



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 915**

51 Int. Cl.:

A61K 31/205 (2006.01)

A61K 31/616 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 7/10 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04737684 .3**

96 Fecha de presentación : **08.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1656131**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2006**

54

Título: **Utilización de la betaína para el tratamiento de la claudicación intermitente.**

30

Prioridad: **15.07.2003 BE 2003/0408**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

73

Titular/es: **Jallal Messadek**
place des Béguinages, 2
4000 Liège, BE

72

Inventor/es: **Messadek, Jallal**

74

Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 361 915 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

Utilización de la betaína para el tratamiento de la claudicación intermitente.

5 La presente invención describe la utilización de la glicina betaína o de una sal terapéuticamente activa de ésta como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la claudicación intermitente. La presente invención describe asimismo una composición de uso oral destinada al
10 tratamiento de la claudicación intermitente, comprendiendo dicha composición como principio activo único una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína por dosis unitaria. Más particularmente, la invención describe un medicamento destinado a tratar a un enfermo que padece una claudicación intermitente causada por unos desórdenes circulatorios periféricos tales como la arterioesclerosis obliterante o la trombo-angeítis obliterante.

Principio de la invención

15 La arteritis es una inflamación de las arterias. Anatómicamente, las lesiones inflamatorias pueden alcanzar una o varias de las tunicas vasculares, es decir endarteritis, mesarteritis, periarteritis o incluso todo el vaso y es la panarteritis.

20 Las arteritis pueden estar difundidas en todo el organismo, localizadas en un territorio vascular (arteritis de los miembros inferiores) o incluso limitadas a un solo vaso (la arteria temporal en la enfermedad de Horton) o a porciones de un vaso (periarteritis nodosa). Teóricamente, existen dos grupos de arteritis: las arteritis agudas y las arteritis crónicas. En la práctica, se pueden definir tres grandes variedades de arteritis:

- 25 1. Las arteritis infecciosas, es decir agudas (rickettsiosis) o subagudas, que son unas panarteritis;
2. Las arteritis degenerativas, que son sobre todo unas endarteritis o unas mesarteritis que afectan al sujeto de edad avanzada, provocadas por una esclerosis (arterioesclerosis, arterioesclerosis) o unos depósitos lipídicos (ateroma);
- 30 3. Las arteritis cripto-genéticas (de causa desconocida, atribuidas a veces a unos trastornos inmunológicos), que son habitualmente unas colagenosis (periarteritis nodosa, lupus eritematoso agudo diseminado, angeítis de Wegener, enfermedad de Buerger, arteritis temporal, etc.).

35 Las complicaciones anatómicas provocadas por las lesiones arteriales, sea cual sea la causa, son en total dos:

- el debilitamiento de la pared arterial que es el origen de una distensión, de un aneurisma con su riesgo de ruptura;
- el engrosamiento de la pared arterial que disminuye la luz del vaso favoreciendo la trombosis.

40 La distensión arterial (aneurisma) y la trombosis provocan una mala vascularización en los territorios irrigados por estos vasos, posible causa de atrofia y de infarto. Tal como se observa, la trombosis en este caso es sólo una de las manifestaciones de la arteritis que se sitúa como evento corriente arriba de ésta.

45 En este caso preciso asimismo, la trombosis está provocada por unas fuerzas mecánicas (shear stress) que provocan la agregación plaquetaria a consecuencia de la activación de las plaquetas y la homocisteína que no tiene ningún efecto causante.

50 La arteritis se manifiesta a nivel de los miembros inferiores por la claudicación intermitente, un dolor de tipo calambre de las masas musculares de la pantorrilla, que aparece con el esfuerzo (habitualmente el andar) y que cede en reposo. El dolor aparece tras una distancia recorrida denominada perímetro de andar cuya importancia disminuye cuando la enfermedad se agrava, imposibilitando entonces cualquier andar. Cuando los dolores persisten incluso en reposo, se debe temer una gangrena, complicación principal de la arteritis. La gangrena aparece como una placa en primer lugar violácea y después negruzca, que se puede extender rápidamente y necesitar la amputación. El diagnóstico de arteritis se evoca frente al enfriamiento de un miembro, la disminución o incluso la abolición de los latidos arteriales, la disminución o la desaparición de las oscilaciones que se buscan con un oscilómetro de Pachon.
55 La arteriografía es indispensable para precisar el estado exacto del tronco arterial. Frente a cualquier arteritis se debe buscar la diabetes azucarada debido a que las arteritis son frecuentes en los diabéticos y se complican fácilmente con gangrena.

60 La arteriopatía obliterante crónica se debe a la formación de placas de ateroma en el seno de la pared arterial. El depósito ateromatoso es una lesión irreversible que afecta a las tres capas de la pared arterial. Ésta ve disminuir progresivamente su calibre a lo largo de la enfermedad, hasta inducir una isquemia del territorio irrigado por la arteria. Realmente, la arteriopatía de los miembros inferiores es una manifestación tardía de la aterosclerosis: es habitual que estos pacientes tengan asimismo unos daños ateroscleróticos de las arterias coronarias, de las carótidas y de la aorta abdominal. Si el proceso en el origen del desarrollo de la placa de ateroma sigue siendo
65 desconocido, los factores de riesgo son bien conocidos: el tabaco, la hipertensión arterial, la diabetes, la hipercolesterolemia (+/- el aumento de la relación LDL/HDL).

Las varices son asimismo unas manifestaciones clínicas de las arteritis y son unas dilataciones anormales y permanentes de las venas superficiales. La insuficiencia de la válvula ostial a nivel del arco de la safena desempeña un papel esencial en el desarrollo de las varices de las venas subyacentes. El aumento de la presión en las venas superficiales y la estasis sanguínea que se deriva de ello pueden ser el origen de trastornos tróficos.

La claudicación venosa es asimismo una manifestación de las arteritis, así como el síndrome de Raynaud.

La claudicación intermitente significa un síntoma en el que se siguen y se repiten dos condiciones: la dificultad de andar continuo que provoca el malestar y los dolores musculares de los miembros inferiores causados después de la locomoción de una distancia constante y el alivio de estos síntomas o la posibilidad de poder moverse nuevamente sin dolor después de un reposo de varios minutos. La claudicación intermitente arterial corresponde a un dolor isquémico de esfuerzo de los miembros inferiores secundario de una arteriopatía crónica obliterante. El dolor está relacionado con una insuficiencia relativa de las aportaciones sanguíneas de un grupo muscular con respecto a un incremento de demanda metabólica que conduce a la acidosis.

Las arteritis inducen asimismo la necrosis de diferentes tejidos y órganos. La invención tiene como objetivo la utilización terapéutica o farmacéutica de la glicina betaína de fórmula $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)\text{COO}^-$ y sus sales farmacéuticamente aceptables con el fin de tratar la claudicación intermitente.

En un aspecto, se podrán utilizar las betaínas lipídicas, las combinaciones y las formulaciones tal como se describen en el documento PCT/IB 02/04923 del inventor. En otro aspecto particular, se da a conocer la utilización de una betaína en combinación con unas células cepas.

Se describe la utilización de la glicina betaína como principio activo o farmacéutico para el tratamiento y/o la prevención de arteritis degenerativas. Por ejemplo, se ha observado que la glicina betaína era apropiada para reducir o limitar la velocidad de desarrollo de degenerescencia de arteritis degenerativa(s), incluso para detener o bloquear el desarrollo de degenerescencia de arteritis degenerativa(s), o mejor también, incluso la remisión, por lo menos parcial, de degenerescencia de arteritis degenerativa(s).

Estado de la técnica

Tratamientos

Los tratamientos utilizados actualmente para las arteritis pueden ser los vasodilatadores que resultan frecuentemente insuficientes. Los anticoagulantes orales tales como la warfarina retrasan la aparición de las trombosis. Los antibióticos controlan la infección de la gangrena. El tratamiento quirúrgico puede ser necesario en caso de no resultar eficaces estos tratamientos.

El tratamiento medicamentoso es indicado en ausencia de mejora significativa de la claudicación después de 6 meses de ganancia de peso o en los pacientes demasiado mayores para beneficiarse de una reeducación estandarizada. Estos tratamientos no han resultado estadísticamente eficaces para reducir, incluso limitar, la velocidad de degenerescencia de arteritis degenerativa(s), y por lo tanto todavía menos para detener o bloquear la degenerescencia.

En el caso particular de la claudicación intermitente, los medicamentos utilizados son, por ejemplo, la pentoxifilina que tiene el efecto de mejorar la deformabilidad de los glóbulos rojos, de lo cual procede la viscosidad de la sangre, el naftidrofurilo y el cilostazol que posee una actividad anti-agregante y vasodilatadora. Estos agentes han mostrado una cierta eficacia clínica, pero su utilización sigue estando relacionada con unos efectos secundarios no despreciables. Las heparinas de bajo peso molecular, la ticlopidina, el clopidogrel y la aspirina han sido asimismo ensayados con unos resultados variables.

Se conocen diversas utilizaciones terapéuticas de la betaína, en particular las descritas en los documentos siguientes:

Las patentes US nº 6.008.221 y US nº 6.127.370 describen un tratamiento de la enfermedad de Alzheimer en el que se combina un ácido fólico con una betaína con el fin de reducir unos porcentajes de homocisteína. El tratamiento describe asimismo la utilización de dichas combinaciones con el fin de reducir unos eventos micro-vasculares que pueden inducir unas neuro-degeneraciones. Se describe la claudicación intermitente. En estas solicitudes, se enseña la utilización de la betaína por vía oral, pero en cantidades extremadamente bajas, en particular en la reivindicación 12, en la que la dosis diaria de betaína propuesta está comprendida entre 0,1 y 100 mg, cantidad demasiado baja para poder esperar cualquier efecto terapéutico.

El documento WO 00/25764 describe una combinación que comprende un donante de metilo, una vitamina y un bioflavonoide con el fin de reducir la homocisteína y en particular las enfermedades asociadas a la hiper-homocisteinemia. Los autores, cuando listan las enfermedades asociadas a la hiper-homocisteinemia, hacen

referencia a la claudicación intermitente sin que tampoco haya ningún ejemplo específico ni una relación científica claramente establecida entre estas dos patologías. Además, este documento describe en su único ejemplo una composición oral destinada a una toma única, conteniendo dicha composición 600 mg de betaína, 0,5 mg de sal de calcio de ácido L-5-metil-tetra-hidrofólico y 500 mg de isoquercetina. La utilización de bioflavonoides así como de vitamina además de la betaína no aporta nada desde el punto de vista terapéutico en el tratamiento de la claudicación intermitente, tratándose además de una composición destinada a un uso único, la cantidad de betaína utilizada para cada toma única no permite alcanzar unas concentraciones terapéuticas necesarias de betaína debido a la baja biodisponibilidad absoluta por vía oral de esta última. Los compuestos reivindicados en este documento mediante la aportación de ingredientes no efectivos en la claudicación intermitente, podrían comprometer la eficacia de la betaína en esta patología y puesto que no aportan las cantidades necesarias de betaína para un efecto terapéutico, no permiten una medicación óptima y/o eficaz.

Los documentos WO 00/51596 y WO 02/062322 describen la utilización de la betaína como agente antitrombótico, sola o en combinación con otras moléculas. La trombosis es una consecuencia posible de las arteritis y se sitúa corriente abajo de ésta. Estos documentos no enseñan por lo tanto que la betaína permitiría tratar las arteritis, en particular una o unas arteritis degenerativas.

Ninguno de estos documentos describe de manera suficiente la utilización de la betaína con el fin de tratar la claudicación intermitente. De manera sorprendente, el inventor ha descubierto las propiedades remarcables de la glicina betaína para tratar la claudicación intermitente.

La invención

La invención tiene por objeto la utilización de la glicina betaína como principio terapéuticamente activo para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de la claudicación intermitente.

Se da a conocer asimismo la utilización de la glicina betaína como principio terapéuticamente activo para el tratamiento de las arteritis o para la obtención de un medicamento destinado al tratamiento de las arteritis degenerativas, en particular para la obtención de un medicamento destinado a la prevención de por lo menos una arteritis degenerativa, incluso para la obtención de un medicamento destinado a reducir o limitar la velocidad de desarrollo de degenerescencia de arteritis degenerativa(s), o mejor aún para la obtención de un medicamento destinado a detener o a bloquear el desarrollo de degenerescencia de arteritis degenerativa(s) y/o para la obtención de un medicamento destinado a la remisión por lo menos parcial de la degenerescencia de arteritis degenerativa(s).

Según una forma de realización, la invención tiene por objeto la utilización de la glicina betaína para la preparación de una combinación terapéutica de uso oral para el tratamiento de la claudicación intermitente, comprendiendo dicha combinación como principio activo único por lo menos 500 mg (ventajosamente por lo menos 1.000 mg, en particular 2.000 a 10.000, preferentemente de 3.000 a 7.000 mg de glicina betaína en una forma de liberación inmediata) de glicina betaína por dosis unitaria y/o una mezcla de glicina betaína y de aspirina como principios activos y/o como combinación de principios activos de glicina betaína y de aspirina.

Ventajosamente, la composición o combinación unitaria de uso oral contiene por lo menos 1.000 mg de glicina betaína en una forma de liberación inmediata, en particular 2.000 a 10.000, preferentemente de 3.000 a 7.000.

Preferentemente, la composición o combinación unitaria de uso oral contiene por lo menos 250 mg de glicina betaína en una forma de liberación controlada, más específicamente por lo menos 250 mg de glicina betaína en una forma de liberación controlada y por lo menos 250 mg de glicina betaína en una forma de liberación inmediata.

En un aspecto particular de la invención, una betaína puede estar asociada asimismo a un agente anti-colesterol, tal como una estatina con el fin de tratar las patologías descritas en la presente solicitud. De manera opcional, se describe asimismo una composición farmacéutica que combina aspirina/betaína/agente anti-colesterol.

Se dan a conocer asimismo los tratamientos siguientes:

- el tratamiento de un paciente que padece una arteritis, en el que se administra a dicho paciente una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína para el tratamiento de la arteritis.
- la prevención en un paciente de la aparición de una arteritis, en la que se administra a dicho paciente una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína para prevenir dicha arteritis.
- el tratamiento de un paciente que padece una arteritis, en el que se administra a dicho paciente una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína para el tratamiento de arteritis degenerativa(s).
- el tratamiento de un paciente que padece una arteritis, en el que se administra a dicho paciente una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína para la prevención de por lo menos una arteritis degenerativa.

5 - el tratamiento de un paciente que padece una arteritis, en el que se administra a dicho paciente una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína para reducir o limitar la velocidad de desarrollo de degenerescencia de arteritis degenerativa(s).

5 - el tratamiento de un paciente que padece una arteritis, en el que se administra a dicho paciente una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína para detener o bloquear el desarrollo de degenerescencia de arteritis degenerativa(s).

10 - el tratamiento de un paciente que padece una arteritis, en el que se administra a dicho paciente una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína para la remisión por lo menos parcial de degenerescencia de arteritis degenerativa(s).

15 En estos tratamientos, se administra ventajosamente (en particular por vía oral) al paciente de manera diaria por lo menos 500 mg (ventajosamente por lo menos 1.000 mg, en particular 2.000 a 10.000, preferentemente de 3.000 a 5.000 mg de glicina betaína en una forma de liberación inmediata) de glicina betaína, ventajosamente en forma de una dosis unitaria y/o de una dosis de toma única diaria y/o de una mezcla de glicina betaína y de aspirina como principios activos y/o como combinación de principios activos de glicina betaína y de aspirina. En particular, se administra al paciente de manera diaria por lo menos 1.000 mg (ventajosamente por lo menos 1.500 mg, en particular 2.000 a 10.000, preferentemente de 3.000 a 7.000 mg de glicina betaína en una forma de liberación inmediata) de glicina betaína en una forma de liberación inmediata. Más específicamente, se administra al paciente de manera diaria por lo menos 250 mg de glicina betaína en una forma de liberación controlada. Por ejemplo, se administra al paciente de manera diaria por lo menos 250 mg, en particular por lo menos 750 mg de glicina betaína en una forma de liberación controlada y por lo menos 250 mg de glicina betaína en una forma de liberación inmediata.

20 Unos compuestos tales como una betaína de fórmula $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)\text{COO}^-$ y sus sales farmacéuticamente aceptables se podrían utilizar con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar el síndrome de Raynaud, así como los daños fisiopatológicos relacionados con esta afección, o

30 con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar la enfermedad de Burger, así como los daños fisiopatológicos relacionados con esta afección, o

35 con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar la varices así como los daños fisiopatológicos relacionados con esta afección, o

con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar los problemas de circulación y de microcirculación relacionados con las piernas pesadas, así como los daños fisiopatológicos relacionados con esta afección o estado, o

40 con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar las arteritis temporales, las arteritis gigante-celulares temporales, la enfermedad de Horton, así como los daños fisiopatológicos relacionados con esta afección o estados tales como las cefaleas, la claudicación intermitente de la mandíbula durante los esfuerzos de masticación, los dolores linguales, la sensibilidad del cuero cabelludo, la ceguera así como la induración de las arterias temporales, o

45 con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar un edema del polo posterior del ojo, la pérdida funcional de la visión, la oclusión de la arteria central de la retina así como la isquemia retiniana, o

con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar los trastornos relacionados con una velocidad de sedimentación acelerada, o

50 con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar los trastornos relacionados con las algias de origen inflamatorio tal como en la enfermedad de Horton; o

55 con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar los trastornos relacionados con la impotencia masculina así como los trastornos genitales de origen arterial que se pueden producir en caso de obstrucción vascular haciendo la erección difícil, incompleta o imposible; o

con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar los trastornos relacionados con la impotencia masculina así como los trastornos relacionados con la disfunción eréctil; o

60 con el fin de prevenir, aliviar y/o tratar los trastornos relacionados con la vasoconstricción del sistema circulatorio.

65 A pesar de que la homocisteína no tiene ningún efecto causante en la expresión de las arteritis, su papel agravante en la enfermedad vascular está ahora reconocida y en un aspecto particular, se describe la utilización de por lo menos una betaína de fórmula $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)\text{COO}^-$ y sus sales farmacéuticamente aceptables con el fin de tratar las arteritis normalizando al mismo tiempo y/o disminuyendo los porcentajes plasmáticos de homocisteína en un paciente que padece hiper-homocisteinemia.

El término arteritis de los miembros inferiores designa realmente una arteriopatía crónica obstructiva. Este término agrupa las lesiones de la pared arterial cuya evolución es el estrechamiento o estenosis del calibre arterial. Los miembros inferiores son frecuentemente alcanzados por este estrechamiento arterial que provoca dolores durante el andar y puede ir hasta la gangrena y la amputación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Efecto de la betaína sobre la sangre no estimulada y perfundida sobre unas células endoteliales activadas.

Se ha estudiado el efecto de la betaína sobre la adherencia de las plaquetas y la formación de trombos bajo un flujo laminar de altas fuerzas de cizallado (shear stress 60 din/cm²) sobre una línea de células endoteliales micro vasculares humanas (HMEC¹) en unas condiciones de reposo o activadas con PMA (200 µm, 45 minutos). La sangre humana heparinizada se pre-etiquetaba con la mepacrina y se exponía al vehículo solo o a la betaína (10, 20, 40 y 80 µg/ml) durante 20 minutos antes de la perfusión. Al final de los 3 minutos de perfusión, las células han sido fijadas y la superficie recubierta por los trombos ha sido calculada mediante análisis de imágenes de fluorescencia de los trombos adquiridas mediante microscopia confocal.

Métodos experimentales

Adherencia de las plaquetas y formación del trombo

El ensayo de adherencia de las plaquetas ha sido realizado según los métodos descritos por Alevriadou *et al.* 1993 y Boccardo *et al.* 1997, con algunas modificaciones menores. La sangre humana extraída sobre heparina (concentración final de 10 IU/ml) se perfusiona en la cámara de flujo laminar utilizando una bomba-jeringa. Esta cámara de flujo se termostata a 37°C y una de sus paredes de vidrio está revestida con un monolayer de células endoteliales sobre las cuales se perfusiona la sangre tratada con betaína.

Cámara de perfusión

Las dimensiones de la cámara de perfusión (30 mm de longitud, 1 mm de anchura y 150 µm de grosor) permiten obtener una amplia gama de porcentaje de cizallado con bajos caudales de sangre. Las condiciones de flujo están muy caracterizadas para esta configuración y permiten ser laminares con un número de Reynolds muy bajo (< 10). Una evaluación precisa de las fuerzas de cizallado sobre la superficie de adhesión se realizada asimismo utilizando un programa de análisis de la dinámica de los fluidos (CFD package FIDP, fluid dynamic international, Evanston, IL) que permite verificar el efecto de la entrada y de la salida sobre los perfiles de velocidad del flujo.

Ensayo de adherencia sobre endotelio

Una línea humana de células endoteliales microvasculares de origen dérmico (HMEC-1) ha sido cultivada en MCDB 131 suplementado con 10% de FCS, 1 µg/ml de hidrocortisona, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 2 mM de glutamina y 50 µg/ml de factor de crecimiento de células endoteliales. Para los experimentos, las células han sido esparcidas en un coverslip de vidrio y en la confluencia se han estimulado con PMA (12-miristato 13-acetato de forbol) en unas condiciones estáticas. Al final de la incubación, las células han sido perfusionadas con la sangre humana. La sangre heparinizada ha sido incubada con mepacrina 10 µM que da un color fluorescente (quinacrine dihydrochloride BP; Sigma Chimique, Louis de St. MO). La mepacrina se concentra en los gránulos densos de las plaquetas y en los gránulos de los leucocitos y a esta concentración no tiene ningún efecto sobre la función normal de la plaqueta; siendo cualquier fluorescencia en los eritrocitos capturada por la hemoglobulina.

La sangre se preincuba entonces durante 5 minutos a 37°C antes de la perfusión. Habiendo sido el sistema llenado con PBS pH 7,3, la perfusión con la sangre se inicia y se mantiene al caudal constante de 1.500 sec⁻¹ (que corresponde a un shear stress de 60 din/cm², es decir en las condiciones arteriales o que se podrían encontrar en unas condiciones patológicas de estenosis o de arteritis). Después de 3 minutos, se detiene la perfusión y la pared con el monolayer de células endoteliales se deshidrata y se fija en acetona durante 20 minutos. Las imágenes de las plaquetas que forman el trombos sobre la superficie de células endoteliales se adquieren entonces mediante un microscopio confocal con láser invertido (Insight plus; Meridian Instruments Inc, Okemos, MI). La superficie ocupada por cada trombo ha sido evaluada utilizando un programa de detección Image 1.61 (NIH Bethesda, MD). Se han seleccionado 15 campos, sistemáticamente digitalizados a lo largo de la superficie de adherencia.

Resultados

Efecto de la betaína sobre la formación de trombos sobre HMEC-1 estimulados por PMA bajo unas condiciones de flujo (60 din/cm²)

Exp. n°	control	PMA 200 nM 45'	PMA + betaína 20 µg/ml	PMA + betaína 40 µg/ml	PUMA + betaína 80 µg/ml
#4	1649	4822	3059	3947	2451
#6	1139	6243	1290	5146	1852
#9	680	11843	1436	2470	4150
#10	465	6538	-	1972	1077
#12	845	5448	-	2795	-
Media	955	6979	1928	3266	2388
±Desv. est.	± 459	± 2880°	± 982**	±1277*	±1305**

Los datos están expresados como el área cubierta por los trombos ($\mu\text{m}^2/\text{campo}$)

- 5 HMEC-1: línea celular endotelial microvascular humana
PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol
La sangre se incubó con betaína durante 20 minutos
 $^{\circ}\text{p} < 0,01$ frente al control * $\text{p} < 0,05$, ** $\text{p} < 0,01$ frente a PMA

10 Comentarios

Las células endoteliales estimuladas por el PMA expresan el $\text{TNF}\alpha$ (Tumor Necrosis Factor Alpha) que induce a su vez la expresión de diversas moléculas tales como las prostaglandinas, las I-CAM, las interleucinas y diversas citoquinas que son todas unos marcadores de la inflamación. El interés de este experimento reside en el hecho de que se reúnen las condiciones de una arteritis, en particular la inflamación de las células endoteliales y como resultado, de las paredes endoteliales.

En efecto, los diferentes actores de una arteritis están presentes, es decir: la sangre, la pared endotelial inflamada y las fuerzas de cizallado. Las células de control, es decir no inflamadas puesto que no están estimuladas por PMA muestran una propensión limitada a adherir las plaquetas a pesar de las fuerzas de cizallado elevadas y no se produce ninguna formación de trombos, por lo tanto ninguna condición obliterante. Por el contrario, en cuanto estas células se inflaman, su propensión a formar unos trombos es notable y mimetiza perfectamente las condiciones patológicas de una arteritis. En este modelo, haciendo la betaína volver a la normalidad la adhesividad de las células endoteliales, actúa sobre la expresión de diversas moléculas tales como las prostaglandinas, las I-CAM, las interleucinas así como diversas citoquinas, y muestra su actividad sobre estos marcadores de la inflamación y por lo tanto sobre la inflamación. Esta actividad antiinflamatoria de la betaína permite prever su utilización en el tratamiento de las arteritis, ya sean obliterantes o no.

30 **Ejemplo 2**

Efecto de la betaína sobre la trombina y la viscosidad de la sangre

A medida que aumenta la viscosidad de la sangre, el flujo sanguíneo disminuye en todo el cuerpo, creando la anoxia (falta de oxígeno) y la privación nutritiva en diversos sectores del cuerpo. Esto explica asimismo porqué la terapia de betaína es eficaz cuando se aumenta el flujo sanguíneo puesto que la viscosidad de la sangre disminuye. Así, los pacientes obtienen más alivio de sus síntomas con esta terapia.

Si el mecanismo de coagulación no se detiene correctamente, entonces aparece una generación continua de trombina y formación soluble de fibrina, que tiene por resultado la viscosidad incrementada de la sangre y el flujo disminuido de la sangre en el organismo.

Además, *in vitro*, la betaína se opone a los efectos inducidos por la interleucina 1 y el Factor de Necrosis Tumoral sobre la polinuclear neutrófila, a saber la disminución del desplazamiento, el aumento de la adhesividad y la liberación excesiva de iones superóxidos y peróxidos de hidrógeno que estos mediadores provocan.

Asimismo, la betaína se opone al descenso de la deformabilidad eritrocitaria, perturbación fisiológica cuyo papel ha sido demostrado en numerosos procesos patológicos, en particular durante las arteropatías de los miembros inferiores. Resulta por lo tanto de la administración de la glicina betaína una facilitación de la circulación de los glóbulos rojos, siendo la microcirculación mejorada, sin aumentar el caudal a nivel de las zonas sanas a costa de las zonas isquemiadas.

a) Agregación *in vitro* sobre sangre total animal inducida por la trombina

Para demostrar el efecto de la betaína sobre la trombina, se han realizado unos ensayos de agregación sobre sangre total. Esta técnica sobre sangre total presenta la ventaja de que todos los elementos de la sangre están presentes, en particular los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, siendo estos últimos unos actores importantes en los fenómenos de inflamación. Por los fenómenos de deformabilidad, los eritrocitos son asimismo unos actores

potentes en las patologías relacionadas a las arteritis.

Protocolo

5 Se extrae la sangre de ratas Wistar sobre citrato y se alicuota en 2 muestras para cada animal, una muestra se mezcla con líquido fisiológico (control) y la otra con una disolución de betaína a la concentración de 5 mg/ml con el fin de obtener una concentración final de 50 µg/ml de betaína en la sangre (tratada), (10 µl de disolución para 990 µl de sangre). Las muestras se incuban entonces durante 20 minutos a 37°C bajo una ligera agitación y después se añade la trombina (1 IU/ml) y se realizan los ensayos con un agregómetro Chronolog 500.

10

Resultados

Las amplitudes se expresan en ohm y las velocidades en ohm/min.

	NaCl 0,9%		Betaína 50 µg/ml	
	Amplitud Ω	Velocidad Ω/min.	Amplitud Ω	Velocidad Ω/min.
Rata 1	22	14	5	7
Rata 2	17	18	3	5
Rata 3	25	16	12	7
Rata 4	18	16	8	5
Rata 5	24	18	4	3
Media	21,2 ± 3,56	16,4 ± 1,67	6,4 ± 3,65	5,4 ± 1,67

15

Los resultados muestran la potente actividad de la betaína frente a la trombina. Interviniendo esta última asimismo en las patologías descritas anteriormente, en particular la viscosidad de la sangre y los fenómenos inflamatorios, se observa que la utilización terapéutica de la betaína se puede prever para estas patologías así como cualquier otra patología que implica la trombina.

20

b) Efecto de la betaína en unos voluntarios sanos después de la administración oral

El objetivo de este estudio es evaluar la evolución de diversos parámetros hematológicos después de la administración oral de 2x3 gr de betaína monohidrato (Betafin AP) durante 4 días a unos voluntarios sanos.

25

Protocolo

Los ensayos han sido llevados a cabo en el hospital de la Citadelle en Lieja, Servicio de hematología clínica. Los voluntarios han dado su consentimiento escrito antes de los experimentos.

30

Las extracciones sanguíneas han sido realizadas mediante punción venosa en el brazo en los donantes en ayunas sobre citrato de Na el primer día a las 9 horas (d1) con el fin de determinar los valores basales. Justo después de las extracciones, los voluntarios han tomado una primera dosis de 3 g de betaína con el desayuno. La dosis siguiente el mismo día con 12 horas de intervalo. Los 3 días siguientes las tomas continuaron por la mañana y por la noche así como una última toma de 3 g en ayunas, 2 horas antes de las extracciones sanguíneas el último día (d5).

35

Resultados

	Fibrinógeno		Trombina/antitrombina	
	Día 1	Día 5	Día 1	Día 5
Donante 1	3,8	3,3	2,5	2,1
Donante 2	3,3	3,1	2,9	2,2
Donante 3	3,4	3	2,9	2,2
Donante 4	2,9	2,2	3,2	2,6
Donante 5	3,1	2,9	3,1	2,2
Media	3,3	2,9	2,92	2,26
Variación el D5	-12%		-23%	

40 Comentarios

Un descenso significativo interviene en todos los voluntarios a nivel de los marcadores de la coagulación y de la viscosidad de la sangre. Se observa que la administración de la betaína reduce el fibrinógeno y fluidizando la sangre permite una mejor circulación sanguínea. Esta reducción de la viscosidad sanguínea permite poder irrigar mejor las zonas isquemiadas en las patologías relacionadas con las arteritis. Durante este mismo estudio en 3 sujetos de 5, la relación entre el factor von Willebrand y el colágeno ha evolucionado hacia abajo, lo cual indica la actividad terapéutica de la betaína sobre la actividad funcional del factor von Willebrand y así de las patologías relacionadas con este factor.

45

c) Generación de trombina *in vitro* sobre sangre humanaProtocolo

Estos ensayos han sido realizados en el Instituto Cardiovascular de Maastricht. La sangre de 5 voluntarios sanos ha sido extraída sobre citrato de Na (3,8%, 1:10) y centrifugada con el fin de obtener PRP. Después, este PRP se incubó durante 20 minutos con una disolución isotónica de betaína (pH 7) o con un líquido fisiológico, siendo cada donante su propio control. La concentración final de betaína en los PRP ensayados es de 100 µg/ml.

Se ha determinado entonces la generación de trombina gracias al Thrombogram®.

Los resultados obtenidos muestran que en presencia de betaína la generación de trombina disminuye 15 a 25% en función del donante. Esta actividad inhibidora de la betaína sobre la generación de trombina es comparable a las obtenidas, en este modelo, después de la ingestión de aspirina o después de la administración experimental de anti-glicoproteínas Ib. El hecho de reducir la generación de trombina permite reducir la reactividad de la sangre así como su coagulabilidad y su viscosidad. Esta actividad inhibidora de la betaína, al permitir una mejor circulación sanguínea, siendo la sangre menos viscosa, reduce las arteritis y los daños relacionados con las arteritis. La utilización terapéutica de la betaína se puede prever asimismo en cualquier patología que implica una generación incrementada de la trombina.

Ejemplo 3Reto inflamatorio provocado por un estrés oxidativo sobre la pared endotelial. efecto de la betaína.

Siendo las arteritis asimismo unas condiciones patológicas en las que el estrés oxidativo se expresa sobre las paredes vasculares, era interesante evaluar el efecto de la betaína sobre un modelo de radicales libres. En este modelo, la pared endotelial tras la agresión de los radicales libres presenta el mismo tipo de reacción que en las patologías de la invención.

Protocolo experimental

Se han utilizados en estos ensayos unos hámsteres que pesan entre 120 y 130 gramos. Se inyecta a estos animales una disolución de rosa Bengala antes de exponer sus venas femorales a una fuente de luz polarizada verde con el fin de producir *in situ* unos radicales libres. La luz verde polarizada degrada el rosa Bengala, lo cual produce unos radicales libres conocidos por agredir la pared endotelial y producir unas condiciones idénticas a las encontradas en la inflamación, las arteritis y por tanto la trombosis. Este modelo experimental describe perfectamente la interacción entre el endotelio, que tras este estrés oxidativo se vuelve una superficie procoagulante, y los elementos de la sangre. Se cuantifica la formación del trombo mediante la toma de imágenes cada 10 segundos de la vena femoral durante 40 minutos (240 imágenes por experimento). El cálculo de la cantidad de luz blanca de cada una de las 240 imágenes permite cuantificar el tamaño y la progresión de los trombos. La intensidad de la luz blanca corresponde al número de plaquetas en el trombo que comprende asimismo unos leucocitos y unos eritrocitos.

Las sustancias estudiadas son inyectadas en bolos (22 ó 66 mg/kg) por vía intravenosa a T0, seguida de una infusión continua (22 ó 66 mg/kg) durante 40 minutos.

Resultados

	Control	22 mg/kg	66 mg/kg
Hamster 1	413641	123074	70729
# 2	422820	47271	43315
# 3	449691	188041	56714
# 4	379908	121924	140621
# 5	452849	135688	162353
# 6	220109	477299	162477
# 7	359792	220730	-
# 8	268123	88407	-
Media	370867	175304	106035

Comentarios

Un descenso de -53% y -71% a 22 mg/kg y 66 mg/kg respectivamente en la luminiscencia registrada. Se observa que la pared endotelial en presencia de betaína desarrolla menos propiedades procoagulantes ya que los trombos formados son mucho menos importantes. En este modelo, se ha demostrado que los radicales libres generados por la polarización del rosa Bengala no tenían, o tenían poca influencia sobre la actividad plaquetaria y/o la reología de

la sangre, lo cual implica que la betaína ejerce una influencia directa sobre la adhesividad de la pared endotelial. En efecto, los radicales liberados, agrediendo la pared endotelial, crean las condiciones de diversas patologías tales como la inflamación degenerativa, la inflamación, el cáncer, la inflamación obliterante así como las condiciones procoagulantes relacionadas con las infecciones de orden vírico y/o bacteriano. La actividad de la betaína en este modelo animal *in vivo* demuestra su eficacia sobre las patologías que implican la agresión de la pared endotelial por los radicales libres. El estrés oxidativo sobre la pared de los vasos de estos experimentos es similar al encontrado en las arteritis.

Ejemplo 4

Medición *in vitro* de la viscosidad y de la coagulabilidad de la sangre en el sistema TEG[®] después de la adición de betaína.

Protocolo

Se ha extraído sangre de 6 voluntarios sanos, suplementada con diversas concentraciones de betaína y se ha evaluado directamente (menos de cuatro minutos después de la extracción) en el Tromboelastógrafo TEG[®] (Haemoscope Corporation USA). Las concentraciones finales de betaína estudiadas eran las siguientes 0, 100, 250 y 500 µg/ml.

Resultados

Concentración de betaína	R (mm)	RK (mm)	K (mm)	MA (mm)	Ángulo α (°)
0 µg/ml (NaCl 0,9%)	30	34	4	68	63°
100 µg/ml	40	50	10	64	39°
250 µg/ml	46	55	9	61	45°
500 µg/ml	95	111	16	68	34°

Comentarios

El efecto de la betaína depende de la concentración y afecta prácticamente a todos los parámetros del TEG. Una actividad anticoagulante se demuestra en estos experimentos, así como un efecto muy significativo sobre el tiempo de formación inicial de fibrina (r) y por tanto de la viscosidad sanguínea. Una actividad notable se demuestra asimismo sobre el ángulo α que traduce la rapidez de formación de la red de fibrina en la sangre y por tanto su viscosidad y la lentitud con la que podría fluir en los vasos. La betaína muestra su efecto sobre estos parámetros y haciendo la sangre menos viscosa, tiende a facilitar su fluidez y reducir su adhesión en el sistema vascular.

En este sistema, reduciendo el ángulo α , la betaína demuestra asimismo su actividad fibrinolítica, fragilizando el coágulo formado y permitiendo por tanto su destrucción (lisis) más rápida.

El interés de este experimento es que se utiliza la sangre nativa, es decir sin la adición de otro anticoagulante que la betaína y permite así ser lo más cercano posible a las condiciones fisiológicas que se podrían encontrar *in vivo* después de la administración de la betaína.

Ejemplo 5

Ensayo clínico sobre cinta de correr

En 7 enfermos que padecen arteritis y claudicación intermitente, que no toman otra medicación que la aspirina (75 a 325 mg/día), se ha prescrito una dosis de 4 gramos/día por vía oral de monohidrato de betaína (Betafin[®] Finnsugar) divididos en dos tomas por día. El tratamiento duró 4 semanas.

Los enfermos han sufrido una prueba de andar sobre una cinta de correr el primer y el último día del tratamiento con el fin de evaluar el efecto de la betaína.

La prueba de andar sobre una cinta de correr es estandarizada, la velocidad de la cinta de correr es de 3,2 km y la pendiente de 12%. Permite evaluar el perímetro de inicio de la claudicación y después el perímetro máximo de parada del andar, es decir el momento en el que el dolor impide que el paciente continúe andando.

Resultados

En 5 pacientes, se ha observado un aumento del perímetro de inicio de la claudicación de 25% y un aumento del perímetro total de andar de más de 30% gracias a un retroceso de la aparición del dolor y/o a un andar más eficiente. Se ha observado asimismo un retroceso de la aparición de las primeras molestias de 20%.

En los otros 2, el efecto era menos significativo, situándose el aumento del perímetro total de andar cerca de 15%.

5 El cuestionario aplicado a cada uno de estos voluntarios ha permitido destacar una tendencia general de bienestar aumentado así como una mejor percepción física del esfuerzo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de la glicina betaína o de una sal terapéuticamente activa de ésta como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de la claudicación intermitente.
- 10 2. Utilización de la glicina betaína o de una sal terapéuticamente activa de ésta como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición farmacéutica de uso oral destinada al tratamiento de la claudicación intermitente, comprendiendo dicha composición como principio activo único una cantidad terapéuticamente activa de glicina betaína por dosis unitaria.
- 15 3. Utilización de la glicina betaína o de una sal terapéuticamente activa de ésta como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro total del andar en un paciente que padece claudicación intermitente.
- 20 4. Utilización según la reivindicación 3, en la que la glicina betaína o una sal farmacéutica de ésta se utiliza como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro total del andar, siendo dicho incremento medido mediante una prueba estandarizada de andar sobre una cinta de correr, cuya velocidad es de 3,2 km/h y la pendiente de 2%.
- 25 5. Utilización según la reivindicación 3, en la que la glicina betaína o una sal farmacéutica de ésta se utiliza como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro total del andar de más de 30%.
- 30 6. Utilización de la glicina betaína o de una sal farmacéutica de ésta como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro de inicio de claudicación en un paciente que padece claudicación intermitente.
- 35 7. Utilización según la reivindicación 6, en la que la glicina betaína o una sal farmacéutica de ésta se utiliza como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro de principio de claudicación, siendo dicho incremento medido mediante una prueba estandarizada de andar sobre una cinta de correr, cuya velocidad es de 3,2 km/h y la pendiente de 12%.
- 40 8. Utilización según la reivindicación 6, en la que la glicina betaína o una sal farmacéutica de ésta se utiliza como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro de inicio de claudicación de por lo menos 25%.
- 45 9. Utilización según la reivindicación 3 ó 6, en la que la glicina betaína o una sal farmacéutica de ésta se utiliza como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro de total del andar y el perímetro del inicio de la claudicación, asegurando al mismo tiempo un retroceso de la aparición del dolor, y/o un andar más eficiente.
- 50 10. Utilización según la reivindicación 3 ó 6, en la que la glicina betaína o una sal farmacéutica de ésta se utiliza como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro de total del andar y el perímetro del inicio de la claudicación, asegurando al mismo tiempo un retroceso del tiempo de aparición de las primeras molestias en un 20%.
- 55 11. Utilización según la reivindicación 3 ó 6, en la que la glicina betaína o una sal farmacéutica de ésta se utiliza como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro de total del andar y el perímetro del inicio de la claudicación, asegurando al mismo tiempo una tendencia general de bienestar aumentado.
- 60 12. Utilización según la reivindicación 3 ó 6, en la que la glicina betaína o una sal farmacéutica de ésta se utiliza como principio terapéuticamente activo para la preparación de una composición o combinación farmacéutica destinada a incrementar el perímetro de total del andar y el perímetro del inicio de la claudicación, asegurando al mismo tiempo una mejor percepción física del esfuerzo.
- 65 13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, de la glicina betaína para la preparación de una composición o combinación terapéutica de uso oral destinada al tratamiento de la claudicación intermitente, comprendiendo dicha composición o combinación como principio activo único por lo menos 500 mg de glicina betaína por dosis unitaria y/o una mezcla de glicina betaína y de aspirina como principios activos y/o como combinación de principios activos de glicina betaína y de aspirina.
14. Utilización según la reivindicación 13, para la preparación de una composición o combinación unitaria de uso oral, caracterizada porque contiene por lo menos 1.000 mg de glicina betaína en una forma de liberación inmediata.
15. Utilización según la reivindicación 13, para la preparación de una composición o combinación unitaria de uso

oral, caracterizada porque contiene por lo menos 250 mg de glicina betaína en una forma de liberación controlada.

5 16. Utilización según la reivindicación 13, para la preparación de una composición o combinación unitaria de uso oral, caracterizada porque contiene por lo menos 250 mg de glicina betaína en una forma de liberación controlada y por lo menos 250 mg de glicina betaína en una forma de liberación inmediata.

17. Utilización de la glicina betaína para la preparación de una composición terapéutica de uso oral destinada al tratamiento de la claudicación intermitente, comprendiendo dicha composición como principio activo único por lo menos 500 mg de glicina betaína por dosis unitaria.