar la piel incluyendo el *panniculus carnosus* y los tejidos adherentes (heridas abiertas de espesor completo). Se aplicaron tópicamente diferentes dosis de rhLF a las heridas (0,02 ml por herida) una vez al día durante 11 días para los ratones normales o durante 20 días para los ratones diabéticos db/db para comparar las velocidades de cicatrización con las de los controles negativos. El control negativo fue gel de placebo. A varios puntos de tiempo, el área de la herida fue inspeccionada sobre un plástico transparente y medida con un analizador de imágenes. Se evaluó la incidencia de los animales que alcanzan el 75 % de cierre de las heridas y se compararon las diferencias utilizando el test exacto de Fisher. Las diferencias fueron consideradas de significancia estadística a niveles de $p < 0,05$. El tiempo calculado para el 50 % de cierre de las heridas (CT-50) se midió mediante ecuaciones polinómicas (de segundo orden) y las diferencias se evaluaron con el test t de Student en cuanto a la significancia.

20 La FIG. 1 muestra geles de rhLF que varían de 0,1 % a 8,5 % que median en una mejora de la incidencia del 75 % de cierre de las heridas, de un 77 % en los ratones normales el día 12 ($p < 0,0$) y de un 66 % en los ratones diabéticos db/db el día 15 ($p < 0,05$). La Tabla 6 que sigue presenta valores individuales a cada concentración para los ratones normales en términos de incidencia del 75 % de cierre de las heridas y el tiempo calculado para el 50 % de cierre de las heridas (CT-50).

Tabla 6: Un amplio intervalo de concentraciones de gel de rhLF acelera la cicatrización de las heridas en ratones normales

| Tratamiento | n | Incidencia del 75% el día 12 | | % de cicatrización el día 12 | CT50 (días) |
|------------------------|---|------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|
| | | Número de animales | Porcentaje (%) | | |
| Gel placebo | 7 | 1 | 14 | 65,8 | 7,1 |
| Gel al 0,1 % (0,02 mg) | 7 | 7 | 100 ($p = 0,0047$) | 90,6 ($p < 0,0001$) | 4,4 ($p = 0,0079$) |
| Gel al 0,3 % (0,06) | 7 | 6 | 86 ($p = 0,0291$) | 86,5 ($p = 0,001$) | 3,9 ($p = 0,0507$) |
| Gel al 1,0 % (0,2 mg) | 7 | 5 | 71 ($p = 0,1026$) | 88,6 ($p = 0,001$) | 4,6 ($p = 0,0392$) |
| Gel al 2,5 % (0,5) | 7 | 7 | 100 ($p = 0,0047$) | 90,3 ($p < 0,0001$) | 4,4 ($p = 0,0148$) |
| Gel al 8,5 % (1,7) | 7 | 7 | 100 ($p = 0,0047$) | 93,2 ($p < 0,0001$) | 3,5 ($p = 0,0024$) |

25 Basándose en estos resultados, se prevé que la lactoferrina tópica, oral, o parenteral produce la destrucción de las bacterias que infectan una herida, la estimulación de IL-18, IL-12, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , o IFN- γ , y la inhibición de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , o las metaloproteinasas de la matriz. Se prevé además que la IL-18 o GM-

CSF estimulan la producción o la actividad de las células inmunitarias y de las células implicadas en la reparación de la herida, y que el TNF-alfa inhibe las células implicadas en la inflamación.

Ejemplo 4

Evolución de la cicatrización de las heridas por rhLF, CGS-21680, y Regranex™ en ratones normales

5 Se anestesiaron grupos de 7 ratones machos ICR, se afeitó la región de los hombros y la espalda de cada animal, y se utilizó un sacabocados agudo (12 mm de diámetro interno) para separar la piel incluyendo el *panniculus carnosus* y los tejidos adherentes. El área de la herida inspeccionada sobre hojas de plástico transparente los días 3, 5, 7, 9 y 11 o 12, se cuantificó con un analizador de imágenes.

10 Se aplicaron tópicamente solución de rhLF, vehículo (tampón), o un control positivo (RhPDGF) inmediatamente después de la lesión y después una vez al día durante un total de 10 u 11 días consecutivos. Se aplicó el test de Student para muestras no pareadas para comparación entre el grupo tratado y el grupo con vehículo en cada punto de tiempo de medida. Las diferencias fueron consideradas de significancia estadística a $p < 0,05$. Se utilizó RhPDGF (factor-BB de crecimiento recombinante humano derivado de las plaquetas, Regranex™, becaplermina), que es actualmente el único tratamiento biológico disponible en el mercado para heridas crónicas (úlceras neuropáticas diabéticas), como control positivo a la concentración aprobada de 100 microgramos/gramo (0,01 %). El CGS-21680 es un agonista del receptor A2A de adenosina que se utilizó también como control positivo puesto que había sido previamente descrito como muy eficaz para estimular la cicatrización de las heridas y de hecho para promover una cicatrización de las heridas más rápida que el Regranex™.

20 La FIG. 2A indica que la rhLF ejerció un efecto de cicatrización comparable al de CGS-21680, lo que da a entender que la rhLF promueve una cicatrización de la herida más rápida que Regranex™ (rhPDGF, becaplermina). La FIG. 2B confirma que la rhLF promueve una mayor extensión de cicatrización de las heridas comparada con Regranex™.

25 Basándose en estos resultados, se prevé que la lactoferrina tópica, oral, o parenteral produce la destrucción de las bacterias que infectan una herida, la estimulación de IL-18, IL-12, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α o IFN- γ , y la inhibición de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , o las metaloproteinasas de la matriz. Se prevé además que la IL-18 o GM-CSF estimulan la producción o la actividad de las células inmunitarias y de las células implicadas en la reparación de la herida, y que el TNF-alfa inhibe las células implicadas en la inflamación.

Ejemplo 5

Eficacia de la solución tópica de rhLF frente a Regranex™ en experimentos de cicatrización de las heridas

30 Se anestesiaron los ratones, se afeitó la región de los hombros y la espalda de cada animal, y se utilizó un sacabocados agudo (12 mm de diámetro interno) para separar la piel incluyendo el *panniculus carnosus* y los tejidos adherentes (heridas abiertas de espesor completo). Se aplicaron tópicamente diferentes dosis de rhLF a las heridas (0,02 ml por herida) una vez al día durante 11 días para los ratones normales o durante 20 días para los ratones diabéticos db/db para comparar las velocidades de cicatrización con las de los controles negativos y positivos. El control negativo o placebo fue el vehículo de rhLF (una solución de PBS). El control positivo fue RhPDGF (factor-BB de crecimiento recombinante humano derivado de las plaquetas, Regranex™, becaplermina), usado a la concentración aprobada de 100 microgramos/gramo (0,01 %).

35 El RhPDGF (factor-BB de crecimiento recombinante humano derivado de las plaquetas, Regranex™, becaplermina), un fármaco aprobado para el tratamiento de úlceras diabéticas crónicas, se utilizó como un control positivo a la concentración aprobada de 100 microgramos/gramo (0,01 %). A varios puntos de tiempo, el área de la herida fue inspeccionada sobre un plástico transparente y medida con un analizador de imágenes. Se evaluó la incidencia de los animales que alcanzan el 75 % de cierre de las heridas y se compararon las diferencias utilizando el test exacto de Fisher. Las diferencias fueron consideradas de significancia estadística a niveles de $p < 0,05$.

40 La FIG. 3 presenta los datos reunidos de 5 experimentos, que demuestran la eficacia superior de rhLF comparada con Regranex™ para la reparación de las heridas a dosis que varían de 0,1 % a 10 %. Los animales tratados con rhLF al 0,1 %-10 % (147 animales) tuvieron un aumento del 34 % en la incidencia del 75 % de cierre de las heridas el día final del experimento con respecto al placebo (42 animales, $p < 0,0001$) y un aumento del 32 % con respecto al Regranex™ (21 animales, $p < 0,001$). En los ratones sanos, la rhLF al 1 % aumentó significativamente ($p < 0,01$) este parámetro con respecto al placebo un 38 % y con respecto a la becaplermina (Regranex™) un 36 % ($p < 0,01$). En los ratones diabéticos db/db con la función de reparación de las heridas alterada, el gel de rhLF al 1 % aumentó la incidencia del 75 % de cierre de las heridas el día 15 en un 83 % sobre el placebo ($p < 0,01$).

50 Basándose en estos resultados, se prevé que la lactoferrina tópica, oral, o parenteral produce la destrucción de las bacterias que infectan una herida, la estimulación de IL-18, IL-12, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α o IFN- γ , y la inhibición de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , o las metaloproteinasas de la matriz. Se prevé además que la IL-18 o GM-CSF estimulan la producción o la actividad de las células inmunitarias y de las células implicadas en la reparación de la herida, y que el TNF-alfa inhibe las células implicadas en la inflamación.

55

Ejemplo 6

Eficacia de la rhLF oral en experimentos de cicatrización de las heridas

Se anestesiaron los ratones, se afeitó la región de los hombros y la espalda de cada animal, y se utilizó un sacabocados agudo (12 mm de diámetro interno) para separar la piel incluyendo el *panniculus carnosus* y los tejidos adherentes. Se aplicaron tópicamente diferentes dosis de rhLF a las heridas una vez al día durante 11 días para los ratones normales o durante 20 días para los ratones diabéticos db/db para comparar las velocidades de cicatrización con las de los controles negativos. El control negativo o placebo fue el vehículo de la rhLF (una solución de PBS). A varios puntos de tiempo, el área de la herida fue inspeccionada sobre un plástico transparente y medida con un analizador de imágenes. Se evaluó la incidencia de los animales que alcanzan el 75 % o el 100 % de cierre de las heridas y se compararon las diferencias utilizando el test exacto de Fisher. Las diferencias fueron consideradas de significancia estadística a niveles de $p < 0,05$.

A varios puntos de tiempo, el área de la herida fue inspeccionada sobre un plástico transparente y medida con un analizador de imágenes. Se evaluó la incidencia de los animales que alcanzan el 75 % de cierre de las heridas los días 9-12 para los ratones normales y los días 15 o 19 para los ratones diabéticos, y se compararon las diferencias utilizando el test exacto de Fisher. Las diferencias fueron consideradas de significancia estadística a niveles de $p < 0,05$.

La FIG. 4A muestra que la rhLF oral administrada a los ratones sanos a dosis que varían de 0,5 a 4,5 mg/Kg produjo una mejora del 43 % en la incidencia del 75 % de cierre de las heridas comparada con el placebo oral, presentando la dosis más alta una mejora del 52 % ($p < 0,01$). La FIG. 4B muestra que la rhLF oral administrada a los ratones diabéticos db/db a dosis de 4,5 a 65 mg/Kg de rhLF aumentó la incidencia del 75 % de cierre de las heridas el día 15 en un 75 % sobre el placebo alcanzando con la dosis más alta ensayada un aumento del 83 % sobre el placebo ($p < 0,01$). Similarmente, la FIG. 4C indica que dosis de 4,5 a 65 mg/Kg de rhLF oral a los ratones diabéticos db/db alcanzó un 75 % de aumento en la incidencia del 100 % de cierre de las heridas el día 19, alcanzándose con la dosis más alta un aumento del 100 % comparado con el placebo ($p < 0,01$).

Basándose en estos resultados, se prevé que la lactoferrina tópica, oral, o parenteral produce la destrucción de las bacterias que infectan una herida, la estimulación de IL-18, IL-12, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α o IFN- γ , y la inhibición de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , o las metaloproteinasas de la matriz. Se prevé además que la IL-18 o GM-CSF estimulan la producción o la actividad de las células inmunitarias y de las células implicadas en la reparación de la herida, y que el TNF-alfa inhibe las células implicadas en la inflamación.

Ejemplo 7

Experimento de cicatrización de las heridas con rhLF tópica y oral en heridas infectadas

Se analizó la eficacia de la rhLF tópica en heridas infectadas con bacterias. Este modelo animal representa una situación clínicamente relevante puesto que los diabéticos tienen a menudo úlceras infectadas y se cree que tal infección contribuye a la deficiencia en la reparación de la herida. El *Staphylococcus aureus* es una de las bacterias más comunes que infectan la úlcera del pie diabético y se asocia con un aumento de la tasa de mortalidad.

Se anestesiaron grupos de 7 ratones machos ICR, se afeitó la región de los hombros y la espalda de cada animal, y se utilizó un sacabocados agudo (12 mm de diámetro interno) para separar la piel incluyendo el *panniculus carnosus* y los tejidos adherentes. Inmediatamente después de la punción, se aplicaron a la región herida de cada animal, $9,6 \times 10^5$ CFU/0,02 ml/ratón de *Staphylococcus aureus* (Smith). El área de la herida inspeccionada sobre hojas de plástico transparente los días 3, 5, 7, 9 y 12, se cuantificó con un analizador de imágenes.

Se aplicaron rhLF tópica, rhLF oral, vehículo (tampón), o un control positivo (Regranex™ al 0,01 %) inmediatamente después de la lesión y las bacterias, y después una vez al día durante un total de 11 días consecutivos. Para la lactoferrina aplicada oralmente, los ratones recibieron 0,130 ml de la solución de rhLF mediante sonda gástrica (alimentando directamente al animal con un tubo flexible). Se evaluó la incidencia de los animales que alcanzan el 75 % de cierre de las heridas y se compararon las diferencias utilizando el test exacto de Fisher. Las diferencias fueron consideradas de significancia estadística a niveles de $p < 0,05$.

La FIG. 5A y la FIG. 5B muestran que la rhLF tópica aumentó la incidencia del 75 % de cierre en un 86 % con respecto al placebo ($p < 0,01$) y un 71 % con respecto a Regranex™ ($p < 0,05$). La FIG. 5B muestra que la rhLF oral mejoró la incidencia del 75 % de cierre en un 72 % con respecto al placebo ($p < 0,05$).

Basándose en estos resultados, se prevé que la lactoferrina tópica, oral, o parenteral produce la destrucción de las bacterias que infectan una herida, la estimulación de IL-18, IL-12, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α o IFN- γ , y la inhibición de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α , o las metaloproteinasas de la matriz. Se prevé además que la IL-18 o GM-CSF estimulan la producción o la actividad de las células inmunitarias y de las células implicadas en la reparación de la herida, y que el TNF-alfa inhibe las células implicadas en la inflamación.

Ejemplo 8

Determinación de la mejor dosis de rhLF tópica

- 5 Se usa el protocolo experimental del Ejemplo 5 para determinar la dosis oral más baja de rhLF que promueve la cicatrización de las heridas en los ratones. Se ensayan sistemáticamente dosis más pequeñas de rhLF hasta que no se observa ningún efecto de reparación de la herida. Se añade EDTA en un intento de aumentar la potencia de rhLF y disminuir además la dosis de rhLF que es eficaz. Se usa el vehículo tópico como control negativo.

Ejemplo 9

Determinación de la mejor dosis de rhLF oral

- 10 Se usa el protocolo experimental del Ejemplo 5 para determinar la dosis oral más baja de rhLF que promueve la cicatrización de las heridas en los ratones. Se ensayan sistemáticamente dosis más pequeñas de rhLF hasta que no se observa ningún efecto de reparación de la herida. Se añade EDTA en un intento de aumentar la potencia de rhLF y disminuir además la dosis de rhLF que es eficaz. Se usa el vehículo oral como control negativo.

Ejemplo 10

Estudio de combinación

- 15 Se usa el protocolo experimental del Ejemplo 5 para determinar la velocidad de cicatrización de las heridas en los ratones. Se ensayan combinaciones de rhLF oral con rhLF tópica y de rhLF oral con Regranex™ tópico con y sin EDTA. El vehículo oral más el gel placebo, y el vehículo oral más Regranex™ son los controles negativo y positivo, respectivamente. La rhLF oral más el gel placebo, y el vehículo oral más la rhLF tópica son los controles de sinergia.

Ejemplo 11

- 20 Comparación de la eficacia del gel de RhLF y formulaciones de solución salina en heridas cubiertas con apósitos

- 25 Se usa el protocolo experimental del Ejemplo 5 para determinar la velocidad de cicatrización de las heridas en los ratones. Se aplican a la herida formulaciones líquidas de rhLF, 0,2 mg/ml (0,02 ml de una solución de 10 mg/ml). Se cubre entonces el área de la herida con un apósito de gasa humedecida con solución salina. Se repite este proceso diariamente durante 10 días. Se aplican directamente a las heridas 0,2 mg de gel de rhLF [0,020 mL de un gel de 10 mg/ml] y se cubren con un apósito, diariamente, durante 10 días. Se aplican 0,02 ml de solución de rhLF, vehículo y gel placebo a las heridas y se cubren con un apósito, diariamente, durante 10 días. Regranex™ es el control positivo y se aplica tópicamente, 0,02 ml (concentración clínica de 100 µg/ml), de forma similar.

Ejemplo 12

Eficacia de diferentes regímenes de aplicación del gel de rhLF y apósitos

- 30 Se usa el protocolo experimental del Ejemplo 5 para determinar la velocidad de cicatrización de las heridas en los ratones. Se aplican directamente a las heridas 0,2 mg del gel de rhLF [0,020 mL de un gel a 10 mg/ml] y se cubren con un apósito de gasa humedecida con solución salina, diariamente, durante 10 días. En otro grupo de ratones se cambia el apósito en días alternos. En un tercer grupo, se aplica Regranex™: gel de rhLF a la herida y se cubre con un apósito. Después de 12 horas, se lava la úlcera suavemente con solución salina o con agua para separar el gel residual, y se cubre la herida con un apósito nuevo durante 12 horas adicionales. El gel placebo, 0,02 ml y Regranex™, 0,02 ml (100 µg/ml), son los controles negativo y positivo, respectivamente, y se aplican utilizando el último régimen.
- 35

Ejemplo 13

Gel de rhLF: Comparación de una vez al día a dos veces al día

- 40 Se usa el protocolo experimental del Ejemplo 5 para determinar la velocidad de cicatrización de las heridas en los ratones. Se aplica directamente a las heridas diariamente, durante 10 días, gel de rhLF a 0,2 mg/herida/día [0,020 mL de un gel a 10 mg/ml]. A un segundo grupo de animales, se aplica 0,1 mg dos veces al día (BID), separada cada aplicación por un intervalo de 12 horas. El gel placebo, 0,02 ml y el Regranex™, 0,02 ml (100 µg/ml), aplicados una vez al día, son los controles negativo y positivo, respectivamente.

Ejemplo 14

Eficacia de la rhLF tópica sola o en combinación con Regranex™

- 50 Se usa el protocolo experimental del Ejemplo 5 para determinar la velocidad de cicatrización de las heridas en los ratones. Se aplica directamente a las heridas diariamente, durante 10 días, gel de rhLF a 0,2 mg/herida/día [0,020 mL de un gel a 10 mg/ml]. Un segundo grupo de ratones recibe rhLF a 0,2 mg/herida y Regranex™ a 2 µg/herida (0,02 ml/herida, 100 µg/ml). Un tercer grupo recibe rhLF a 0,02 mg/herida y el Regranex™ a 0,002 µg/herida para

ensayar sinergias potenciales. El gel placebo, 0,02 ml, el placebo más Regranex™, 0,02 ml (100 µg/ml), y el Regranex™ solo, son los controles negativo, de sinergia, y positivo, respectivamente.

Ejemplo 15

Escalado de dosis, ensayo farmacocinético y farmacodinámico de rhLF tópica en pacientes con úlceras diabéticas

- 5 Este es un estudio de escalado de dosis de Fase I/II de 14 días en seres humanos diseñado para evaluar los regímenes de escalado de dosis de gel tópico de rhLF en pacientes con úlceras diabéticas crónicas y para determinar la dosis máxima tolerada (si la hubiere) para una concentración del 1 % hasta 8,5 % de rhLF. Se evalúa la rhLF en cuanto a su capacidad para promover la cicatrización de las úlceras.

Ejemplo 16

- 10 Escalado de dosis, ensayo farmacocinético y farmacodinámico de rhLF oral en pacientes con úlceras diabéticas

El diseño del estudio es similar al del Ejemplo 14, excepto que la rhLF se aplica oralmente con y sin EDTA.

Ejemplo 17

Ensayo de rhLF frente a placebo y frente al cuidado convencional en pacientes con úlceras diabéticas

- 15 Este es un estudio multicéntrico, aleatorio, doble ciego, controlado con placebo, en humanos. Es un ensayo clínico de fase II de 12 semanas en pacientes con úlceras diabéticas para evaluar la eficacia del tratamiento con dos niveles de dosis de una administración tópica u oral de rhLF en comparación con placebo, con Regranex™, y con el cuidado convencional solo. Se evalúa la eficacia por la incidencia de cierre parcial y completo de las heridas, y el tiempo para cicatrizar.

Ejemplo 18

- 20 Liberación de rhLF a partir de los geles de carbómero

Los geles de RhLF-Carbopol-980 a varias concentraciones se analizan en cuanto a la cinética de liberación de rhLF con el tiempo a partir de la forma farmacéutica y se detectan en un tampón receptor en un sistema de difusión *in vitro*.

Ejemplo 19

- 25 Estudios adicionales de geles de rhLF-polímero vinílico

Se preparan geles que contienen rhLF basados en polímeros de ácido polimetacrílico, polivinil-pirrolidona y alcohol polivinílico. Se determina la viscosidad de los geles mediante un Brookfield DV-III + reómetro y se mide la uniformidad de contenido de proteína utilizando el ensayo BCA, como se describe en el Ejemplo 1. Se evalúa la biodisponibilidad después de la aplicación de estos geles de polímero de vinilo sobre heridas abiertas de espesor completo en ratones normales, como se describe en el Ejemplo 2. Se analiza la eficacia de la actividad de cicatrización de las heridas de estas formulaciones de gel de polímero de vinilo en un modelo de ratón como se describe en los ejemplos 3-5. Se analizan varias concentraciones de estos geles de polímero de vinilo en cuanto a la cinética de liberación de rhLF con el tiempo a partir de la forma farmacéutica y se detectan en un tampón receptor en un sistema de difusión *in vitro*.

- 35 **Ejemplo 20**

Estudios de geles de rhLF-polímero de tipo polisacárido

Se preparan formulaciones de gel de rhLF-polímero de tipo polisacárido. Se determina la viscosidad de los geles mediante un Brookfield DV-III + reómetro y se mide la uniformidad de contenido de proteína utilizando el ensayo BCA, como se describe en el Ejemplo 1. Se evalúa la biodisponibilidad después de la aplicación de los geles de polímero de tipo polisacárido sobre heridas abiertas de espesor completo en ratones normales, como se describe en el Ejemplo 2. Se analiza la eficacia de la actividad de cicatrización de las heridas de las formulaciones de gel de polímero de tipo polisacárido en un modelo de ratón como se describe en los ejemplos 3-5. Se analizan varias concentraciones de los geles de polímero de tipo polisacárido en cuanto a la cinética de liberación de rhLF con el tiempo a partir de la forma farmacéutica y se detectan en un tampón receptor en un sistema de difusión *in vitro*.

- 45 **Ejemplo 21**

Estudios de geles de rhLF-polímero de tipo glucosaminoglucano

Se preparan formulaciones de gel de rhLF-polímero de tipo glucosaminoglucano. Se determina la viscosidad de los geles mediante un Brookfield DV-III + reómetro y se mide la uniformidad de contenido de proteína utilizando el ensayo BCA, como se describe en el Ejemplo 1. Se evalúa la biodisponibilidad después de la aplicación de estos

geles de polímero de tipo glucosaminoglucano sobre heridas abiertas de espesor completo en ratones normales, como se describe en el Ejemplo 2. Se analiza la eficacia de la actividad de cicatrización de las heridas de las formulaciones de gel de polímero de tipo glucosaminoglucano en un modelo de ratón como se describe en los ejemplos 3-5. Se analizan varias concentraciones de los geles de polímero de tipo glucosaminoglucano en cuanto a la cinética de liberación de rhLF con el tiempo a partir de la forma farmacéutica y se detectan en un tampón receptor en un sistema de difusión *in vitro*.

Ejemplo 22

Estudios de geles de rhLF-polímero de tipo proteína

Se preparan formulaciones de gel de rhLF-polímero de tipo proteína. Se determina la viscosidad de los geles mediante un Brookfield DV-III + reómetro y se mide la uniformidad de contenido de proteína utilizando el ensayo BCA, como se describe en el Ejemplo 1. Se evalúa la biodisponibilidad después de la aplicación de estos geles de polímero de tipo proteína sobre heridas abiertas de espesor completo en ratones normales, como se describe en el Ejemplo 2. Se analiza la eficacia de la actividad de cicatrización de las heridas de las formulaciones de gel de polímero de tipo proteína en un modelo de ratón como se describe en los ejemplos 3-5. Se analizan varias concentraciones de los geles de polímero de tipo proteína en cuanto a la cinética de liberación de rhLF con el tiempo a partir de la forma farmacéutica y se detectan en un tampón receptor en un sistema de difusión *in vitro*.

Ejemplo 23

Estudios de geles de rhLF-polímero de tipo plurónico

Se preparan formulaciones de gel de rhLF-polímero de tipo plurónico. Se determina la viscosidad de los geles mediante un Brookfield DV-III + reómetro y se mide la uniformidad de contenido de proteína utilizando el ensayo BCA, como se describe en el Ejemplo 1. Se evalúa la biodisponibilidad después de la aplicación de estos geles de polímero de tipo plurónico sobre heridas abiertas de espesor completo en ratones normales, como se describe en el Ejemplo 2. Se analiza la eficacia de la actividad de cicatrización de las heridas de las formulaciones de gel de polímero de tipo plurónico en un modelo de ratón como se describe en los ejemplos 3-5. Se analizan varias concentraciones de los geles de polímero de tipo plurónico en cuanto a la cinética de liberación de rhLF con el tiempo a partir de la forma farmacéutica y se detectan en un tampón receptor en un sistema de difusión *in vitro*.

Ejemplo 24

Estudios de geles de rhLF-polímero de acrilamida

Se preparan formulaciones de gel de rhLF-polímero de acrilamida. Se determina la viscosidad de los geles mediante un Brookfield DV-III + reómetro y se mide la uniformidad de contenido de proteína utilizando el ensayo BCA, como se describe en el Ejemplo 1. Se evalúa la biodisponibilidad después de la aplicación de estos geles de polímero de acrilamida sobre heridas abiertas de espesor completo en ratones normales, como se describe en el Ejemplo 2. Se analiza la eficacia de la actividad de cicatrización de las heridas de las formulaciones de gel de polímero de acrilamida en un modelo de ratón como se describe en los ejemplos 3-5. Se analizan varias concentraciones de los geles de polímero de acrilamida en cuanto a la cinética de liberación de rhLF con el tiempo a partir de la forma farmacéutica y se detectan en un tampón receptor en un sistema de difusión *in vitro*.

Ejemplo 25

Velocidades de cicatrización de las heridas con preparaciones de rhLF que difieren en la proporción de truncados N-1

Se comparó la actividad biológica de preparaciones de rhLF que difieren en el porcentaje de truncados N-1 utilizando un modelo de ratón de cicatrización de las heridas. Se anestesiaron grupos de siete ratones, se afeitó la región de los hombros y la espalda de cada animal, y se utilizó un sacabocados agudo (12 mm de diámetro interno) para separar la piel incluyendo el *panniculus carnosus* y los tejidos adherentes (heridas abiertas, de espesor completo). Se aplicaron tópicamente o rhLF (20 microgramos por ratón) o placebo a las heridas una vez al día durante 11 días. A varios puntos de tiempo, el área de la herida fue inspeccionada sobre un plástico transparente y medida con un analizador de imágenes. Se evaluó el CT50 (tiempo para el 50 % de cierre). (Experimentos AN-W2, W3, W9).

Como se muestra en la Tabla 7, las preparaciones de rhLF que contienen proteína completamente intacta así como las que contienen truncados N-1 que varían de 27 % a 42 % demostraron todas una eficacia con respecto a sus placebos respectivos que fue estadísticamente significativa. El porcentaje de mejora entre lotes fue comparable y estadísticamente indistinguible.

Tabla 7. Velocidades de cicatrización de las heridas con tres preparaciones diferentes de rhLF

| Preparación de rhLF | CT50 (Activo/ Placebo) | Porcentaje de mejora | Porcentaje de truncados N-1 |
|---------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 7001 | 4,8/5,9 días | 19 % | 0 % |
| L005 | 6,0/7,6 días | 21 % | 27 % |
| L007 | 5,3/6,4 días | 17 % | 42 % |

Ejemplo 26

Incidencia de cierre de las heridas con preparaciones de rhLF que difieren en la proporción de truncados N-1

- 5 En los experimentos descritos en el Ejemplo 25, se midió la incidencia del 80 % de cierre de las heridas en ratones tratados con placebo o con rhLF. El aumento absoluto de la incidencia del 80 % de cierre de las heridas en animales tratados con rhLF con respecto a los animales tratados con placebo en el mismo experimento, se determinó el día 9 (7001 y L007) o el día 12 (L005).

- 10 Como se muestra en la Tabla 8, las preparaciones de rhLF que contienen proteína completamente intacta así como las que contienen truncados N-1 que varían de 27 % a 42 % demostraron todas una eficacia con un aumento de cierre de las heridas que fue estadísticamente significativo con respecto a sus placebos respectivos.

Tabla 8. Incidencia de cierre de las heridas con tres preparaciones diferentes de rhLF

| Preparación de rhLF | 80 % de cierre (Activo/ Placebo) | Porcentaje de mejora | Porcentaje de truncados N-1 |
|---------------------|----------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| 7001 | 86 %/57 % | 29 % | 0 % |
| L005 | 43 %/0 % | 43 % | 27 % |
| L007 | 43 %/0 % | 43 % | 42 % |

Referencias citadas

- 15 Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

- 20 Patente de Estados Unidos No. 4.554.101
 Patente de Estados Unidos No. 5.220.007
 Patente de Estados Unidos No. 5.284.760
 Patente de Estados Unidos No. 5.354.670
 Patente de Estados Unidos No. 5.366.878
 Patente de Estados Unidos No. 5.389.514
 Patente de Estados Unidos No. 5.571.691
 Patente de Estados Unidos No. 5.571.697
 Patente de Estados Unidos No. 5.571.896
 25 Patente de Estados Unidos No. 5.629.001
 Patente de Estados Unidos No. 5.635.377
 Patente de Estados Unidos No. 5.789.166
 Patente de Estados Unidos No. 5.919.913
 Patente de Estados Unidos No. 6.066.469
 30 Patente de Estados Unidos No. 6.080.559
 Patente de Estados Unidos No. 6.100.054
 Patente de Estados Unidos No. 6.277.817
 Patente de Estados Unidos No. 6.228.614
 Patente de Estados Unidos No. 6.333.311
 35 Patente de Estados Unidos No. 6.455.687
 Edmonds M, *et al.*, Diabetes Metab Res Rev. 2000; 16 (Suppl 1): S51-S54.
 Kuhara T, *et al.*, Nutr Cancer. 2000, 38(2):192-9.
 Lipsky B A and Berendt R A, Diabetes Metab Res Rev. 2000; 16(Suppl 1): S42-S46.
 Mandracchia V J, *et al.*, Clin Pod Med Surg. 2001; 18: 189-209.
 40 Montesinos M C, *et al.*, J Exp Med. 1997; 186:1615-1620.

Moulin V, *et al.*, Cell Mol. Biol. 1998; 44: 961-971.
Weiman J T. Am J Surg. 1998; 176 (Suppl 2A): 74S-79S.
Victor-Vega C, *et al.*, Inflammation. 2002; 26: 19-24.

5 Aunque la presente invención y sus ventajas han sido descritas en detalle, se debe entender que se pueden hacer diferentes cambios, sustituciones y alteraciones sin separarse de la invención que se define por las reivindicaciones adjuntas. Además, el alcance de la presente solicitud no se pretende que se limite a las realizaciones particulares del procedimiento, máquina, fabricación, composición de la sustancia, medios, métodos y etapas descritos en la memoria descriptiva. Como se puede apreciar fácilmente de la descripción, se pueden utilizar los procedimientos, máquinas, fabricación, composiciones de la sustancia, medios, métodos, o etapas, que existen actualmente o que sean desarrollados en el futuro que realicen sustancialmente la misma función o que alcancen sustancialmente el mismo resultado que las correspondientes realizaciones descritas aquí. Por consiguiente, se pretende que las reivindicaciones adjuntas incluyan dentro de su alcance dichos procedimientos, máquinas, fabricación, composiciones de la sustancia, medios, métodos, o etapas.

10

REIVINDICACIONES

1. Una composición de lactoferrina para uso en un método de tratamiento de una úlcera diabética.
2. La composición de la reivindicación 1, para uso en dicho método, donde la composición se administra tópicamente, oralmente o parenteralmente.
- 5 3. La composición de la reivindicación 2, para uso en dicho método, donde la composición se administra oralmente.
4. La composición de la reivindicación 3, para uso en dicho método, donde la composición se administra conjuntamente con un antiácido.
5. La composición de la reivindicación 2, para uso en dicho método, donde la composición se administra tópicamente.
- 10 6. La composición de la reivindicación 2, para uso en dicho método, donde la composición se administra parenteralmente.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en dicho método, donde la composición se administra conjuntamente con una terapia convencional para cicatrización de las heridas.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en dicho método, donde la composición se administra durante al menos una semana.
- 15 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para uso en dicho método, donde la cantidad de lactoferrina que se administra es de 0,0001 µg a 100 g al día.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición es un gel tópico, una solución, una cápsula o un comprimido que tienen una concentración de lactoferrina de 0,0001 % a 30 %.
- 20 11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicho gel tópico está compuesto de un polímero seleccionado de polímero vinílico, polímero de tipo polisacárido, polímero de tipo glucosaminoglucano, polímero de tipo proteína, polímero de tipo polioxietileno-polioxipropileno, polímero de tipo carbómero y polímero de acrilamida.
12. La composición de la reivindicación 11, en la que la concentración de polímero es del 0,5 % (p/p) a 3,0 % (p/p) y el polímero tiene un peso molecular de 50.000 a 13.000.000.
- 25 13. El uso de la lactoferrina para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una úlcera diabética.
14. El uso de un antiácido para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una úlcera diabética en combinación con la lactoferrina administrada oralmente.

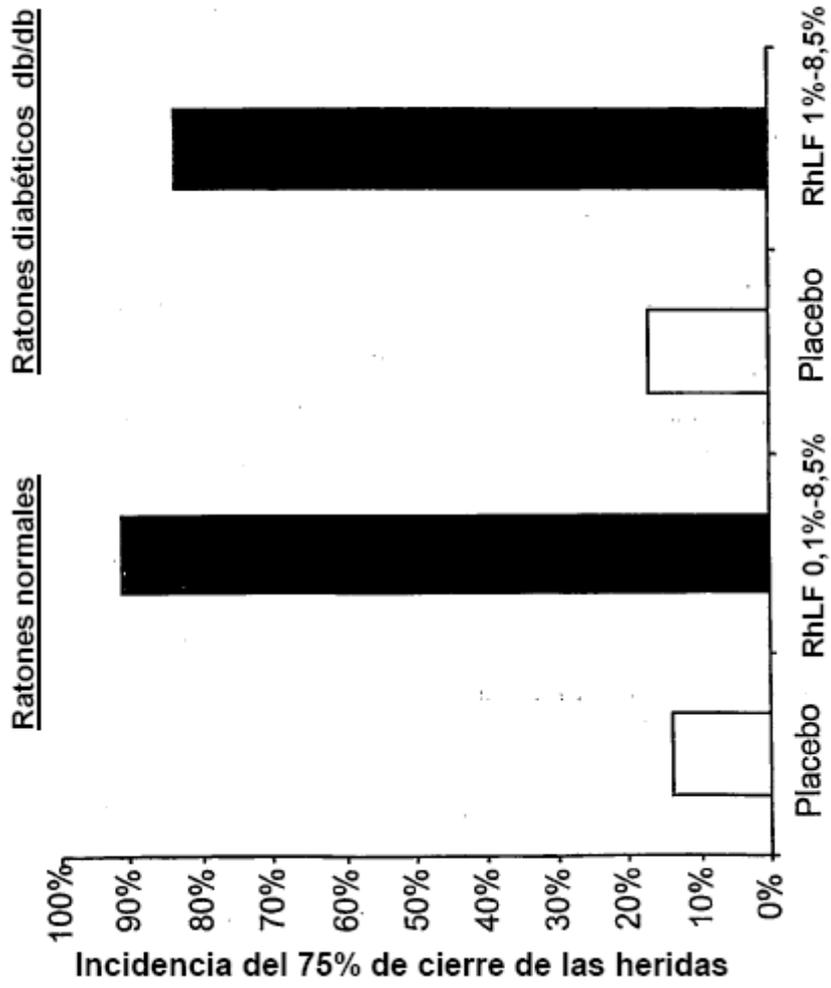


FIG. 1

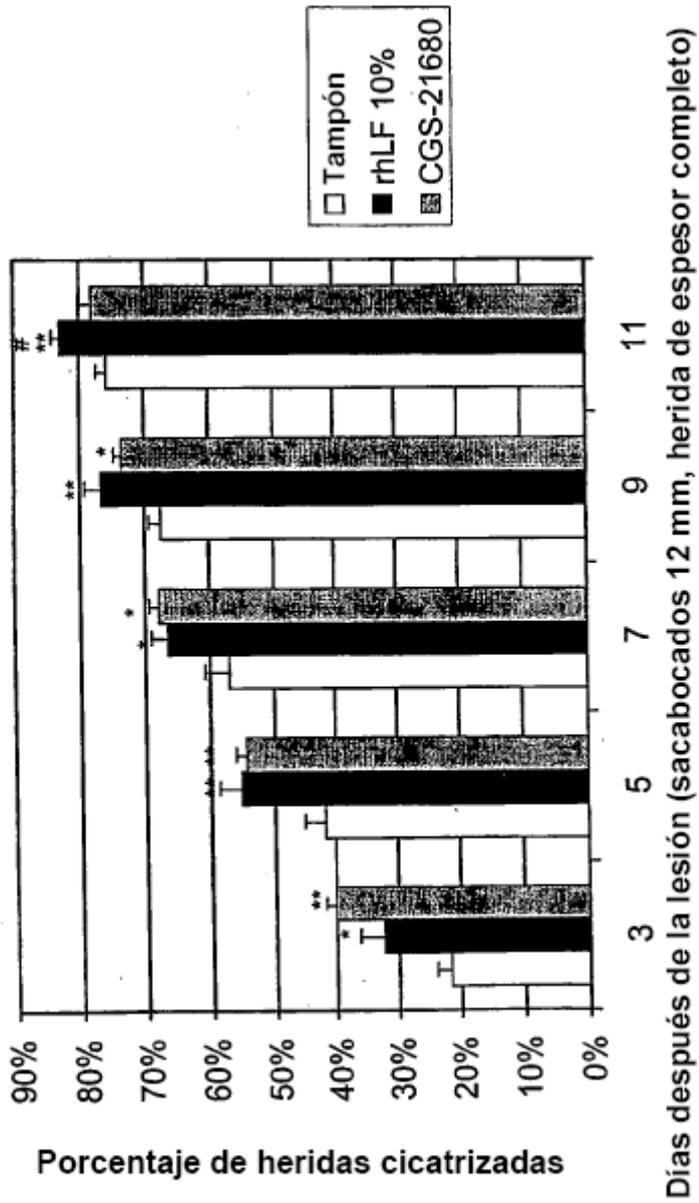


FIG. 2A

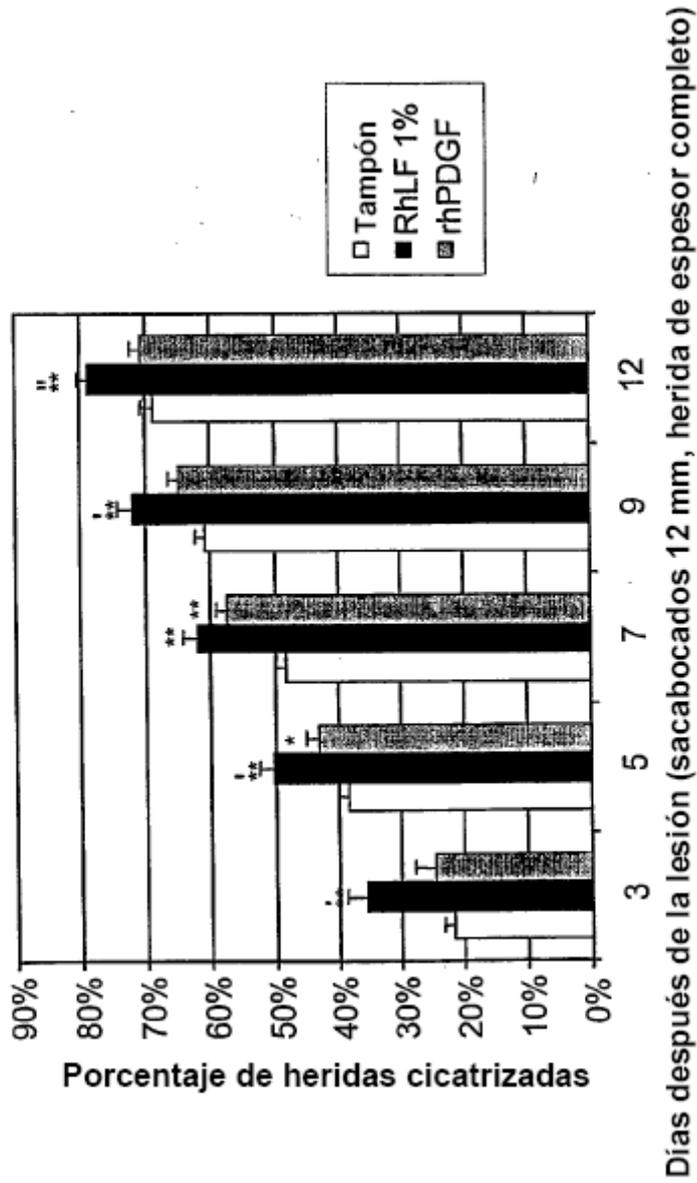


FIG. 2B

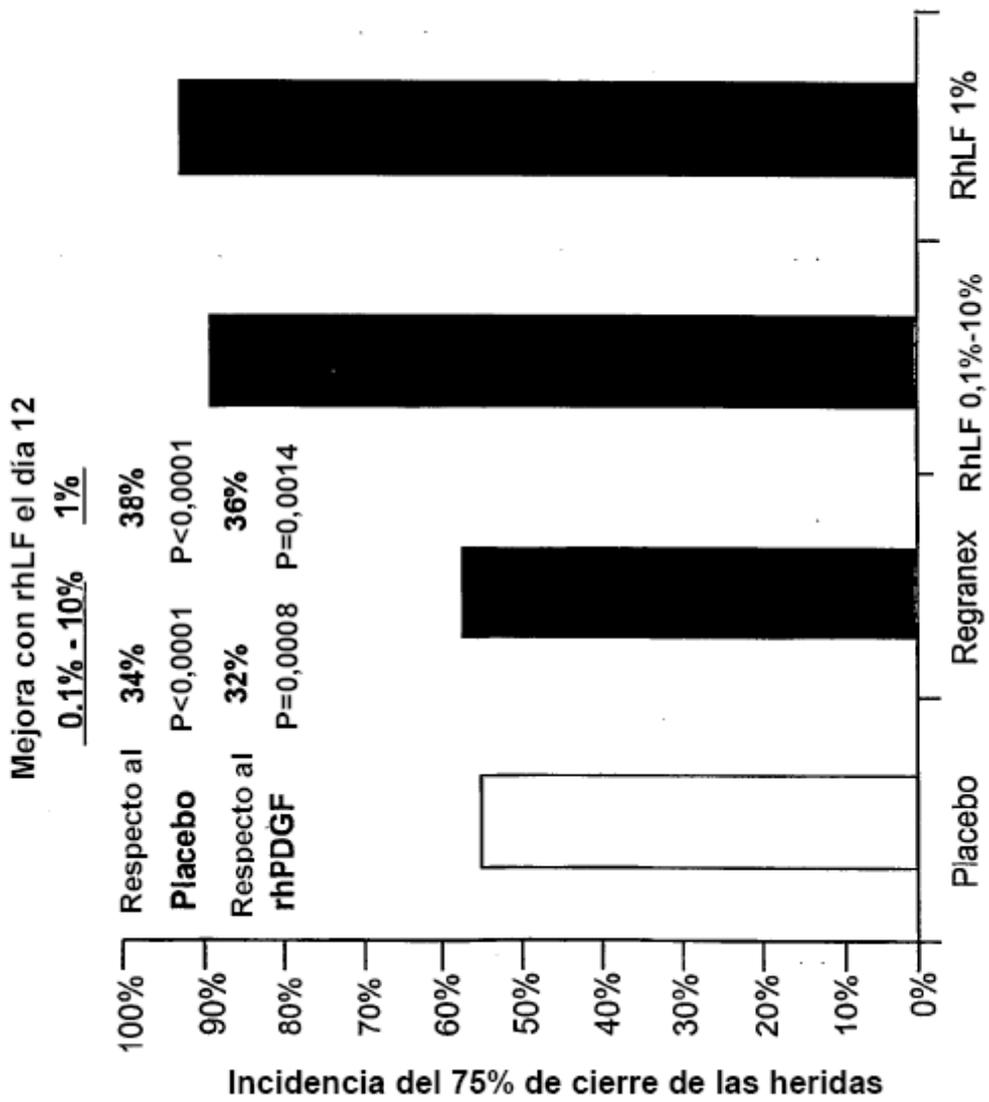
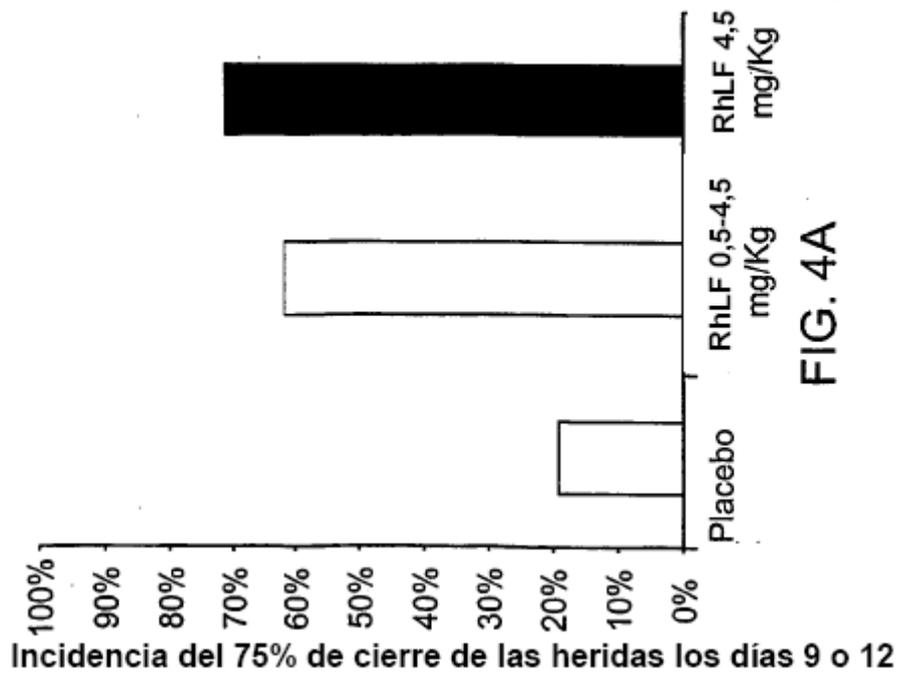
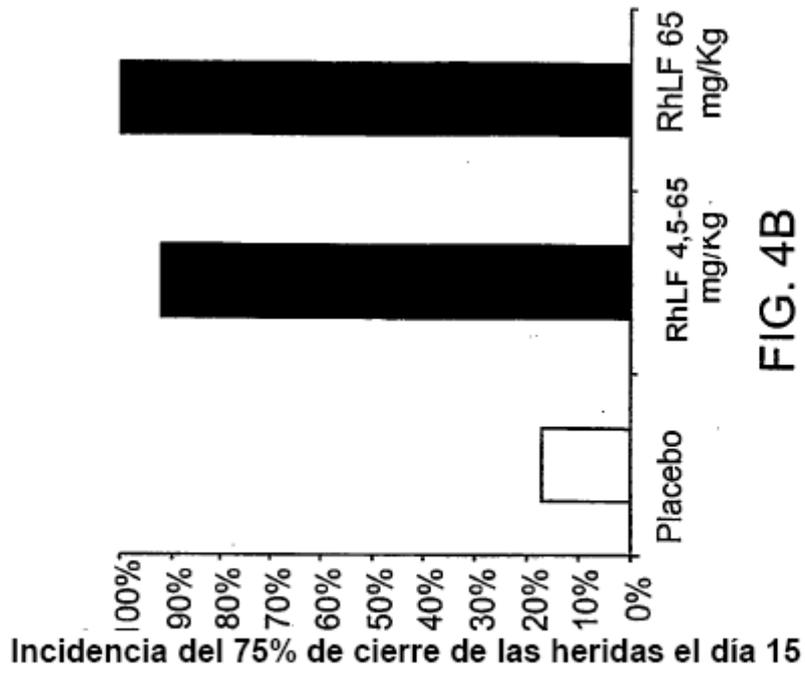


FIG. 3



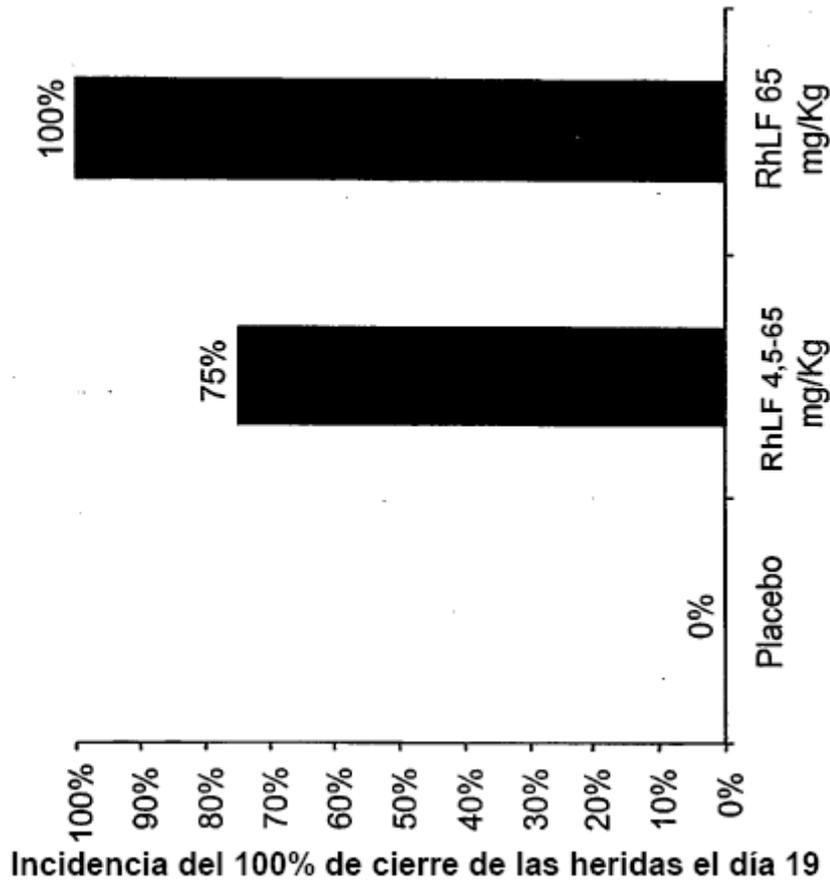


FIG. 4C

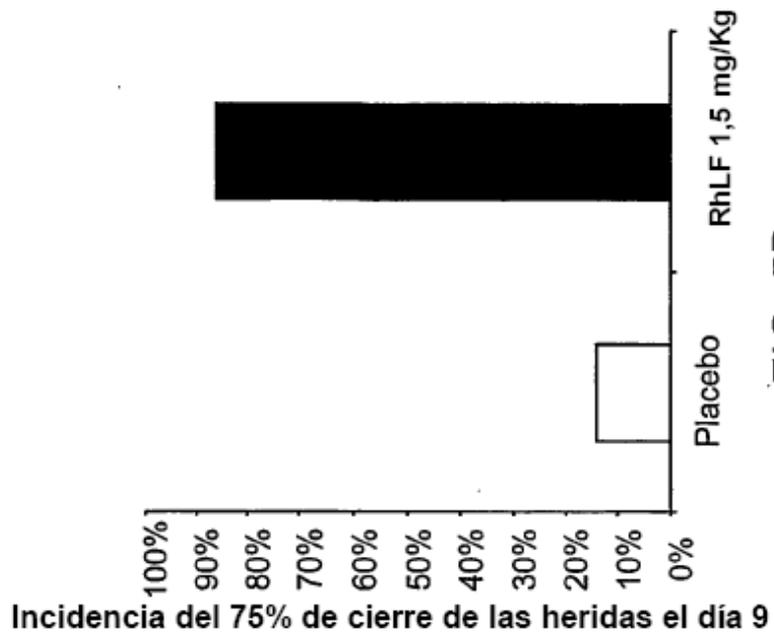


FIG. 5B

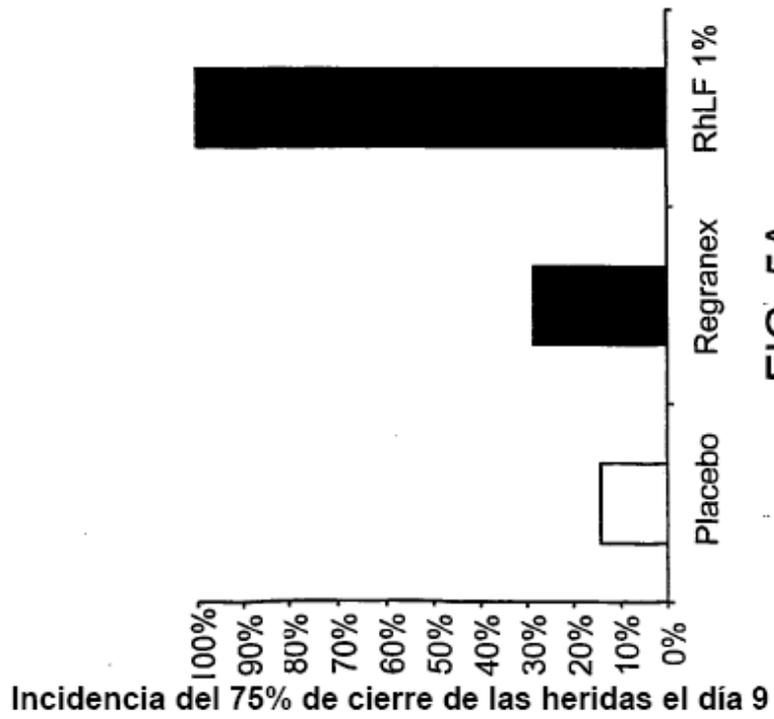


FIG. 5A