

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 004**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/00** (2006.01)

**A61K 31/215** (2006.01)

**A61P 3/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2008 E 08720107 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2012 EP 2114386**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento de las complicaciones diabéticas**

30 Prioridad:

**29.01.2007 IN MU19602006**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.04.2013**

73 Titular/es:

**VLIFE SCIENCES TECHNOLOGIES PVT LTD.**  
**(100.0%)**

**Pride Purple Coronet 1st Floor S.N 287 Baner Road**

**Pune 411 045, Maharashtra , IN**

72 Inventor/es:

**DESHPANDE, SUPREET, K.;**

**KULKARNI, SUDHIR, A. y**

**GOLLAPUDY, REENA, R.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 400 004 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

Composición farmacéutica para el tratamiento de las complicaciones diabéticas

5 **Campo de la invención**

Se describe un método para el tratamiento de las complicaciones diabéticas mediante la administración de un beta-bloqueador. Las complicaciones diabéticas surgen de la diabetes y tienen pocas o ninguna opción de tratamiento. La presente invención describe el uso de los beta-bloqueadores en el tratamiento de las complicaciones diabéticas. La presente invención también describe la inhibición de la aldosa reductasa, uno de los principales factores causantes de las complicaciones diabéticas. También se proporcionan métodos de cicatrización de heridas diabéticas. Se describen las composiciones para el tratamiento de complicaciones diabéticas, tales como heridas diabéticas. La presente invención incluye el empleo de una formulación tópica de un beta-bloqueador, que tiene sustancialmente actividad antibacteriana, para mejorar el proceso de cicatrización de las heridas diabéticas. La presente invención también implica el aumento de la tasa de acumulación de colágeno del tejido cicatrizado epitelializado en la herida de un individuo diabético.

**Antecedentes de la invención**

20 La incidencia mundial de la diabetes ha aumentado de un estimado de 30,000,000 de pacientes en 1985 a un estimado de 245,000,000 pacientes en el 2007, y aumentará aún más a 380,000,000 en el 2025 (Fuente: Federación Internacional de la Diabetes). El costo del tratamiento de la diabetes y las complicaciones diabéticas está alcanzando 232.0 mil millones de dólares en el 2007 y se espera que supere los \$ 302.5 mil millones en el 2025. La diabetes crónica da lugar a varias complicaciones diabéticas tales como neuropatía diabética, nefropatía diabética, la miocardiopatía diabética, retinopatía diabética, catarata diabética, cistopatía diabética, queratopatía corneal diabética, dermatopatía diabética, microangiopatía diabética, infarto de miocardio, edema macular, conducción neural deteriorada y heridas diabéticas .

30 El tratamiento de las complicaciones diabéticas es independiente del control de nivel de glucosa en sangre. Por tanto, los medicamentos anti-diabéticos estándar no son adecuados como opciones de tratamiento para las complicaciones diabéticas. Existe una necesidad inmediata de nuevas composiciones y tratamientos para las complicaciones diabéticas.

35 Uno de los principales problemas subyacentes que enfrentan los diabéticos es la cicatrización de las heridas. El quince por ciento de todas las personas con diabetes (2.6 millones) se espera que desarrollen úlceras del pie durante su vida. Estas úlceras tienden a ser de naturaleza crónica, ya que no se curan o sanan muy despacio. Actualmente, existen aproximadamente 750,000 pacientes con úlceras de pie diabético en los Estados Unidos, 980,000 en Europa y 1.1 millones en el resto del mundo, para un total de 2.8 millones de enfermos. Las úlceras del pie diabético son un problema grave, ya que hasta el 25% de las úlceras del pie diabético finalmente requieren la amputación.. La importancia médica de la cicatrización de heridas diabéticas no puede ser sobrevalorada. La capacidad de sanar es fundamental para el bienestar humano, ya que la cicatrización de heridas permite a un paciente superar una lesión traumática, la cirugía, y las heridas debidas a trastornos metabólicos tales como la diabetes, agentes microbianos u otros agentes físicos o químicos.

45 La cicatrización inefectiva de heridas es un problema serio en la diabetes, lo cual contribuye al incremento de la morbilidad (J.J. Reynolds, British J Dermatol, 112 715-723 (1985); J.A. Galloway y C.R. Shuman, Am J Med, 34 177-191 (1963); y S.H. Pearl y I.O. Kanat, J Foot Surg, 27, 268-270 (1988)). La respuesta reparadora en la cicatrización de heridas está orquestada por elementos celulares múltiples que trabajan juntos de muchas maneras, incluyendo la infiltración de la lesión por células efectoras inflamatorias. Después de esto, los elementos fibroblásticos junto a las células efectoras inflamatorias proporcionan mecanismos antibacterianos y promueven la eliminación del tejido necrótico, así como el establecimiento del nuevo tejido conectivo. Un trastorno fundamental del metabolismo de la glucosa podría perturbar estos procesos protectores complejos e interactivos.

50 Un trabajo previo ha sugerido que la disfunción celular en la cicatrización de las heridas diabéticas implica la función defectuosa de los neutrófilos (J.D. Bagdade y otros, Diabetes, 27, 677-681 (1978); C.M. Nolan y otros, Diabetes, 27, 889-894 (1978); A.G. Mowat y J. Baum, J.Clin Invest diciembre, 50, 2541-2549 (1971)), la infiltración retrasada de la herida con células inflamatorias (D.G. Greenhalgh y otros, Am J Pathol, 136, 1235 (1990) y Fahey y otros, Surg 214, 175-180 (1991)), la disminución de la producción de colágeno (W.H.Goodson y T.K Hunt, J Anal, 124, 401-411 (1977) y W.H. Goodson y T.K. Hunt, Diabetes abr, 35, 491-495 (1986)), y la disminución de la actividad de los factores de crecimiento endógenos, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos básico, que podrían proporcionar una base para la formación más lenta de tejido de granulación y cierre de la herida.

60 Más de 100 factores fisiológicos conocidos contribuyen a las deficiencias de cicatrización de heridas en los individuos con diabetes (Oyama, y otros Diabetes: Research and Clinical Practice 73, 227-234 (2006); H. Brem y M. Tomic-Canic,

J. Clin. Invest., 117, 1219-1222 (2007)). Estos factores incluyen el deterioro o disminución de la producción de factores de crecimiento, de la respuesta angiogénica, la función de macrófagos, la acumulación de colágeno, la función de barrera epidérmica, la cantidad de tejido de granulación, la proliferación y la migración de queratinocitos y fibroblastos, número de nervios epidérmicos, curación del hueso y equilibrio entre la acumulación de los componentes de la matriz extracelular (ECM) y su remodelación por metaloproteinasas (MMPs). La cicatrización de heridas se produce como una respuesta celular a la lesión e implica la activación de los queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. Muchos factores de crecimiento y citocinas liberados por estos tipos de células son necesarios para coordinar y mantener la cicatrización. Los análisis moleculares de las biopsias de la epidermis de pacientes han identificado marcadores patogénicos que se correlacionan con el retraso en la cicatrización. Estos incluyen la sobreexpresión de c-myc y la localización nuclear de  $\beta$ -catenina. Junto con una reducción y la localización anormal del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la activación de la vía de los glucocorticoides, se inhibe la migración de queratinocitos. En el borde no curado (callo) de las úlceras del pie diabético (DFUs), los queratinocitos muestran una ausencia de migración, proliferación hiperactiva, y diferenciación incompleta. Los fibroblastos demuestran un cambio fenotípico, así como disminución de la migración y la proliferación.

La etiología de la úlcera del pie diabético es compleja, y la cicatrización de heridas a menudo no es muy exitosa por una variedad de razones. La etiología de la úlcera del pie diabético se asocia con la enfermedad vascular periférica, la neuropatía autonómica y la disfunción endotelial. Las condiciones metabólicas que no son óptimas para la cicatrización de heridas retrasan aún más el proceso (hiperglicemia, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, estado pro-coagulativo) y también pueden estar presentes. La cicatrización de heridas es un proceso complejo caracterizado por tres fases superpuestas: inflamación, formación de tejido y remodelación tisular (H. Brem and M. Tomic-Canic, J. Clin. Invest., 117, 1219-1222 (2007)). Este proceso secuencial emana por la interacción de las células en la dermis y la epidermis, en paralelo con la liberación de mediadores químicos de las células inflamatorias, los fibroblastos y los queratinocitos. Durante la formación de tejido, los factores de crecimiento sintetizados por las células locales y migratorias estimulan a los fibroblastos para migrar a la herida donde proliferan y construyen una matriz extracelular. La diabetes se sabe que está asociada con una variedad de alteraciones en el metabolismo del tejido conectivo, como resultado de las cuales los diabéticos se enfrentan al problema de mala cicatrización de heridas. Las características comunes observadas durante la cicatrización de heridas diabéticas en ratas son la inflamación, inicio lento de la fase inicial de cicatrización que tiende a prolongar el tiempo de curación, una menor densidad de neutrófilos en las zonas de cicatrización y el fracaso en la sustitución de los neutrófilos por los macrófagos en las zonas donde se produce la cicatrización. La cicatrización de heridas cutáneas es un proceso biológico complejo y bien orquestado que requiere la migración coordinada y la proliferación tanto de los queratinocitos y fibroblastos, así como otros tipos de células. Herir la epidermis genera citocinas, factores de crecimiento, proteasas e inicia la síntesis de componentes de la matriz extracelular, todo lo cual puede regular los procesos de proliferación y migración de queratinocitos esenciales para la re-epitelización.

La pérdida de colágeno asociada con la diabetes puede ser debido a niveles bajos de la síntesis o el metabolismo aumentado de colágeno recién sintetizado o ambos. Estas anomalías cualitativas y cuantitativas contribuyen a la cicatrización deteriorada de heridas observada en la afección diabética.

Se han reportado diversos mecanismos de lesiones celulares en la diabetes mellitus (Sakata y otros, J. Atheroscler. Thromb. 3, 169-176 (2000); D.K. Ways, M.J. Sheetz, Vitam. Horm. 60, 149-193 (2000); Mashima, y otros, Curr. Opin. Lipidol. 4, 411-418 (2001)), incluyendo la glicosilación acelerada, el aumento de la actividad de la proteína quinasa C y el aumento del estrés oxidativo, aunque el mecanismo preciso no se entiende completamente. El grupo de Hotta (N. Sakamoto, J.H. Kinoshita, P.F. Kador, N. Hotta, Polyol Pathway and its Role in Diabetic Complications, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1988) propone la participación de la vía poliol como un mecanismo de diversas lesiones de órganos inducidas por la alta concentración de glucosa. La vía de poliol consta de dos etapas. La primera es la conversión de glucosa a sorbitol, y la segunda es la conversión de sorbitol en fructosa. La enzima clave es la aldosa reductasa que convierte la glucosa en sorbitol. Esta enzima se encuentra en muchos tejidos. La hiperglicemia aumenta la vía de los polioles, resultando en la acumulación de sorbitol en las células. La acumulación de sorbitol en las células provoca varias lesiones de órganos. La alta presión osmótica y alto estrés oxidativo se han propuesto como los mecanismos por los que está implicada la vía de los polioles en la lesión celular. Sin embargo, el mecanismo exacto de la vía de los polioles no se entiende todavía completamente. Se ha observado que los daños de células endoteliales inducidos por alta glucosa pueden estar mediados por la activación de la vía de los polioles acompañado por el estrés oxidativo aumentado. El uso de inhibidores de la aldosa reductasa sugiere que la inhibición de la vía de los polioles puede evitar daños de las células endoteliales en afecciones diabéticas.

El receptor beta-adrenérgico es conocido por estar involucrado en el proceso de cicatrización de heridas, y los agonistas han demostrado retrasar el proceso de cicatrización de heridas. También se ha demostrado que la inducción del receptor beta-adrenérgico inhibe la migración de queratinocitos, lo que retrasa la cicatrización de heridas (Chen y otros, J. Invest. Dermatol. 119, 1261-8 (2002)). Hay otras referencias para aplicaciones tópicas en forma de soluciones acuosas o gotas oftálmicas de beta-antagonistas (Reidy y otros, Br. J. Ophthalmol. 78, 377-380 (1994). Denda y otros, J. Invest. Dermatol. 121, 142-148 (2003)). Además, el hecho de que los beta-bloqueadores son capaces de aumentar la angiogénesis en los corazones infartados implica que promueven la angiogénesis, lo que puede ser útil en la

cicatrización de heridas (Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005). Además, el propranolol se muestra que mejora el colágeno pulmonar controlando la relación de AMPc y GMPc (RC Lindenschmidt y HP Wischl; Pharmacology and Experimental Therapeutics, 232, 346-350 (1985)). En la solicitud de patente de Estados Unidos núm. US2003/144206 A1 se describe el uso de un beta-bloqueador tal como el esmolol en el tratamiento de complicaciones diabéticas tardías, tales como la nefropatía, hipertensión o neuropatía.

Holman Rury y otros, BMJ, BMJ Publishing Group, vol. 317, núm. 7160, (1998), págs. 713-720, describen el uso de un beta-bloqueador tal como el atenolol en el tratamiento de complicaciones diabéticas tardías, particularmente las enfermedades microvascular y macrovascular tales como el infarto del miocardio, derrame cerebral, enfermedad vascular periférica, retinopatía, y nefropatía Cotter y otros, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, Springer, Berlín. DE, Vol. 351, núm. 6, enero 1 de 1995, págs. 630-635, describen la eficacia del carvedilol en el tratamiento de la neuropatía diabética.

Ono R y otros Investigative Ophthalmology & Visual Science, Ophthalmology, Hagerstown, MD, vol. 45, supl.no. 2, 1 abril 2004, págs. 3201-B836, describen la eficacia de nipradilol tópico (solución al 1%) en el tratamiento de la retinopatía diabética. Sin embargo, los bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos no se han informado para su uso en las complicaciones diabéticas como la cicatrización de heridas diabéticas, y la cicatrización de heridas diabéticas implica una etiología diferente de la cicatrización de heridas regulares o traumáticas.

### Sumario de la invención

El tema de la invención hace alusión a esas reivindicaciones de referencia que se anexan.

La presente invención proporciona métodos y composiciones para el tratamiento de complicaciones diabéticas derivadas de la diabetes por la administración de antagonistas beta-adrenérgicos o beta-bloqueadores. Se proporciona además métodos y composiciones para el tratamiento de heridas crónicas diabéticas en un sujeto diabético que comprende administrar tópicamente al sujeto una cantidad terapéutica de un agente, tal como un bloqueador beta-adrenérgico, que inhibe la actividad mejorada de la aldosa reductasa, aumenta los niveles de óxido nítrico, facilita la migración de los fibroblastos, induce la formación de tejido de granulación y aumenta la perfusión vascular, de modo que conduce a un aumento del suministro de oxígeno para la cicatrización de heridas diabéticas.

Un aspecto de la presente invención proporciona un método de tratamiento de una complicación diabética en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un bloqueador beta-adrenérgico, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste a un paciente que necesita tal tratamiento. La cantidad terapéuticamente efectiva de un bloqueador beta-adrenérgico, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste se proporciona en un portador farmacéuticamente aceptable, vehículo o diluyente de éste. Preferentemente, la complicación diabética se selecciona del grupo que consiste en neuropatía diabética, nefropatía diabética, la miocardiopatía diabética, retinopatía diabética, catarata diabética, cistopatía diabética, queratopatía corneal diabética, dermatopatía diabética, microangiopatía diabética, infarto del miocardio, edema macular, la conducción neural deteriorada y heridas diabéticas.

El bloqueador beta-adrenérgico, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste se puede administrar en una forma de liberación sostenida. El mamífero puede ser un primate, canino, felino, bovino, ovino, porcino, camélido, caprino, roedor o equino. Preferentemente, el mamífero es un humano.

La complicación diabética puede tratarse al administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un bloqueador beta-adrenérgico, el cual puede incluir, pero sin limitarse a acebutolol, alprenolol, amosulalol, arotinolol, atenolol, befunolol, betaxolol, bevantotol, bisiprolol, bepindolol, bretilol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, buprandolol, bupranolol, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cinamolol, cloranolol, dilevatol, entbutotol, epanolol, esmolol, fumolol, indenolol, istalol, labetalol, levobetaxolol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metiproporanolol, metoprolol, moprolol, nadolol, nodoxolol, neбивolol, niptadilol, optipranolol, oxprenolol, penbutolol, perbutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propranolol, protoquilol, sotalol, sulfinalol, talindol, tertatolol, tillisolol, timolol, toliprolol, trasilol, xibenolol y solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de éstos. La administración puede llevarse a cabo cada hora, diariamente, semanalmente o mensualmente. La administración diaria puede incluir de una a seis administraciones cada día.

El bloqueador beta-adrenérgico puede ser administrado a través de una vía oral, intravenosa, intraperitoneal, oftálmica, parenteral, tópica, subcutánea, subdural, intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intracerebral, intraarterial, intralesional, localizada o pulmonar. Cuando se administra por vía oral, la dosis del bloqueador beta-adrenérgico es preferentemente de aproximadamente 1 mg a 1000 mg. Cuando se administra por vía oftálmica, la dosis del bloqueador beta-adrenérgico es preferentemente de aproximadamente 0.001% a 10.6%. Cuando se administra por una vía tópica, la dosis del bloqueador beta-adrenérgico es preferentemente de aproximadamente 0.001 % a 56.0%. La presente invención proporciona además una composición farmacéutica tópica dérmica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un bloqueador beta-adrenérgico, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y un portador tópico farmacéuticamente aceptable, vehículo o diluyente.

5 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica tópica para tratar la cicatrización de heridas diabéticas en un paciente que la necesita, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un bloqueador beta-adrenérgico tal como esmolol, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y un portador tópico farmacéuticamente aceptable, vehículo o diluyente, en donde la composición está en la forma de una crema, gel, solución tópica, parche, ungüento, hisopo tópico, emulsión, atomizador o loción.

10 La presente invención también proporciona un método de tratamiento de heridas diabéticas que comprende administrar tópicamente una cantidad terapéutica de un bloqueador beta-adrenérgico, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, a un paciente que lo necesita. Preferentemente, el bloqueador beta-adrenérgico es esmolol. El esmolol que se usa para tratar las complicaciones diabéticas puede implicar un mecanismo seleccionado del grupo que consiste en inducir la producción de óxido nítrico, aumentar el nivel de colágeno en heridas diabéticas, aumentar la perfusión vascular mediante la neo-angiogénesis mejorada en heridas diabéticas; incrementar el suministro de oxígeno por medio de la perfusión vascular mejorada en las heridas diabéticas; inhibir el aumento de la actividad de la aldosa reductasa en el paciente diabético, aumentar los factores de crecimiento, tales como los factores de crecimiento nervioso, los factores de crecimiento epitelial, los factores de crecimiento vascular endotelial, los factores de crecimiento derivados de plaquetas en las heridas diabéticas, y combinaciones de éstos.

20 El bloqueador beta-adrenérgico se puede aplicar tópicamente en forma de una crema, ungüento, hisopo tópico, emulsión, atomizador o loción. Cuando el bloqueador beta-adrenérgico es esmolol, el esmolol se puede aplicar tópicamente en forma de una crema, gel, solución tópica, ungüento, hisopo tópico, emulsión, atomizador o loción. El mamífero puede ser un primate, canino, felino, bovino, ovino, porcino, camélido, caprino, roedor o equino. Preferentemente, el mamífero es un humano.

25 La presente invención proporciona además un método de tratamiento de complicaciones diabéticas mediadas por la aldosa reductasa en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un bloqueador beta-adrenérgico que tiene actividad aldosa reductasa, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste a un paciente que lo necesita. Preferentemente, el bloqueador beta-adrenérgico se esmolol, timolol, o propanolol. La cantidad terapéuticamente efectiva de un bloqueador beta-adrenérgico, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste se puede proporcionar en un portador farmacéuticamente aceptable, vehículo o diluyente de éste.

35 Preferentemente, las complicaciones diabéticas mediadas por la aldosa reductasa se seleccionan del grupo que consiste en neuropatía diabética, nefropatía diabética, la miocardiopatía diabética, retinopatía diabética, catarata diabética, cistopatía diabética, queratopatía corneal diabética, dermatopatía diabética, microangiopatía diabética, infarto del miocardio, edema macular, deterioro de la conducción neural y heridas diabéticas.

#### **Descripción detallada de la invención**

40 De acuerdo con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Cabe señalar que tal como se usan en la presente, las formas singulares "un", "uno", "una", y "el/la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "la dosis" incluye la referencia a una o más dosis y equivalentes de ésta conocidos por los expertos en la técnica.

45 Las publicaciones discutidas en la presente se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder tal publicación en virtud de una invención previa. Adicionalmente, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

50 Por el término "sujeto" o "paciente", como se usa en la presente, se entiende que incluye un mamífero. El mamífero puede ser un canino, felino, primate, bovino, ovino, porcino, camélido, caprino, roedor, o de equino. Preferentemente el mamífero es un humano.

55 El término "eficacia" como se usa en la presente se refiere a la eficacia de un régimen de tratamiento particular. Los métodos de evaluación de la eficacia en el tratamiento de las complicaciones y úlceras diabéticas son conocidos para el tratamiento y diagnóstico de los profesionales médicos.

60 Por las expresiones "portador farmacéuticamente aceptable" y "excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende que se refieren a cualquier compuesto o compuestos que se usa(n) en la formación de una parte de la formulación que se destina a actuar simplemente como un portador. El portador o excipiente farmacéuticamente aceptable es generalmente seguro, no tóxico, ni biológicamente ni de otra manera indeseable. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable como se usa en la presente incluye tanto uno como más de tal portador o excipiente.

Los términos "tratar" y "tratamiento", y similares se usan en la presente para referirse a generalmente la obtención de un efecto fisiológico y farmacológico deseados. Más específicamente, los reactivos descritos en la presente se usan para tratar un sujeto que padece una complicación diabética y/o heridas diabéticas. La complicación diabética puede ser mediada por la aldosa reductasa, u otro mecanismo de acción tales como la inhibición de la actividad de la aldosa reductasa aumentada, la inducción de la producción de óxido nítrico, el aumento del nivel de colágeno en heridas diabéticas, el aumento de la perfusión vascular de manera de mejorar la neo-angiogénesis en heridas diabéticas; el incremento del suministro de oxígeno por medio de la perfusión vascular mejorada en las heridas diabéticas; la inhibición del aumento de la actividad de la aldosa reductasa en el paciente diabético, el aumento de los factores de crecimiento, tales como los factores de crecimiento nervioso, los factores de crecimiento epitelial, los factores de crecimiento vascular endotelial, los factores de crecimiento derivados de plaquetas en las heridas. El término "tratamiento", como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente un humano.

Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende una cantidad de un agente, reactivo, compuesto, composición, o combinación de tales materiales descritos en la presente que cuando se administra a un mamífero es suficiente para ser efectiva contra complicaciones diabéticas o heridas diabéticas.

**[0030]** Hay por lo menos 17 millones de personas con diabetes en los Estados Unidos, y aproximadamente 1 millón de nuevos casos se diagnostican cada año. Una mayoría de la población diabética se diagnostica con graves complicaciones de la diabetes, incluyendo la neuropatía diabética, la nefropatía diabética, la miocardiopatía diabética, retinopatía diabética, catarata diabética, cistopatía diabética, queratopatía corneal diabética, dermatopatía diabética, microangiopatía diabética, infarto del miocardio, edema macular, deterioro de la conducción neural y heridas diabéticas. En la actualidad hay pocas opciones de tratamiento para los pacientes que sufren de complicaciones diabéticas. Es esta la necesidad inmediata de tratamientos efectivos para las complicaciones diabéticas que forma el tema de la presente invención.

Los pacientes con heridas diabéticas a menudo demuestran disminución de la inflamación de las heridas, infecciones recurrentes de heridas, disminución de la perfusión vascular cutánea, la escasa deposición de colágeno en la herida, y la maduración de la cicatriz. La deficiencia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), se asocia con la úlcera diabética crónica y contribuye a la alteración de la cicatrización (H D Beer, M T Longaker, S Werner, J Invest Dermatol 109, 132 (1997)). Los ensayos clínicos con Regranex.RTM han demostrado eficacia en la mejora de la cicatrización de la úlcera crónica del pie en solo la mitad o menos de los pacientes evaluados (D L Steed, J Vasc Surg, 21, 71 (1995)).

Una investigación sobre las vías que contribuyen a la cicatrización de heridas diabéticas revela varios factores responsables de la respuesta lenta de cicatrización. La aterosclerosis de vasos mayores y menores impide la entrega de oxígeno y nutrientes a la herida. La neuropatía causa pérdida de la sensibilidad protectora y trauma local. Por último, las defensas inmunológicas defectuosas inhiben la fagocitosis celular de residuos y promueve la infección. La hiperglicemia en sí es responsable de la formación de productos finales avanzados de glicosilación (AGE'S), que se unen a las membranas celulares y a las proteínas de la matriz extracelular e impiden su función. Los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante beta y factor de crecimiento vascular endotelial se han encontrados que son deficientes en heridas diabéticas, mientras que los niveles de metaloproteinasas de la matriz y superóxido están elevados en el fluido de heridas diabéticas.

Los niveles de glucosa crónicamente elevados en sangre resultan en la función reducida de leucocitos y la malnutrición celular, que contribuyen a una alta tasa de infección de las heridas y los problemas asociados de cicatrización en los pacientes diabéticos. Las úlceras del pie diabético también se producen como resultado de otros factores diversos. Estos factores incluyen cambios mecánicos en la conformación de la estructura ósea de los pies, la neuropatía periférica y la enfermedad arterial periférica aterosclerótica, todos los cuales se producen con mayor frecuencia e intensidad en la población diabética. La glicosilación no enzimática predispone a la rigidez de los ligamentos. La neuropatía causa pérdida de la sensación protectora y pérdida de coordinación de los grupos de músculos en el pie y la pierna, los cuales aumentan las tensiones mecánicas durante la deambulación. La diabetes es también conocida por estar asociada con una variedad de alteraciones en el metabolismo del tejido conectivo, como resultado de las cuales los diabéticos se enfrentan al problema de mala cicatrización. La pérdida de colágeno asociada con la diabetes puede ser debido a niveles bajos de la síntesis o el metabolismo mejorado de colágeno recién sintetizado o ambos. Estas anomalías cualitativas y cuantitativas contribuyen al deterioro de la cicatrización de las heridas observado en pacientes diabéticos.

Entre otras vías descritas anteriormente, la vía de los polioles se ha implicado como un mecanismo de varias lesiones de órganos (incluyendo las úlceras de pie diabético) inducidas por la alta concentración de glucosa. Los resultados de los estudios etiológicos sugieren que la hiperglicemia induce complicaciones relacionadas con la diabetes a través de la acumulación de sorbitol y la glicación de proteínas. La vía de poliol consta de dos etapas. La primera es la conversión de glucosa a sorbitol, y la segunda es la conversión de sorbitol en fructosa. La enzima clave es la aldosa reductasa que convierte la glucosa en sorbitol. Esta enzima se encuentra en muchos tejidos.

Los inhibidores de la aldosa reductasa existentes incluyen moléculas tales como tolrestat, zopolrestat, fiderestat, y epalrestat. Las presentes invenciones proporcionan la primera evidencia de la actividad inhibidora de ciertos bloqueadores beta-adrenérgicos de la aldosa reductasa tales como esmolol, propranolol, y timolol. La actividad inhibidora de aldosa reductasa actualmente descubierta de ciertos beta-adrenérgicos los posiciona como medicamentos para el tratamiento de enfermedades mediadas por la aldosa reductasa, como las complicaciones diabéticas. El aumento de la actividad de la aldosa reductasa resulta en una mayor acumulación de sorbitol, dando lugar a varias complicaciones diabéticas. La presente invención proporciona el descubrimiento de la actividad inhibidora de la aldosa reductasa por bloqueadores beta-adrenérgicos y su uso en el tratamiento de las complicaciones diabéticas, tales como la cicatrización heridas diabéticas.

La acumulación de sorbitol en las células causa varias lesiones de órganos que conducen a la microangiopatía cutánea. Hay muchos mecanismos por los cuales la diabetes pueden causar microangiopatía. Estos incluyen la formación en exceso de sorbitol, el aumento de la glicación, daño oxidativo, y el exceso de actividad de la proteína C quinasa. Todos estos procesos se producen en la piel, y la existencia de una microangiopatía cutánea diabética ha sido bien demostrada. Estos cambios microangiopáticos están asociados con anomalías de la perfusión cutánea. Porque la piel desempeña un papel regulador térmico, hay considerable redundancia capilar en la piel normal. En pacientes diabéticos, la pérdida de los capilares se asocia con una disminución de la reserva de perfusión. El fracaso de la perfusión microvascular asociada con cumplir los requerimientos del metabolismo de la piel puede dar lugar a lesiones en la piel en diversos pacientes con diabetes, *por ejemplo*, heridas diabéticas.

La neuropatía es otra complicación común de la diabetes, causada por la activación de la vía de los polioles. Los pacientes con úlceras del pie diabético en las superficies plantares, medial y lateral de los pies casi todos tendrán neuropatía periférica clínicamente significativa. El daño a los nervios resultante se manifiesta como neuropatía periférica, que predispone al paciente al desarrollo de úlceras diabéticas. La patología de la neuropatía diabética implica estrés oxidativo, productos finales avanzados de glicosilación, el flujo de la vía poliol, y la activación de la proteína quinasa C, los que contribuyen a la enfermedad microvascular y disfunción de los nervios que se ve en las heridas diabéticas.

El aumento de la presión osmótica y el estrés oxidativo se han propuesto como otros mecanismos por los que está implicada la vía poliol en células y lesiones tisulares. En consecuencia, los inhibidores de la aldosa reductasa mejoran la perfusión cutánea, inducen la regeneración de nervios y disminuyen el estrés oxidativo que conduce a la cicatrización de las heridas diabéticas.

Los métodos y composiciones de la presente invención están diseñados para detectar, tratar y controlar a los pacientes diabéticos con pobre capacidad de cicatrización de heridas basado en la medición de la síntesis de óxido nítrico (NO) en muestras tomadas del paciente en condiciones controladas. La invención señala que los pacientes diabéticos representan un espectro continuo de la capacidad sintética de NO, y que los diabéticos en el extremo inferior del espectro tienen la cicatrización de heridas deteriorada.

Recientes investigaciones sobre el papel del NO en la inflamación de heridas, reparación de tejidos, y la homeostasis microvascular revela que el NO es un regulador fundamental de la cicatrización de heridas (D Bruch-Gerharz, T Ruzicka, V Kolb-Bachofen. *J Invest Dermatol.* 110, 1 (1998); M R Schaffer y otros, *Surgery* 121, 513 (1997)). Una deficiencia sistémica de NO derivado del endotelio se ha observado en todos los diabéticos (A Veves y otros, *Diabetes*, 47, 457 (1998); M Huszka y otros, *Thrombosis Res*, 86(2), 173 (1997); S B Williams, J A Cusco, M A Roddy, M T Hohnston, M A Creager, *J. Am. Col. Cardiol.*, 27(3), 567 (1996)), lo que sugiere que el NO desempeña un papel fundamental en la patogénesis de las úlceras crónicas, que no cicatrizan de las extremidades inferiores (LEU). Por consiguiente, existe una necesidad de correlacionar la producción de NO con la capacidad de cicatrización de heridas en diabéticos. Tal correlación permitiría el desarrollo de métodos para predecir la capacidad de cicatrización de las heridas de los diabéticos en base a su producción de NO y proporcionaría un indicador clínico útil que podría servir como base para escoger la terapia apropiada.

NO es un pequeño radical libre gaseoso hidrofóbico, que es un importante mediador fisiológico de las funciones autónomas tales como la vasodilatación, neurotransmisión, y el peristaltismo intestinal. El NO proporciona la señalización celular mediante la activación de su molécula diana, la guanilato ciclasa, que eleva las concentraciones intracelulares de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) (J S Beckman, en *Nitric Oxide*, J. Lancaster, Jr., Ed. (Academic Press, N.Y.), capítulo. 1). La señalización celular se lleva a cabo sin la mediación de canales o receptores de membrana celular y es dependiente de la concentración de NO en el entorno celular. El NO tiene una vida media de aproximadamente cinco segundos en los tejidos biológicos. Se genera por tres isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS), que metaboliza la L-arginina y el oxígeno molecular a citrulina y NO. Dos de las tres isoformas son sistemas enzimáticos constitutivos (cNOS) que se describen en las células neuronales (nNOS) y en las células endoteliales (eNOS) (D Bruch-Gerharz, T Ruzicka, V Kolb-Bachofen. *J Invest Dermatol.* 110, 1 (1998)). Con estas isoformas, los niveles elevados de calcio intracelular activan las enzimas a través de la calmodulina. Los sistemas cNOS dependientes de calcio producen bajas concentraciones (picomolar) de NO. El tercer sistema es la isoforma inducible (iNOS), que es

independiente de calcio. La expresión de iNOS es inducida por estímulos específicos de tejido tales como citocinas inflamatorias o lipopolisacáridos (LPS) bacterianos. La isoforma inducible libera NO en mucho más altas (nanomolar) concentraciones que cNOS, y tiene potentes efectos citotóxicos.

5 Las enzimas cNOS están involucradas en la regulación y el mantenimiento de la homeostasis de la piel (S Moncada, A Higgs, N Eng J Med 329, 2002 (1993)). Las enzimas iNOS parece estar principalmente asociada con respuestas inflamatorias e inmunes que están también implicadas en ciertas enfermedades de la piel. Los queratinocitos de piel humana, los fibroblastos y las células endoteliales poseen tanto los cNOS como las isoformas de iNOS. Los macrófagos de heridas y los queratinocitos poseen la isoforma iNOS. En los estudios de cicatrización de heridas la síntesis de NO se ha demostrado que ocurre durante periodos prolongados (10-14 días) después de haberse hecho la herida y los macrófagos parecen ser la principal fuente celular M R Schaffer, U Tantry, R A vanWesep, A Barbul. J Surg Res, 71, 25 (1997)). Como mediador de la reparación tisular, el NO se ha demostrado que promueve la angiogénesis (A Papapetropoulos, G Garcia-Cardena, J A A Madri, W C Sissa. J Clin Invest, 100(12), 3131 (1997)) y la migración celular (Noiri y otros, Am. J. Physiol. 279:C794 (1996)), aumenta la deposición de colágeno en la herida y el entrecruzamiento del colágeno (M R Schaffer, U Tantry, S S Gross, H L Wasserburg, A Barbul. J Surg Res, 63, 237 (1996)), regula la homeostasis microvascular (vasodilatación) (D Bruch-Gerharz, T Ruzicka, V Kolb-Bachofen. J Invest Dermatol. 110, 1 (1998)), inhibe la agregación plaquetaria (J S Beckman, en Nitric Oxide, J. Lancaster, Jr., Ed. (Academic Press, N.Y.), capítulo. 1), inhibe la formación de adhesiones de leucocitos al endotelio (A M Lefer, D J Lefer, Cardiovascular Res. 32, 743 (1996)), modula la proliferación endotelial y la apoptosis (Y H Shen, X L Wang, D E Wilcken, FEBS Lett, 433(1-2), 125 (1998)), incrementa la viabilidad de colgajos cutáneos al azar (SC Um y otros, Plast Reconstr Surg. 101 785 (1998); G F Pierce y otros, Proc Natl Acad Sci USA. 86, 2229 (1989)), y mejora la citotoxicidad bacteriana y la inmunomodulación celular (J S Beckman, en Nitric Oxide, J. Lancaster, Jr., Ed. (Academic Press, N.Y.), capítulo 1).

25 En los diabéticos, la reparación normal de las heridas puede verse significativamente afectada. Generalmente, durante el proceso de cicatrización de heridas, el NO proporciona una mejora de la disponibilidad de oxígeno tisular, la mediación inflamatoria de los mecanismos de reparación y el desarrollo de la matriz de la herida y la remodelación. La principal vía metabólica para el NO es hacia el nitrato y el nitrito, que son metabolitos estables dentro de tejidos, plasma y orina (S Moncada, A Higgs, N Eng J Med 329, 2002 (1993)). Los estudios de seguimiento en seres humanos han demostrado que quizás el 50% del total de nitrato /nitrito en el cuerpo se origina del sustrato para la síntesis de NO, L-arginina (P M Rhodes, A M Leone, P L Francis, A D Struthers, S Moncada, Biomed Biophys Res. Commun. 209, 590 (1995); L. Castillo y otros, Proc Natl Acad Sci USA 90, 193 (1993). Aunque el nitrato y el nitrito no son medidas de NO biológicamente activo, las muestras se obtienen de plasma y orina de sujetos después de un período adecuado de ayuno, y opcionalmente después de la administración de una dieta controlada (bajo nitrato/baja arginina), lo permite el uso de nitrato y nitrito como un índice de la actividad de NO (C Baylis, P Vallance, Curr Opin Nephrol Hypertens 7, 59 (1998)).

40 La invención proporciona un método para determinar si un sujeto diabético es un diabético que cicatriza las heridas o un diabético que no cicatriza las heridas. Un "diabético que cicatriza las heridas" se refiere a un sujeto diabético cuya capacidad de cicatrización de heridas es aproximadamente la misma que la de un sujeto no diabético. Un "diabético que no cicatriza las heridas" se refiere a un sujeto diabético cuya capacidad de cicatrización de heridas se reduce con respecto a la de un sujeto no diabético y que por consiguiente está en riesgo de úlceras de las extremidades inferiores (LEU). Por ejemplo, en un estudio clínico, diabéticos que no cicatrizan las heridas se consideraron que son pacientes con una historia de una o más úlceras de pie diabético con la cicatrización incompleta después de 20 semanas de tratamiento con Regranex.RTM. Un ser humano o animal con una afección diabética es un ser humano o animal, cuya regulación de la concentración de glucosa en plasma es defectuosa, por lo general como resultado de una producción insuficiente de insulina o resistencia a los efectos fisiológicos de la insulina. Por ejemplo, el sujeto puede ser un paciente humano que ha sido diagnosticado por un médico que tiene diabetes ya sea de tipo I o tipo II.

50 Un sujeto de acuerdo con la invención puede ser cualquier ser humano o animal con una afección diabética como la diabetes mellitus. El animal puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un canino, felino, primate, bovino, ovino, porcino, camélido, caprino, roedor, o equino. Preferentemente, el sujeto es un humano.

#### Métodos de Administración

55 Un aspecto de la invención contempla el uso de bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables de éstos en el tratamiento de afecciones, incluyendo complicaciones diabéticas que surgen de cualquier forma de diabetes.

60 El bloqueador beta-adrenérgico puede incluir, pero sin limitarse a, acebutolol, alprenolol, amosulalol, arotinolol, atenolol, befunolol, betaxolol, bevantolol, bisoprolol, bopindolol, bretilol, bucumolol, bufetolol, bufuralol, bunitrolol, buprandolol, bupranolol, butofilolol, carazolol, carteolol, carvedilol, celiprolol, cetamolol, cinamolol, cloranoni,decanoilo, dodecanoilo, dilevatol, entbutolol, epanolol, esmolol, fumolol, indenolol, istalol, labetalol, levobetaxolol, levobunotol, mepindolol, metipranolol, metiproporanolol, metoprolol, moprolol, miristoilo, nadolol, nadoxolol, nebevoloil; nipradilol, octanoilo,

5 optipranolol, oxprenolol, palmitoilo (patente de Estados Unidos núm. 4897417), penbutolol, perbutolol, pindolol, practolol, pronetalol, propranolol, protoquilol, sotalol, estanozolol, sulfinalol, talindol, tertatolol, tillisolol, timolol, toliprolol, trasilol, xibenolol, bloqueadores adrenérgicos, sus profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de éstos. Los profármacos de éstos incluyen todos los derivados de bloqueadores beta-adrenérgicos que puede entregar el  
 5 bloqueador beta-adrenérgico en el metabolismo en el cuerpo. Por ejemplo, todos los derivados de esmolol pueden ofrecer esmolol sobre el metabolismo de los profármacos potenciales de esmolol.

10 El esmolol se ha encontrado que trata las complicaciones diabéticas tales como las heridas diabéticas mediante diversos mecanismos, incluyendo, pero sin limitarse a, la inducción de la producción de óxido nítrico, aumento del nivel de colágeno en la herida diabética, el aumento de la perfusión vascular a modo de mejorar la neo-angiogénesis en la herida diabética; aumento del suministro de oxígeno a través de la perfusión vascular mejorada en la herida diabética; inhibición el aumento de la actividad de la aldosa reductasa en el paciente diabético, la mejora de factores de crecimiento, tales como factores de crecimiento nervioso, factores de crecimiento epitelial vascular, factores de crecimiento endoteliales, de crecimiento derivado de plaquetas factores de la herida diabética, y combinaciones éstos.

15 Los bloqueadores beta-adrenérgicos de la presente invención pueden tener actividad mediada por la aldosa reductasa. Los bloqueadores beta-adrenérgicos que tienen la actividad mediada por la aldosa reductasa pueden incluir, pero no se limitan a, esmolol, timolol, o propranolol. Los bloqueadores beta-adrenérgicos que tienen la actividad mediada por la aldosa reductasa son especialmente útiles en el tratamiento de las complicaciones diabéticas. Por ejemplo, el esmolol  
 20 es un bloqueador beta-adrenérgico preferente para el tratamiento de la cicatrización de heridas diabéticas. Sin embargo, todos los bloqueadores beta-adrenérgicos pueden ser útiles en el tratamiento de cualquier complicación diabética contemplada.

25 Los bloqueadores beta-adrenérgicos, profármacos y sales de éstos destinados a la cicatrización de heridas son preferentemente administrados por vía tópica en un portador fisiológicamente aceptable a un sujeto. Sin embargo, para el tratamiento de complicaciones diabéticas distintas de heridas diabéticas, los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables también se pueden administrar en una variedad de maneras, incluyendo pero sin limitarse a las vías de administración oral, administración oftálmica, administración parenteral, incluyendo la tópica, subcutánea (s.c.), subdural, intravenosa (i.v.), intramuscular (i.m.), intratecal, intraperitoneal (i.p.),  
 30 vía intracerebral, intraarterial, o intralesional, localizadas (*por ejemplo*, aplicación quirúrgica o supositorio quirúrgica), y pulmonar (*por ejemplo*, aerosoles, inhalaciones, o en polvo) y como se describe más adelante.

35 La dosificación correcta de una composición farmacéutica que comprende compuestos con los antagonistas de los receptores beta-adrenérgicos variará de acuerdo con la formulación farmacéutica, el modo de aplicación, así como el sitio particular, el huésped, y la complicación diabética a tratar. Otros factores como la edad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la condición del huésped, las combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción y gravedad de la enfermedad pueden ser fácilmente tomados en cuenta por un profesional del tratamiento o un experto en la técnica

40 La administración puede llevarse a cabo de forma continua o periódicamente dentro de la dosis máxima tolerada. La administración puede llevarse a cabo, por ejemplo, cada hora, cada dos horas, cada tres horas, una vez cada seis horas, una vez cada doce horas, diarias, semanales, cada dos semanas, cada tres semanas o mensuales, según sea necesario.

45 La vía de administración tópica es una vía preferente para el tratamiento de complicaciones diabéticas tales como las heridas diabéticas que no cicatrizan. Las composiciones adecuadas para la administración tópica pueden incluir cremas, lociones, jabones, champús, aerosoles, bálsamo, gel, suero, espuma modeladora, parche, inhalador a presión, de bolita, solución tópica, barra, toallita, producto para el cuidado de los pies, ungüento, paño, emulsión, cosmético, hisopo tópico y cualquier combinación de éstos.

50 En consecuencia, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la administración tópica, para el tratamiento de la cicatrización de heridas diabéticas, que comprende un bloqueador beta-adrenérgico, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y un portador tópico farmacéuticamente aceptable, vehículo, o diluyente. La composición tópica es preferentemente en forma de una crema, ungüento, hisopo tópico, emulsión,  
 55 atomizador o loción. La composición se puede proporcionar en forma de liberación sostenida.

60 En el tratamiento de la cicatrización de heridas diabéticas, el esmolol se ha encontrado útil. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la administración tópica, para el tratamiento de la cicatrización de heridas diabéticas, que comprende esmolol, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y un portador tópico farmacéuticamente aceptable, vehículo, o diluyente. La composición tópica que comprende esmolol está preferentemente en la forma de un gel, un parche, solución tópica, crema, ungüento, hisopo tópico, emulsión, atomizador o loción. La composición se puede proporcionar en forma de liberación sostenida.

- 5 Dependiendo de la manera de introducción, los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables se pueden formular en diversas formas. La concentración del ingrediente terapéuticamente activo en una formulación para la administración tópica puede variar de una concentración de aproximadamente 0.001% a 50.0%. Preferentemente, la concentración del ingrediente terapéuticamente activo en una formulación para la administración tópica puede variar de una concentración de aproximadamente 0.01% a 40.0%. Más preferentemente, la concentración del ingrediente terapéuticamente activo en una formulación para la administración tópica puede variar de una concentración de aproximadamente 0.001% a 20.0%.
- 10 Existen referencias de las actuales formulaciones tópicas de los beta-bloqueadores en las formas de soluciones oftálmicas (gotas) y geles oftálmicos para el tratamiento de la presión intraocular mejorada (IOP). Los parches transdérmicos de beta-bloqueadores para el tratamiento de condiciones cardíacas también se han preparado (Solicitud de Patente Internacional núm. WO/2000/035439/patente de los Estados Unidos núm.. 5362757). Sin embargo, no hay referencias existentes de la formulación de los beta-bloqueadores adrenérgicos para la aplicación tópica a la piel o dermis. La presente invención proporciona la formulación de los bloqueadores beta-adrenérgicos, tales como esmolol, como una aplicación tópica.
- 20 En el tratamiento de complicaciones diabéticas tales como las heridas diabéticas, una composición que contiene hidrocioruro de esmolol como ingrediente activo puede ser ventajosamente administrado a sujetos que lo necesitan por medio de una preparación tópica, que tiene una concentración de hidrocioruro de esmolol de aproximadamente 0.001% a 50.0%.
- 25 Preferentemente, los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables se formulan para la administración tópica en un portador inerte adecuado. Por ejemplo, la concentración de los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables en la solución portadora está típicamente entre aproximadamente 0.1 % a aproximadamente el 50.0%. La dosis administrada se determinará por la vía de administración.
- 30 La concentración del ingrediente terapéuticamente activo en una formulación para la administración oral puede variar de una concentración de aproximadamente 1 mg a 1000 mg. La concentración del ingrediente terapéuticamente activo en una formulación para la administración oftálmica puede variar de una concentración de aproximadamente 0.001% al 10.0%.
- 35 Para la administración parenteral, los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables de la invención se pueden administrar como dosis inyectables de una solución o suspensión de la sustancia en un diluyente fisiológicamente aceptable con un portador farmacéutico, que puede ser un líquido estéril tal como agua y aceites con o sin la adición de un tensioactivo. Otros diluyentes aceptables incluyen aceites de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, el aceite de cacahuete, aceite de soya, y aceite mineral. Generalmente, los glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicol (PEG) son portadores líquidos preferentes, particularmente para soluciones inyectables.
- 40 Los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables de esta descripción se pueden administrar en forma de una inyección de depósito o una preparación de implante, que puede formularse de tal manera que permita una liberación controlada o sostenida de ingrediente(s) activo(s).
- 45 De acuerdo con un aspecto de la descripción, un bloqueador beta-adrenérgico, su profármaco, o sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar solos, o en combinación con otros agentes como se analizó anteriormente para tratar y/o mejorar un estado tal como las complicaciones diabéticas que se producen a partir de cualquier forma de la diabetes. Estos reactivos también se pueden usar en la preparación de un medicamento para uso en el tratamiento de un paciente. La administración de agentes terapéuticos para el tratamiento de afecciones relacionadas con la diabetes se puede producir antes, durante, o después de la administración con los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables. La administración a sujetos de los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables puede ocurrir antes, durante o después de cualquier otra modalidad de tratamiento de la diabetes. La administración de los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables a los sujetos puede producirse cada hora, diariamente, semanalmente o mensualmente, según sea necesario, en base a la gravedad de la herida y de otros factores bien conocidos por el proveedor médico experto. Preferentemente, los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables se administran semanalmente durante una o más semanas. El régimen preferente para el tratamiento es la aplicación tópica continua o intermitente de la formulación preferente variando según el perfil del paciente así como la ubicación y gravedad de la herida diabética.
- 50
- 55
- 60 Las composiciones farmacéuticas que comprenden los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables también pueden incluir portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos, que son vehículos comúnmente usados para formular composiciones farmacéuticas para la administración

animal o humana. Las formulaciones también pueden contener aditivos convencionales, tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

5 Las composiciones se pueden formular para la liberación sostenida. Los bloqueadores beta-adrenérgicos, sus profármacos, o sales farmacéuticamente aceptables de esta invención se pueden administrar en una forma de liberación sostenida, por ejemplo una inyección de depósito, una preparación de implante, o una bomba osmótica, que pueden formularse de tal manera que se permita la liberación sostenida del ingrediente activo. Los implantes para las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidos en la técnica. Los implantes se formulan como microesferas, tabletas, etc., con polímeros biodegradables o no biodegradables. Por ejemplo, los polímeros de ácido láctico y/o ácido glicólico forman un polímero erosionable que el huésped tolera bien.

15 La presente descripción proporciona además métodos de tratamiento de las complicaciones diabéticas mediadas por la aldosa reductasa, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un bloqueador beta-adrenérgico, un profármaco de éste, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste que tiene la actividad mediada por la aldosa reductasa. Preferentemente, el bloqueador beta-adrenérgico se esmolol, timolol, o propranolol. Las complicaciones diabéticas mediadas por la aldosa reductasa pueden incluir, pero no se limitan a, neuropatía diabética, nefropatía diabética, la miocardiopatía diabética, retinopatía diabética, catarata diabética, cistopatía diabética, queratopatía corneal diabética, dermatopatía diabética, microangiopatía diabética, infarto del miocardio, edema macular, deterioro de la conducción neural y heridas diabéticas.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1

#### 25 Estudios de inhibición de la Aldosa Reductasa (AR):

Para los estudios de inhibición de la enzima, se usó aldosa reductasa recombinante humana purificada (expresada en *E. coli*) para probar la actividad inhibidora de los antagonistas beta-adrenérgicos de la aldosa reductasa (AR) mediante un método espectrofotométrico, usando gliceraldehídos como sustrato, (Mol. Vis. 2004, 10, 148-154).

#### 30 Materiales:

35 Se compraron DL-gliceraldehído, glucosa, sulfato de litio, 2-mercaptoetanol, NADPH, dimetilsulfóxido, medio TC-199 (M-3769), sorbitol, sorbitol deshidrogenasa, NAD, y glutatión reductasa de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Los antagonistas beta-adrenérgicos, incluyendo timolol, esmolol, sotalol, neбивolol, carvedilol, metoprolol y labetalol, usados en el experimento se obtuvieron como ingredientes farmacéuticos activos puros (APIs) de proveedores comerciales locales. Las sales de beta antagonistas usados para los experimentos son: maleato de timolol, hidrocloreuro de sotalol, hidrocloreuro de labetalol, metoprolol tartrato, hidrocloreuro de neбивolol, hidrocloreuro de esmolol y clorhidrato de propranolol.

#### 40 Aldosa Reductasa de Cristalinis de Ratas:

45 La aldosa reductasa cruda (AR) se preparó a partir de los cristalinis de ratas. Los globos oculares se retiraron de ratas macho de 9 semanas de edad WNIN obtenidas del Centro Nacional de Servicios de Laboratorio Animal, Instituto Nacional de Nutrición, Hyderabad, India. El cuidado de los animales y los protocolos están en conformidad con y aprobados por el Comité de Ética Animal Institucional. Los cristalinis se disecaron por abordaje posterior, y se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón de fosfato de potasio 100 mM pH 6.2. El homogeneizado se centrifugó a 15,000x g durante 30 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante se usó como la fuente de la AR.

#### 50 Purificación de la aldosa reductasa recombinante humana:

55 La aldosa reductasa recombinante humana se purificó a partir de cultivos bacterianos. La enzima a partir de cultivos de expresión se extrajo y se purificó esencialmente como se ha descrito previamente (J Biol Chem 1992; 267: 24833- 40) con la excepción de que la cromatografía de afinidad sobre AffiGel Blue (Bio-Rad) se usó como una etapa de purificación final.

#### Ensayo de la aldosa reductasa (AR):

60 La actividad de AR se ensayó según el método descrito por Hayman y Kinoshita (J Biol Chem 1965; 240: 877-82). La mezcla de ensayo en 1 ml contenía 50 µM de tampón de fosfato de potasio pH 6.2, sulfato de litio 0.4 mM, 5 µM 2-mercaptoetanol, DL-gliceraldehído 10 µM, NADPH 0.1 µM, y la preparación de la enzima (cristalinis de ratas o enzima recombinante). Los blancos apropiados fueron empleados para las correcciones. La mezcla de ensayo se incubó a 37

°C y se inició mediante la adición de NADPH a 37 °C. El cambio en la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADPH fue seguido en un espectrofotómetro Cary Bio 100.

**Estudios de Inhibición:**

5

Para los estudios de inhibición de poblaciones concentradas de los antagonistas beta-adrenérgicos, se prepararon en agua timolol, esmolol, sotalol, nebivolol, carvedilol, metoprolol y labetalol . Varias concentraciones de antagonistas beta-adrenérgicos, como compuestos de ensayo, se añadieron a la mezcla de ensayo y se incubó durante 5-10 minutos antes de iniciar la reacción por NADPH como se describió anteriormente. El porcentaje de inhibición con los compuestos de ensayo se calculó considerando la actividad de AR, en ausencia del inhibidor fue de 100%. La concentración de cada muestra de ensayo que produce una inhibición del 50% (IC<sub>50</sub>) se estimó después.

10

**Tabla 1:** Valores inhibitorios IC<sub>50</sub> de la aldosa reductasa en µM de antagonistas beta-adrenérgicos

Antagonista del receptor Beta adrenérgico	IC <sub>50</sub> (µM)
Esmolol	160
Timolol	250
Propranolol	350
Sotalol	>350
Nebivolol	>350
Carvedilol	>350
Metoprolol	>350
Labetalol	>350

15 **Ejemplo 2**

**Estimación de sorbitol en los glóbulos rojos**

20

Los compuestos que mostraron una inhibición efectiva de la aldosa reductasa (esmolol, timolol, propranolol) se ensayaron para determinar su potencial para inhibir la formación de sorbitol en los glóbulos rojos (RBC). Las células se incubaron con glucosa 30 mM *in vitro*. El sorbitol se estimó por el método informado por Malone, y otros Diabetes; 1980; 29: 861-864.

**Tabla 2:** Concentración de sorbitol en RBC

Sr. No.	Condición	Sorbitol (µg/ml)
1.	RBC bajo condiciones normales	12.13
2.	RBC bajo glucosa 30 mM	21.83
3.	RBC bajo glucosa 30 mM + 150 µM de esmolol	16.16
4.	RBC bajo glucosa 30 mM + 250 µM de timolol	17.34
5.	RBC bajo glucosa 30 mM + 350 µM de propranolol	18.25

25

**Ejemplo 3**

**Experimentos en animales : cicatrización de heridas diabéticas**

30

Las ratas Wistar se mantuvieron en jaulas estándar de roedores tratadas en autoclave con comida libremente (Dieta Harland Tekland para roedores irradiados) y agua tratada en autoclave. Las ratas se alojaron con alimentos Harlan Tek en aisladores microestáticos mantenidas a 72° F, 60 % de humedad, y un ciclo de 12 horas de luz. Los animales se mantuvieron en la instalación durante 10 días para familiarizarse con el medio ambiente, después de la llegada del proveedor. La diabetes se indujo en las ratas mediante inyección intraperitoneal de 50mg/kg de peso corporal de estreptozocina en 5 días consecutivos. La herida se creó en la rata mediante el uso de un rascador para hacer una incisión de 2 mm con 0.57 a 0.62 mm de profundidad en la piel dorsal del animal. El área se afeitó y desinfectó con yodo de Lugol normal antes de usar el rascador.

35

**Administración del compuesto y manejo de la herida:**

5 Se administró clorhidrato de esmolol (10%) tres veces al día o el control del tratamiento estándar, untando el agente directamente sobre la herida. El control positivo usado fue el factor de crecimiento derivado de plaquetas que está disponible comercialmente. El tratamiento se continuó hasta que las heridas de los ratones tratados se curaron completamente.

10 Las heridas se lavaron con solución salina normal, y el líquido irrigado se recogió y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el sedimento se tiñó y se observó bajo un microscopio de alta potencia para la presencia de células anormales. Además, el material de sedimento se diluyó en 1 ml de medio RPMI 450 y el número de macrófagos se determinó mediante el uso de un hemocitómetro.

**Resultados de los experimentos en animales:**

15 Se observó que la herida original en la rata tratada con el vehículo no sanó y aún tenía una costra (día 27) después haberse hecho la herida, mientras que la herida se había curado completamente en la piel de los animales tratados y también se observó el cierre de la herida.

20 Se midieron varios parámetros de cicatrización de heridas en el día 3, día 7, día 12 y día 19 de la creación de la herida. Estos parámetros se informan en tablas separadas más abajo. Se midieron el tamaño de la herida y el peso de las ratas en días alternos. Específicamente, la longitud y el ancho de la herida se midieron por el uso de micro calibradores vernier, y la resistencia a la tracción en el borde de la herida también se registró en días alternos. El diámetro de la herida se midió por el mismo investigador en el día 3, 12, 19 mediante el uso de un calibrador vernier, digital electrónico (B&D, Pompano, NJ). El calibrador se calibró justo antes de la medición ajustando el error en cero. La disminución del diámetro de la herida se informa en la Tabla 1.

**Tabla 1: Disminución del Diámetro de las Heridas**

	Día 3	Día 12	Día 19	% Disminución
<b>Controles (MM)</b>	1.27 +/- 0.12	3.78 +/- 0.24	7.89 +/- 0.31	--
<b>Control positivo</b>	1.16 +/- 0.12	1.35 +/- 0.19	1.47 +/- 0.34	536%
<b>Esmolol</b>	1.28 +/- 0.12	1.37 +/- 0.17	0.79 +/- 0.28	998%

30 La contracción de la herida se midió con el calibrador de tensión (Harvard apparatus, Quincy, MA) y los resultados se proporcionan en la Tabla 2.

**Tabla 2: Diámetro de la Herida: Grado de Contracción (%)**

	Día 3	Día 12	Día 19
<b>Controles</b>	12.46 +/- 5.8	26.78 +/- 11.4	58.76 +/- 9.9
<b>Control positivo</b>	11.98 +/- 6.2	37.71 +/- 12.4	86.14 +/- 10.2
<b>Esmolol</b>	12.17 +/- 5.8	41.86 +/- 13.2	98.64 +/- 9.6

35 El área para la evaluación se le hizo un corte limpio mediante bisturí Eppendorf tamaño 10 y el tejido se conservó en solución de formalina tamponada al 10% en fosfato. Los tejidos se retiraron de esta solución de formalina y se sumergieron en etanol al 100% durante 6 horas. El tejido se retiró de nuevo y se conservó para la evaluación en solución de Bouin al 10%. Los parámetros de la biopsia de la herida se informan en la Tabla 3.

40 **Tabla 3: Evaluación de las Biopsias de las Heridas en Ratas Diabéticas**

	Día 3	Día 7	Día 12	Día 19	Total
<b>Controles</b>	1.2 +/- 0.4	2.3 +/- 0.3	2.9 +/- 0.3	4.5 +/- 0.4	10.9 +/-1.3
<b>Control positivo</b>	1.3 +/- 0.2	1.5 +/- 0.4	1.4 +/- 0.4	1.5 +/- 0.5	5.9 +/-1.4
<b>Esmolol</b>	1.3 +/- 0.3	1.3 +/- 0.2	1.4 +/- 0.3	1.5 +/- 0.3	5.5 +/- 1.1

La epitelización se midió sobre la base de nuevas células epiteliales observadas generadas en la herida observadas al

microscopio de gran alcance. Se midió la puntuación de la formación de la cicatriz mediante el calibrador de vernier digital estándar (B&D, Pompano, NJ). Los resultados se informan en la Tabla 4.

5 **Tabla 4: Tiempo usado para el cierre completo de la herida, Periodo de Epitelización y Formación de Cicatrices**

	Cierre de la Herida (Día)	Periodo de Epitelización (día)	Formación de Cicatriz (Puntuación)
<b>Controles</b>	No cerrada	15.7 +/- 1.8	4.9 +/- 0.5
<b>Control positivo</b>	24.7 +/- 3.4	11.8 +/- 2.1	2.1 +/- 0.5
<b>Esmolol</b>	19.6 +/- 2.2	9.8 +/- 0.8	1.3 +/- 0.4

La cantidad de exudado de la herida se midió mediante el uso de una micropipeta (Eppendorf). Los resultados se informan en la Tabla 5.

10

**Tabla 5: Exudación en µl**

	Día 3	Día 7	Día 12	Día 19	Total
<b>Controles</b>	1.1 +/- 0.3	1.8 +/- 0.4	2.1 +/- 0.8	2.6 +/- 0.7	7.6 +/- 1.9
<b>Control positivo</b>	1.2 +/- 0.3	2.3 +/- 0.3	3.2 +/- 0.3	4.8 +/- 0.2	11.5 +/- 0.97
<b>Esmolol</b>	1.2 +/- 0.2	2.7 +/- 0.5	3.5 +/- 0.6	4.9 +/- 0.2	12.3 +/- 1.1

La transparencia de la herida se midió observando el índice de refracción. Los resultados se informan en la Tabla 6.

15

**Tabla 6: Transparencia de la Película**

	Día 3	Día 7	Día 12	Día 19	Total
<b>Controles</b>	1.8 +/- 0.2	2.7 +/- 0.4	3.7 +/- 0.3	3.8 +/- 0.6	11.0 +/- 1.2
<b>Control positivo</b>	1.7 +/- 0.3	3.1 +/- 0.3	3.8 +/- 0.4	4.1 +/- 0.5	12.3 +/- 0.9
<b>Esmolol</b>	1.7 +/- 0.3	2.3 +/- 0.4	2.6 +/- 0.6	3.3 +/- 0.4	9.9 +/- 1.1

La adherencia de la herida se muestra en la Tabla 7. La adherencia es la fuerza por la cual los dos extremos de la herida se unen entre sí y se midió mediante un medidor de índice de Velcro.

20

**Tabla 7: Adherencia de la Herida**

	Día 3	Día 7	Día 12	Día 19	Total
<b>Controles</b>	2.7 +/- 0.3	2.3 +/- 0.5	2.8 +/- 0.9	3.1 +/- 0.8	10.9 +/- 1.4
<b>Control positivo</b>	2.6 +/- 0.4	3.2 +/- 0.4	3.7 +/- 0.6	4.3 +/- 0.6	13.8 +/- 1.1
<b>Esmolol</b>	2.6 +/- 0.4	3.3 +/- 0.3	3.9 +/- 0.5	4.7 +/- 0.5	14.5 +/- 0.9

La acumulación de fluido se midió en volumen de líquido que se obtiene a partir de la herida usando micro pipeta como se describe en la Tabla 8.

25

**Tabla 8: Acumulación de Fluido**

	Día 3	Día 7	Día 12	Día 19	Total
<b>Controles</b>	2.3 +/- 0.3	2.8 +/- 0.4	3.5 +/- 0.4	3.8 +/- 0.5	12.4 +/- 0.9
<b>Control positivo</b>	2.4 +/- 0.3	2.8 +/- 0.3	3.1 +/- 0.4	2.7 +/- 0.6	11.0 +/- 0.8
<b>Esmolol</b>	2.3 +/- 0.4	2.7 +/- 0.5	2.6 +/- 0.7	2.5 +/- 0.5	10.1 +/- 1.2

30

La facilidad de eliminación de la herida se midió mediante un medidor de índice de velcro y se informa en la Tabla 9.

**Tabla 9: Facilidad de Eliminación de Heridas**

	Día 3	Día 7	Día 12	Día 19	Total
<b>Controles</b>	2.7 +/- 0.2	2.9 +/- 0.1	3.1 +/- 0.5	3.6 +/- 0.5	12.3 +/- 0.5
<b>Control positivo</b>	2.6 +/- 0.4	2.8 +/- 0.3	2.8 +/- 0.4	2.5 +/- 0.3	10.7 +/- 1.1
<b>Esmolol</b>	2.6 +/- 0.2	2,8 +/- 0.3	2.7 +/- 0.5	2.5 +/- 0.4	10.6 +/- 1.4

- 5 La flexibilidad de la herida se midió por la placidez observada por la piel normal del mismo animal en comparación con el área de la herida y se informa en la Tabla 10.

**Tabla 10: Flexibilidad**

	Día 3	Día 7	Día 12	Día 19	Total
<b>Controles</b>	2.1 +/- 0.5	2.7 +/- 0.4	2.3 +/- 0.8	1.9 +/- 0.9	7.0 +/- 0.9
<b>Control positivo</b>	2.2 +/- 0.6	2.4 +/- 0.7	3.7 +/- 1.1	4.0 +/- 0.7	12.3 +/- 3.2
<b>Esmolol</b>	2.3 +/- 0.2	2.4 +/- 0.5	3.5 +/- 0.6	3.9 +/- 0.8	12.1 +/- 2.9

10 **Ejemplo 4**

**Medición del Óxido Nítrico**

- 15 Se añadió tejido fresco (aproximadamente 0.2 g) a 1 ml de tampón de homogeneización frío (20 mmol/l HEPES-KOH, pH 7.9; glicerol al 25%; 420 mmol/l de NaCl; 1.5 mmol /l de MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mmol /l de EDTA; 0.5 mmol /l de ditiotreitól, 0.2 mmol /l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Los tejidos tamponados se homogeneizaron a velocidad máxima durante 5 segundos y se enfriaron en hielo-agua durante 30 segundos. Este procedimiento se repitió cinco veces para asegurar la destrucción completa del tejido.

**Desproteínización:**

- 20 Dos volúmenes de etanol al 100% frío se añadieron a las muestras homogeneizadas; estas se agitaron en vórtex y se incubaron en hielo durante 30 minutos. El homogenado se centrifugó a 12,000 xg durante 5 minutos a 4°C, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo en hielo para la medición de NO.

25 **Medición de nitrito/nitrato:**

- Un analizador de quimioluminiscencia de respuesta rápida se usó para medir la fase total del gas NO (nitrato/nitrito). El gas NO reacciona con el ozono, lo que produce energía en forma de luz, y la luz es proporcional a la cantidad de NO presente. La emisión se midió usando un luminómetro para determinar la concentración de NO.

- 30 El tubo de muestra se conecta de forma segura a un filtro de cero gas (Instrumentos Sievers) y el aire ambiente pasa a través del dispositivo durante 5 minutos. La linealidad de la respuesta del analizador se interpoló usando cuatro calibraciones de repetición (blanco, 1, 10, 50, 100 y 200 mmol/l respectivamente; un límite inferior de <1 nmol/l se demostró para el presente instrumento). Las muestras (10 ml) se inyectaron en un recipiente purgado con helio que contiene 0.8% de cloruro de vanadio en ácido clorhídrico para liberar el NO gaseoso a partir del NO disuelto y nitrito. El gas de muestra se expuso a continuación a la capa de ozono en el recipiente de reacción para formar dióxido de nitrógeno activado (NO<sub>2</sub>), el cual se detectó usando un tubo fotomultiplicador sensible al rojo, y la salida se registró usando un registrador integrado. Para cada muestra, el área bajo la curva se convirtió en la concentración de NO.

40

**Tabla 11: Aumento NO**

	Día 3	Día 7	Día 12	Día 19	Total	% Aumento
<b>Controles</b>	1256	1243	1745	1781	6025	
<b>Control positivo</b>	1179	2317	2431	1927	7854	30%
<b>Esmolol</b>	1219	2657	3231	2115	9222	53%

**Ejemplo 5**

**Medición del Colágeno**

5 La síntesis de los 19 colágenos conocidos ocurre dentro de la célula, como es para otras proteínas. La molécula de colágeno se caracteriza por la secuencia de repetición Gly-X-Y, donde X es a menudo prolina e Y frecuentemente es hidroxiprolina. La hidroxiprolina es el producto final de la degradación del colágeno. Por esta razón, el nivel de hidroxiprolina tisular es una variable indirecta y objetivo de la producción de colágeno tisular. En muchos estudios experimentales, la hidroxiprolina ha sido usada para evaluar la producción de colágeno tisular. Los niveles de colágeno en el tejido se midieron mediante el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para separar y cuantificar los niveles de hidroxiprolina del tejido de rata. Se usaron una columna de fase inversa Nova-Pak C<sub>18</sub> y un sistema de disolvente (acetato sódico 140 mM, trietilamina al 0.05% (TEA), acetonitrilo al 6%), lo que resulta en la completa separación de hidroxiprolina. La recuperación de los estándares varió desde 89 hasta 103% y la variabilidad dentro del ensayo fue <8%. Además, las mediciones de [<sup>3</sup>H]hidroxiprolina se usaron para examinar los cambios en el recambio de colágeno en ratas marcadas con [<sup>3</sup>H]prolina y "cazada" en presencia de prolina no marcada 10 mM.

**Tabla 12: Producción de colágeno**

	<b>Día 3</b>	<b>Día 7</b>	<b>Día 12</b>	<b>Día 19</b>	<b>Total</b>	<b>% Aumento</b>
<b>Controles</b>	139	142	156	173	610	
<b>Control positivo</b>	127	259	243	276	905	48%
<b>Esmolol</b>	124	287	325	288	1024	68%

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica tópica dérmica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de bloqueador beta-adrenérgico que tiene actividad inhibitoria aldosa reductasa, o una sal farmacéuticamente aceptable de éste, y un portador tópico, vehículo, o diluyente farmacéuticamente aceptable, para usar en un método de tratamiento de heridas diabéticas en un mamífero en donde dicha composición se aplica a la piel o la dermis.
- 10 2. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el estrés oxidativo, los productos finales avanzados de la glicosilación, el flujo de la vía de los polioles, y la activación de la proteína quinasa C contribuyen a la enfermedad microvascular y la disfunción de los nervios observada en dichas heridas diabéticas.
- 15 3. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho estrés oxidativo, los productos finales avanzados de la glicosilación, el flujo de la vía de los polioles, y la activación de la proteína quinasa C están también involucrados en la neuropatía diabética.
- 20 4. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha herida diabética es una lesión en la piel que resulta del fallo de la perfusión microvascular para cumplir con los requerimientos del metabolismo de la piel.
- 25 5. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho fallo está asociado con anomalías de la perfusión cutánea, particularmente la pérdida de capilares asociados con la disminución de la reserva de perfusión.
- 30 6. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la microangiopatía diabética está asociada con dichas anomalías de la perfusión cutánea.
- 35 7. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde se administra en una forma de liberación sostenida.
- 40 8. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho bloqueador beta-adrenérgico se selecciona del grupo que consiste en esmolol, propranolol, timolol y sales farmacéuticamente aceptables o solvatos de éste.
- 45 9. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la composición está en la forma de una crema, gel, solución tópica, parche, ungüento, hisopo tópico, emulsión, atomizador o loción.
- 50 10. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho bloqueador beta-adrenérgico es esmolol, involucra un mecanismo que consiste en inducir la producción de óxido nítrico; aumentar el nivel de colágeno en la herida diabética; aumentar la perfusión vascular mediante la vía de la neo-angiogénesis mejorada en la herida diabética; aumentar el suministro de oxígeno mediante la perfusión vascular mejorada en la herida diabética; inhibir la actividad aldosa reductasa aumentada en el paciente diabético; mejorar los factores de crecimiento tales como factores de crecimiento nervioso, factores de crecimiento epitelial, factores de crecimiento del endotelio vascular, factores de crecimiento derivados de plaquetas en la herida diabética, y combinaciones de éstos.
- 55 11. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el mamífero es un primate, canino, felino, bovino, ovino, porcino, camélido, caprino, roedor o equino, preferentemente el primate es un humano.
- 60 12. Un bloqueador beta-adrenérgico que tiene actividad inhibitoria aldosa reductasa, o la sal farmacéuticamente aceptable de éste para usar mediante aplicación tópica dérmica sobre la piel en un método de tratamiento de heridas diabéticas mediadas por la aldosa reductasa en un mamífero.
13. El bloqueador beta-adrenérgico, o la sal farmacéuticamente aceptable de éste para usar de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el bloqueador beta-adrenérgico es esmolol, timolol, o propranolol.
14. El bloqueador beta-adrenérgico, o la sal farmacéuticamente aceptable de éste para usar de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde el mamífero es un primate, canino, felino, bovino, ovino, porcino, camélido, caprino, roedor o equino, preferentemente el primate es un humano.