

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 582**

51 Int. Cl.:

A61K 31/726 (2006.01)
A61K 31/727 (2006.01)
A61K 31/737 (2006.01)
A61K 35/38 (2015.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/14 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2011 PCT/IB2011/051726**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011 WO11132161**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2011 E 11723652 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 2560662**

54 Título: **Sulodexida para uso en el tratamiento de patologías en las que están involucradas metaloproteinasas**

30 Prioridad:

23.04.2010 IT BO20100250

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2017

73 Titular/es:

ALFA WASSERMANN S.P.A. (100.0%)
Via Enrico Fermi, 1
65020 Alanno (PE), IT

72 Inventor/es:

VISCOMI, GIUSEPPE CLAUDIO;
MANNELLO, FERDINANDO y
BRUNO, CRISTIANA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 628 582 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

Sulodexida para uso en el tratamiento de patologías en las que están involucradas metaloproteinasas

La presente invención describe una sulodexida para uso en la reducción de la metaloproteinasa de matriz circulante (MMP), en particular MMP-9.

- 5 La sulodexida y su composición son útiles para el tratamiento de patologías en las que están implicadas las MMP, tales como enfermedad cardiovascular, enfermedad cardiovascular causada por diabetes, venas varicosas, insuficiencia venosa crónica (CVI), úlceras gastrointestinales, enfermedad pulmonar y patologías neoplásicas.

Antecedentes de la invención

- 10 Estudios recientes han demostrado la participación de un grupo de endopeptidasas dependientes de zinc, denominadas metaloproteinasas de matriz (MMP), pertenecientes a la familia de las matrixinas en la alteración vascular de las patologías cardiovasculares.

- 15 La hipertensión venosa es la base de varias patologías relacionadas con trastornos de los trastornos de la macro y microcirculación y que causan infiltraciones de leucocitos en el endotelio, deterioro de las válvulas cardíacas y finalmente proporcionan el remodelado/reordenamiento de la pared de la vena, que puede proporcionar reflujo o la formación de venas varicosas y patologías dermatológicas como se describe por Bergam J. et al. en Ann. Vasc. Surg. 21 (2007), 260-266. Raffetto JD. et al. en Thromb. Res. 123 (2009) S66-S71 describen que las modificaciones observadas durante la progresión de la patología venosa crónica pueden estar asociadas a una alteración del equilibrio hemático entre el nivel de metaloproteinasas de la matriz (MMP) y sus inhibidores tisulares (TIMP).

- 20 Tanto las MMP como los TIMP, involucradas en el remodelado fisiológico de la matriz extracelular, juegan un papel importante también en la comunicación celular.

- 25 Se han encontrado altas concentraciones de MMP en diferentes patologías como describen Mannello F. et al. en Curr. Cancer Drug Targets 5 (2005), 285-298. Entre las MMP, las MMP-9 (Gelatinasa B, EC3.4.24.35 de 92, 130 y 225 kDa) están implicadas en varias patologías, que comprenden patologías neoplásicas que sugieren que su presencia como enzima circulante y su aumento están relacionadas con la progresión de diferentes tipos de cáncer, como en el cáncer de mama, pulmones, ovario y próstata y melanoma, como se describe en Rahko E. et al. en Tumor Biol., 30 (5-6) (2009), 574-64.

- 30 En patologías vasculares patológicas, también causadas por la diabetes, se demuestra claramente el papel patogénico de las MMP. Galis Z.S. et al. en Circ. Res. 90 (2002), 251-262, Kadoglou N.P. et al. en Angiology 56 (2005), 173-189, Derosa G. et al. en Diabetes Metab. 33 (2007), 129-134 y Tayebjee M.H. et al. en Diabetes Care 27 (2004), 2049-2051, describen un mayor nivel de MMP circulante en pacientes diabéticos.

- Raffetto JD. Et al. en Biochem. Pharmacol. 75 (2008), 346-359, demuestran la importancia de las MMP en la enfermedad vascular, informando que el aumento de la degradación de la matriz extracelular (ECM) en la pared venosa, está involucrado en los primeros pasos de la relajación venosa, la formación de venas varicosas, la modificación dérmica y finalmente conduce a la formación de úlceras venosas.

- 35 Entre los diversos mecanismos patológicos vinculados a la mayor expresión de las MMP, las interacciones leucocitos-endotelio son importantes y representan un posible objetivo para el tratamiento farmacológico. Mannello F. et al. describen en Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol. 28 (2008), 611-614, que los leucocitos y las plaquetas contienen cantidades más altas de MMP, que pueden ser liberadas en el medio extracelular consecuentemente a la activación/desgranulación de los leucocitos o durante la agregación plaquetaria. Además, la MMP-9 se libera de plaquetas y leucocitos después de un estímulo tal como las reacciones inducidas por el proceso de coagulación.

- 40 Se sabe que la plasmina, activada durante la fase de coagulación, es a su vez un activador de MMP.

Entre las enzimas proteolíticas presentes en las paredes humanas y potencialmente asociadas a las invasiones de cáncer, se ha demostrado que las MMP están implicadas en la capacidad de degradar casi las proteínas de la matriz intersticial y las membranas basales, permitiendo a las células difundirse e infiltrarse en las paredes vecinas.

- 45 Varios compuestos, tales como receptores de factor de crecimiento de moléculas de adhesión celular, quimiocinas, citoquinas, ligandos apoptóticos y factores angiogénicos pueden interactuar con MMP, modificando tanto su expresión como su actividad.

- 50 Estas enzimas proteolíticas actúan sobre muchos sustratos bioactivos implicados en las etapas de desarrollo neoplásico tales como crecimiento de tumor primario, angiogénesis, extravasación o intravasación de células neoplásicas, migración, invasión de células metastásicas en el órgano secundario, inicio y mantenimiento del crecimiento tumoral.

Se han realizado varios estudios clínicos tanto en modelos animales como en tumores humanos para evaluar la importancia de la reducción de la metaloproteinasa de la matriz circulante. Los resultados obtenidos han conducido a

desarrollar inhibidores sintéticos como se describe por Ramnath N. et al. en Curr. Oncol. Reps. 6 (2004), 96-102.

Los principales inhibidores estudiados comprenden péptidos miméticos y péptidos no miméticos de colágeno, tetraciclinas y derivados de bisfosfonatos.

5 Los ensayos clínicos realizados con los compuestos disponibles han demostrado que los tratamientos prolongados causan dolor musculoesquelético e inflamación. Aunque estos eventos mostraron ser reversibles y los pacientes comenzaron de nuevo el tratamiento después de un período de suspensión corto, los eventos adversos inesperados han limitado las dosis de administración.

10 Además, cuando los ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas se extendieron a un mayor número de pacientes, además de serios problemas toxicológicos debidos a los efectos citostáticos, no se observó ningún beneficio terapéutico significativo, como se describe por Mannello F. et al. en Curr. Cancer Drug Targets 5 (2005), 285-298.

Algunos inhibidores de MMP estudiados en ensayos clínicos son Batimastat, Marimastat, Prinomastat, BAY 12-9566, CGS27023A y derivados de tetraciclinas.

15 Batimastat, BB-94 (WO 90057191), es un derivado del ácido hidroxámico, que imita la estructura peptídica de sustratos naturales. Batimastat es un potente inhibidor de MMP y ha sido el primer inhibidor de MMP usado en ensayos clínicos, pero ha mostrado baja selectividad causada por baja solubilidad y absorción. Además, Batimastat tenía un cumplimiento menor, siendo administrable sólo por inyección en el espacio pleural o abdominal. Los ensayos clínicos de fase III fueron casi inmediatamente suspendidos por efectos secundarios graves, tales como fuerte reacción local tisular inflamatoria, náuseas, dolores abdominales como se informó Tu G. et al. en Curr. Medicina. Chem. 15 (2008), 1388-1395.

20 Marimastat, BB-2516 (WO 9402447), es un derivado de ácido hidroxámico con una estructura similar a Batimastat, pero con una mayor solubilidad y luego una absorción más fácil por administración oral. Marimastat y Batimastat tienen baja especificidad y eran tóxicos en un porcentaje de aproximadamente el 30% de todos los pacientes tratados, mostrando dolores musculoesqueléticos y rigidez, que comienza en las nudillos de las manos y se mueve hacia los brazos y hombros, en especial alrededor de los puntos de inserción tendinosa, *fibrosis* y necrosis de las paredes periarticulares de tobillo y rodilla y trastorno gástrico asociados a la pérdida de peso como se describe por Vihinen et al. en Int. J. Cancer 99 (2002), 157-166.

30 Prinomastat, AG3340 (WO 90720824) es un derivado del ácido hidroxámico, selectivo contra algunas MMP implicadas en la invasión tumoral y metástasis. Durante los ensayos clínicos, aparecieron efectos secundarios en la articulación del hombro, rodilla y manos, y el tratamiento se suspendió inmediatamente, como se describe en Ramnath N. et al. en Curr. Oncol. Reps. 6 (2004), 96-102.

BAY 12-9566, (US 4.705.798) es un derivado del ácido butanoico y en varios ensayos clínicos ha demostrado toxicidad, representada por trombocitopenia, anemia, aumento de enzimas hepáticas y bilirrubina, náuseas, cansancio y cefalea como se describe en Nelson A. et al. J. Clin. Oncol. 18 (2000), 1135-1149.

35 CGS27023A, (US 5.455.258) ha reportado efectos tóxicos con una gran irritación cutánea, mialgia y artralgia.

También los derivados de las tetraciclinas han mostrado graves eventos adversos durante el ensayo clínico, tales como cansancio, confusión mental, náuseas, vómitos, fototoxicidad cutánea, aumento de las enzimas pancreáticas, lo que limitó la dosis administrable, como se describe en Hidalgo M. et al. En J. Natl. Cáncer Inst. 93 (2001), 178-193.

40 La zimografía y la zimografía inversa son técnicas utilizadas actualmente para el análisis de MMP y TIMP en muestras biológicas. Todos los tipos de zimografía con sustratos se originan del método de la zimografía en gelatina. Las técnicas son las mismas excepto que el sustrato difiere dependiendo del tipo de MMP o TIMP. En estas técnicas, las proteínas se separan por electroforesis bajo condiciones desnaturizantes, no reductoras, en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS). La zimografía en gelatina es una técnica utilizada principalmente para la determinación de MMP de gelatinasa y es extremadamente sensible para detectar MMP-2 y MMP-9 a una concentración de pocos picogramos. Debe considerarse que otras MMP, tales como MMP-1, MMP-8 y MMP-13, también pueden degradar el sustrato.

50 La técnica se basa en la separación de electroforesis, en gel de poliacrilamida con un sustrato específico; el SDS desnatura las MMP que se vuelven inactivas y después de la migración por electroforesis, el SDS se retira del gel en un tampón adecuado, que restaura las estructuras y funciones de las MMP. Después de eso, si el gel se incubaba, las gelatinasas activadas digieren la gelatina que se convierte en péptidos de bajo peso molecular, que se eliminan por lavado como se describe por Mannello F. et al. en Clin. Chem. 49 (2003), 339-34.

55 Los geles se colocan en una solución de revelado, por ejemplo, que comprende Coomassie, y luego se decoloran con soluciones que comprenden alcohol metílico o etílico y ácido acético. La zona teñida del gel se debe a la presencia de gelatina no degradada, mientras que la zona no teñida se debe a la actividad enzimática de la MMP. La

actividad enzimática resulta proporcional a la extensión de las bandas transparentes, por lo que se puede analizar y cuantificar con instrumentos densitométricos equipados con analizador de imágenes.

Los zimogramas proporcionan información específica y distinta sobre las MMP y en particular sobre MMP-2 y MMP-9, debido a que las dos enzimas se pueden separar en base a las diferentes movilidades de electroforesis, que dependen de sus pesos moleculares. Para este propósito, para comparar en el mismo gel, se colocan patrones de peso molecular adecuados correspondientes a pro-MMP-2 72 kDa y complejo de pro-MMP-9 y MMP-9 a 92, 130 y 225 kDa.

Mannello F. et al. en Clin. Biochem. 41 (2008), 1466-73, estudiaron el efecto de la adición de heparina de litio de alto peso molecular a muestras de sangre periférica, para evaluar el efecto de la HMWH en la expresión de MMP y TIMP en sangre. El efecto descrito fue que el HMWH tuvo efectos directos e indirectos que alteraron la cantidad de MMP y TIMP circulante y aumentaron la liberación de TIMP-2. El objetivo de esta publicación fue esencialmente describir el efecto de una heparina de alto peso molecular (HMWH) en la expresión de MMP en la manipulación de sangre con el fin de estandarizar el procedimiento de manipulación de muestras de sangre, en un método de medición de MMP. En esta publicación no hay referencias y/o sugerencias con respecto a los usos farmacológicos de la heparina. Además, no se informó de las concentraciones de heparina de litio, en las que se observa el efecto. Como consecuencia, no es posible saber si la concentración de heparina de litio, que proporcionó el efecto observado, podría ser terapéuticamente útil, siendo bien conocido el alto riesgo de sangrado asociado a HMWH. Sin embargo, sabiendo que las heparinas se administran comúnmente por inyección, cualquier posible uso de heparina hecho con el propósito de alterar las concentraciones plasmáticas de MMP, tiene que suponerse que sigue la misma ruta.

El efecto de la heparina sobre la expresión de mRNA de MMP-2 y TIMP-2 también es comunicado por Caenazzo I. et al. en Nephrol. Marcar. Transplant 2001, 16, 1769-75.

Gaddi et al., "Meta-analysis of some results of clinical trials on sulodexide therapy in peripheral occlusive arterial disease", The Journal of International Medical Research, 1996, 24: 389-406, revela el uso de sulodexida en pacientes con enfermedad oclusiva periférica (POAD) y se concluye que la sulodexida es un fármaco recomendado en pacientes diabéticos con POAD con hipertrigliceridemia concomitante e hiperfibrinogenemia.

Verstraete et al., "Novel Antithrombotic Drugs in Development", Drugs 49 (6): 865-884, 1995, ISSN: 0012-6667, proporciona un resumen de los nuevos fármacos anti-trombóticos y una breve descripción sobre sulodexida. Se describe que la sulodexida es eficaz en la prevención de eventos tromboembólicos después del infarto agudo de miocardio.

Condorelli M. y otros, "IPO-V2: A Prospective, Multicenter, Randomized, Comparative Clinical Investigation of the Effects of Sulodexide in Preventing Cardiovascular Accidents in the First Year After Acute Myocardial Infarction", Journal of the American College of Cardiology, Vol. 23, No. 1, 1 de enero de 1994 (1994-01-01), páginas 27-34, XP000882515, ISSN: 0735-1097, describe que el tratamiento con sulodexida reduce la aparición de eventos cardiovasculares, la muerte después del infarto de miocardio y reduce la tasa de formación de trombo ventricular izquierdo.

Coccheri Sergio et al., "Randomised, Double Blind, Multicentre, Placebo Controlled Study of Sulodexide in the Treatment of Venous Leg Ulcers", Thrombosis and Haemostasis, Schattauer GmbH, DE; US, vol. 87, no. 6, 1 de mayo de 2002 (2002-05-01), páginas 947-953, XP008123237, ISSN: 0340-6245, describe el uso de sulodexida en el tratamiento de úlceras en las piernas y concluye que la sulodexida asociada con el tratamiento local proporcionado era eficaz y bien tolerado en el tratamiento de las úlceras venosas de las piernas.

Ofosu F. A., "Pharmacological Actions of Sulodexide", Seminars in Thrombosis and Hemostasis, Stuttgart, DE, vol. 24, no. 2, 1 de enero de 1998 (1998-01-01), páginas 127-138, XP008129231, ISSN: 0094-6176, resume los resultados de algunos de los estudios que han evaluado las propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas, anticoagulantes y anti-trombóticas de la sulodexida.

Coccheri S. et al., "Sulodexide in the treatment of intermittent claudication. Results of a randomized, double-blind, multicenter, placebo-controlled study ", European Heart Journal, vol. 13, Julio 2002 (2002-07), páginas 1057-1065, XP002610488, ISSN: 0195-668X, describe el uso de sulodexida para prevenir la claudicación intermitente relacionada con la enfermedad obstructiva periférica. Se concluye que la sulodexida mejoró la capacidad de caminar de los pacientes con enfermedad arterial obstructiva periférica en un grado significativamente mayor que el placebo.

EP 0 950 413 describe el uso de sulodexida en el tratamiento de la retinopatía de origen diabético y describe que este tratamiento restaura la integridad funcional de las membranas basales del capilar retinoico en peligro por el aumento de la permeabilidad capilar causada por la pérdida de glicosaminoglicanos causada por la patología diabética.

Mannello F. et al., "Matrix metalloproteinase activity and glycosaminoglycans in chronic venous disease: the linkage among cell biology, pathology and translational research", American Journal of Translational Research, vol. 3, no. 2, 1 de noviembre de 2011 (2011-11-01), páginas 149-158, XP008163755, describe la inhibición de la MMP a través de glicosaminoglicanos como representando potencialmente una nueva intervención terapéutica para limitar la

progresión de la vena varicosa a ECV y ulceración de la pierna, sugiriendo una posible oportunidad para prevenir la morbilidad futura y mejorar los beneficios clínicos y la calidad de vida.

5 Saviano M. et al., "Double-blind, double-dummy, randomized, multicentre clinical assessment of the efficacy, tolerability and dose-effect relationship of sulodexide in chronic venous insufficiency", Current Medical Research and Opinion, 1993, GB, vol. 13, no. 2, 1993, páginas 96-108, ISSN: 0300-7995, describe el uso de sulodexida en un estudio clínico en insuficiencia venosa crónica, en el que se comparó la sulodexida en una cápsula con los comprimidos revestidos entéricos. WO-A-2009121959 describe sulodexida para restaurar las funciones del glucocáliz endotelial para su uso en, entre otras, enfermedades vasculares e intestinales.

10 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de encontrar ingredientes activos para preparaciones medicinales, útiles en la reducción de la concentración de MMP en circulación sanguínea en el intento de tratar todas las patologías en las que están implicadas las MMP, como patogénesis de enfermedad inflamatoria, infecciosa o neoplásica o cardiovascular. Entre estas patologías se encuentran, por ejemplo, las patologías derivadas de la diabetes, las venas varicosas, la insuficiencia venosa crónica (CVI), la aterosclerosis, la rotura cardiaca tras el infarto de miocardio, el aneurisma aórtico abdominal, la patología pulmonar, el aumento y progresión del tumor, crecimiento en
15 el tumor primario, angiogénesis anormal, extravasación e intravasación de las células neoplásicas.

Las enfermedades vasculares se seleccionan en el grupo de las venas varicosas, la aterosclerosis humana, la rotura cardiaca después del infarto de miocardio, el aneurisma aórtico abdominal.

Además, existe la necesidad de obtener fármacos, sin ningún efecto secundario o tóxico a dosis terapéuticamente eficaces, aceptables por los pacientes y administrables por vía oral, inyección intramuscular o intravenosa para el
20 tratamiento de todas las patologías en las que están implicadas las MMP.

Se ha encontrado de forma inesperada y es un objeto de la presente descripción que la sulodexida, o uno de sus componentes, en particular el sulfato de dermatán obtenido de sulodexida (SDX-DS) o heparina (SDX-HEP) obtenida de sulodexida, inhiben y/o reducen el nivel de MMP circulantes.

25 Sulodexida es una mezcla natural de glucosaminoglicanos naturales, GAG, extraídos de la mucosa intestinal de mamíferos, como se describe en US 3.936.351, que comprende una mezcla de heparina de movimiento rápido (SDX-HEP), con un peso molecular medio de 7 kDa y sulfato de dermatano (SDX-DS), con un peso molecular medio de 25 kDa. Otros componentes posibles comprendidos en la sulodexida son la condroitina, el sulfato de heparina. La sulodexida tiene que ser considerada como un ingrediente activo único, diferente de otros glucosaminoglicanos, que comprende aproximadamente 80% en peso de SDX-HEP y aproximadamente 20% en peso de SDX-DS. Estos
30 componentes no se han aislado hasta ahora y los componentes de la sulodexida se determinan con método analítico como cromatografía de permeabilidad en gel y electroforesis.

Se sabe que la sulodexida muestra alta afinidad por la antitrombina III y por el cofactor II de heparina, inhibe el factor Xa y la trombina, activa el plasminógeno tisular y reduce el nivel de fibrinógeno tal como se describe en Ofosu F.A. en Semin. Tromb. Hemost. 24 (1998), 127-38 y por Ceriello A. et al. en Diab. Nutr. Metab., 6 (1993), 1-4.

35 Puesto que, se sabe que la activación de la plasmina del plasminógeno es uno del mecanismo de activación local de las MMP, las propiedades conocidas de la sulodexida llevan a concluir que este compuesto habría incrementado la concentración de MMP circulantes.

40 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende sulodexida, o una sal, solvato, hidrato o clatrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una patología en la que están implicadas metaloproteinasas de matriz (MMP), seleccionadas entre la formación de venas varicosas, patologías neoplásicas y aneurisma aórtico abdominal, en el que la sulodexida se administra en una dosis diaria de 20 mg a 1000 mg por vía intravenosa, intramuscular u oral.

45 La presente invención describe sulodexida o uno de sus componentes, en particular SDX-DS (referencial) o SDX-HEP (referencial), para inhibir y/o reducir las MMP circulantes, y en particular MMP-9, también dicha gelatinasa B, implicada en una serie de enfermedades, en particular, una infección o una enfermedad neoplásica, enfermedad vascular caracterizada por un alto nivel de MMP, úlceras gastrointestinales, aumento y progresión del tumor, crecimiento del tumor primario, alteración de la angiogénesis, extravasación e intravasación de células neoplásicas y su combinación. En cuanto a la enfermedad vascular caracterizada por un alto nivel de MMP, la presente descripción, en particular, describe la insuficiencia venosa crónica (CVI); venas varicosas, rotura cardiaca tras infarto
50 de miocardio, aneurisma aórtico abdominal, relajación venosa, patología pulmonar y patologías neoplásicas.

Se describe adicionalmente el sulfato de dermatán (SDX-DS) y la heparina de bajo peso molecular (SDX-HEP) aislados a partir de sulodexida, el proceso para obtenerlos y su uso para inhibir y/o reducir la liberación de MMP in vitro e in vivo, solos o en su mezcla.

55 Este resultado es inesperado, porque en la bibliografía, por ejemplo en Cell Biol. Int. 2003, 27, 779-84, Isnard N. et al., describen que el sulfato de dermatán activa la expresión de MMP-2 y MMP-9.

Se han demostrado las características sorprendentes del SDX-DS (referencial) comparándolo con sulfato de dermatán comercial, y los resultados se muestran en los Ejemplos 2-9.

5 Esta evidencia hace que la sulodexida sea de hecho un compuesto único, diferente de cualquier otro glucosaminoglicano, que podría ser preparado con heparinas de bajo peso molecular y sulfatos de dermatán, disponibles en el mercado, para el tratamiento de todas las patologías en las que están implicadas las MMP.

Se describe adicionalmente el SDX-DS aislado a partir de sulodexida.

Se describe adicionalmente el SDX-HEP aislado a partir de sulodexida.

Se describe adicionalmente el sulfato de dermatán obtenido a partir de sulodexida a través de un proceso de purificación, tal como en cromatografía de afinidad con medio funcionalizado AT III.

10 Se describe adicionalmente la heparina de bajo peso molecular obtenida a partir de sulodexida mediante un proceso de purificación, tal como en cromatografía de afinidad con medio funcionalizado AT III.

Se describen adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden SDX-DS o SDX-HEP y su uso como medicamento.

Descripción de la invención

15 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende sulodexida, o una sal, solvato, hidrato o clatrato de la misma farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una patología en la que están implicadas metaloproteinasas de matriz (MMP), seleccionadas entre la formación de venas varicosas, patologías neoplásicas y aneurisma aórtico abdominal, en el que la sulodexida se administra en una dosis diaria de 20 mg a 1000 mg por vía intravenosa, intramuscular u oral. En particular, la invención describe el uso de sulodexida, 20 SDX-DS (referencial) o SDX-HEP (referencial) para la reducción y/o inhibición de las MMP circulantes, en particular la forma inducible de gelatinasa MMP-9 con consiguiente disminución de la concentración de las MMP circulantes en la sangre. Los componentes aislados se pueden usar para el medicamento ya sea per se o en una mezcla de los mismos.

25 Sulodexida está presente como medicina disponible en el mercado con la marca registrada VESSEL 2 F[®], y se administra por vía oral, inyección intramuscular o intravenosa, para el tratamiento de patologías vasculares con riesgo trombótico tales como trastorno arterial periférico, síndrome de post-flebitis, para el tratamiento de albuminuria en nefropatías como se describe por Harenberg J. en Med. Res. Rev. 18 (1998), 1-20 y Tamarin R. en Medical Praxis 8 (1997), 1.

30 La sulodexida y sus derivados, en particular SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial) también se pretende aquí que comprendan sus sales, solvatos, hidratos y clatrato farmacéuticamente aceptables.

Un aspecto importante de la presente descripción es la especificidad de la sulodexida para la inhibición/reducción de MMP-9, también llamada gelatinasa B, implicada en el relajamiento venoso, venas varicosas, insuficiencia venosa crónica (CVI) y úlceras de extremidades inferiores.

35 La sulodexida o SDX-DS o SDX-HEP, puede ser utilizada como ingrediente activo en todas las patologías caracterizadas por un aumento de MMP-9 inducible, sin ningún efecto sobre la MMP-2 constitutiva. Una ventaja de la sulodexida o sus componentes es la posibilidad de ser administrada por vía oral o de inyección, intramuscular o intravenosa. Otra ventaja de la sulodexida y sus componentes se da por la posibilidad de administrar una dosis alta sin efecto secundario como se describe en EP 1292315, es bien tolerado hasta 1000 mg/día y más,

40 La presente invención describe un nuevo uso de sulodexida o SDX-DS (referencial) o SDX-HEP (referencial) para la reducción y/o inhibición de la concentración de MMP, en particular MMP-9 (Gelatinasa B, EC3.4.24.35 di 92, 130 e 225 kDa).

La presente invención describe la sulodexida o uno de sus componentes, en particular SDX-DS y SDX-HEP para uso en la inhibición o reducción de MMP, en particular MMP-9, en una cantidad superior a 20%.

45 La presente invención describe cantidades de sulodexida o SDX-DS (referencial) o SDX-HEP (referencial), suficientes para obtener una reducción y/o inhibición en la liberación de MMP-9 de células sanguíneas en la circulación de plasma con la consecuente disminución de la actividad de las MMP circulantes en el aparato venoso y consecuente reducción de la actividad enzimática in situ en las paredes venosas. Dicho efecto se produce en una concentración de sulodexida in vitro y ex vivo en un intervalo de 8 µg/ml a 12 µg/ml. Estas concentraciones corresponden a dosificaciones terapéuticamente aceptables que se pueden alcanzar en la sangre mediante la 50 administración de sulodexida por vía intravenosa, intramuscular u oral, en dosis comprendidas entre 20 mg y hasta 1000 mg/día. Se ha demostrado el efecto del sulodexida, SDX-DS (referencial), SDX-HEP (referencial) en las MMP en las concentraciones descritas, con experimentos ex vivo en muestras biológicas.

En detalle, se recogieron muestras de sangre de 50 voluntarios sanos, hombres y mujeres. Las muestras,

manipuladas para obtener las muestras de plasma y de suero correspondientes, se analizaron con o sin la adición de una concentración variable de sulodexida SDX-DS y SDX-HEP.

5 Se describe adicionalmente también el SDX-DS comprendido en la sulodóxida, en una concentración de aproximadamente 20% en peso, SDX-HEP en una concentración de aproximadamente 80%, el procedimiento para obtenerlos, y el uso como un medicamento y para el tratamiento en todas las patologías en las que están implicadas las MMP. SDX-DS y SDX-HEP se pueden obtener con el proceso de purificación y extracción.

En particular, el Ejemplo 1 describe el procedimiento para obtener SDX-DS y SDX-HEP a partir de sulodexida mediante purificación por cromatografía de afinidad, en donde la fracción de heparina se adsorbe en una fase estacionaria funcionalizada con AT III y la fracción de dermatán se recoge en el flujo no adsorbido que pasa a través.

10 El Ejemplo 2 describe el efecto de la adición a sangre entera de cantidades crecientes de sulodexida en una concentración final de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml y SDX-DS, extraída de sulodexida, en una concentración final de aproximadamente 0 a aproximadamente 10 µg/ml. Después de la centrifugación, el suero de las muestras de sangre total se ha recogido y analizado en zimografía en gelatina, tal como se describe por Mannello F. et al. en Clin. Chem. 2003,49, 339-34. Con el fin de normalizar las actividades de MMP en diferentes
15 muestras, el volumen de muestras se ajustó a las mismas cantidades de las proteínas totales. Los resultados densitométricos de la zimografía en gelatina se muestran en la Tabla 2, en la que se le ha asignado el valor de 100% al área de MMP de las muestras de suero sin la adición de sulodexida o del inhibidor de MMP y se calcula la reducción del área de MMP en presencia de sulodexida y SDX-DS. Se ha observado que el área de la banda correspondiente a la MMP-9 se reduce de al menos aproximadamente el 20% a la concentración de sulodexida correspondiente a aproximadamente 10 µg/ml y a menos de una décima parte con la concentración de sulodexida correspondiente a aproximadamente 50 µg/ml.

La concentración de MMP-2 no se ve afectada por la adición de sulodexida.

25 Se obtiene que la adición de sulodexida a muestras de sangre completa, a una concentración final de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, reduce en las correspondientes muestras de suero y de forma proporcional la concentración de MMP circulante, en particular de MMP-9, mientras que la concentración de MMP-2 permanece sin cambios.

30 La Tabla 2 también muestra los resultados densitométricos de las muestras tratadas con SDX-DS, donde el área de la banda relativa a MMP-9 se reduce de al menos aproximadamente 20% a la concentración correspondiente a aproximadamente 2,5 µg/ml y al menos aproximadamente 60% a la concentración final de aproximadamente 10 µg/ml.

A partir de estos resultados se puede inferir que el efecto de la reducción/inhibición de las MMP es favorecido por la presencia de SDX-DS comprendido en sulodexida y estos resultados hacen que la sulodexida sea un ingrediente activo único entre los glucosaminoglicanos.

35 Estos datos también se confirman mediante el análisis Elisa cuantitativo realizado con el kit Biotrak[®] MMPS Amersham, que reconoce proMMP de gelatinasa con límite de detección (LOD) correspondiente a 0,37-0,25 µg/ml.

40 La Tabla 3 confirma que la sulodexida en una concentración de aproximadamente 25 µg/ml reduce en al menos aproximadamente 20% el área de la banda con relación a MMP-9 y en al menos aproximadamente 60% con una concentración de aproximadamente 50 µg/ml. La adición de SDX-DS obtenida en el Ejemplo 1, reduce las MMP en cantidades de al menos aproximadamente 20% en una concentración de aproximadamente 2,5 µg/ml y de al menos aproximadamente 60% con una concentración de aproximadamente 10 µg/ml.

La demostración de que la sulodexida también actúa sobre la reducción de la liberación de MMP por plaquetas y leucocitos, es evidente en el Ejemplo 3, en el que se añade sulodexida a muestras de plasma, después de haber separado el componente celular de la sangre entera con centrifugación.

45 El Ejemplo 3, informa de los resultados relativos a la adición de sulodexida a las muestras de sangre, recogidas de 50 voluntarios sanos, edad media de 37, previamente tratadas con una solución de citrato de sodio 0,13 M, en una cantidad entre 1 y 10% en volumen, y luego centrifugadas. A los líquidos sobrenadantes de la muestra, se añadieron cantidades de sulodexida en una concentración final de aproximadamente 10 µg/ml a 50 µg/ml. Las muestras se analizaron por zimografía en gelatina como se describe en el Ejemplo 2.

50 Se le ha asignado un valor correspondiente al 100% a la banda de la muestra de suero sin ninguna adición, (control), y se determinaron las reducciones del área proporcional en función de cantidades de sulodexida crecientes a las muestras de suero. Se ha observado que las bandas transparentes de digestión de gelatina con respecto a la actividad proteolítica de MMP-9 permanecen sin cambios después de la adición de sulodexida, como se indica en la Tabla 4 del Ejemplo 3, y este resultado demuestra que la sulodexida no interfiere con la actividad de MMP una vez que las enzimas ya están liberadas en el plasma.

55 Se obtiene un resultado similar cuando se añade sulodexida a muestras de suero como se indica en el Ejemplo 4, en

- 5 el que se añadieron cantidades crecientes de sulodexida. En particular, el Ejemplo 4 describe el efecto de cantidades incrementadas de sulodexida de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, añadidas a muestras de suero obtenidas después de la centrifugación de la muestra de sangre recogida de 50 voluntarios sanos, con una edad media de 37. Las muestras de suero obtenidas se analizaron en zimografía como se describe en el Ejemplo 2.
- El valor densitométrico relativo de las áreas gelatinolíticas correlacionado con las bandas gelatinolíticas de MMP-2 y MMP-9 se presentan en la Tabla 5, en la que no se observa reducción con respecto a las bandas de la muestra sin adición de sulodexida.
- 10 En particular, los resultados obtenidos del Ejemplo 2 demuestran que la sulodexida y el SDX-DS, comprendido en sulodexida, previenen el aumento y reducen las MMP en la sangre, a través de un mecanismo de acción, que actúa selectivamente sobre la forma inducible de MMP-9, Identificando un posible uso terapéutico para el tratamiento de todas las patologías en las que la presencia de MMP-9 está directa o indirectamente correlacionada con el curso de la enfermedad.
- 15 El Ejemplo 5 presenta la comparación entre la sulodexida, parnaparina y SDX-DS, extraído de la sulodexida, sobre las MMP presentes en el suero. Se trataron muestras de sangre entera, recogidas de voluntarios sanos, como en el Ejemplo 2, se trató un grupo de muestras con sulodexida hasta una concentración final de aproximadamente 25 µg/ml, un grupo con sulfato de dermatán hasta una concentración final de aproximadamente 5 µg/ml y un grupo con una heparina de bajo peso molecular (parnaparina) hasta una concentración final de aproximadamente 20 µg/ml. La Tabla 8 y la Tabla 9 informan de los resultados obtenidos en la zimografía y Elisa respectivamente, en donde la sulodexida muestra una reducción de MMP-9 de 50% a 70%, parnaparina de aproximadamente 20% a 30% y SDX-DS de aproximadamente 50% a 70% con respecto a la muestra de control sin ninguna adición.
- 20 La propiedad única de la sulodexida en la liberación de MMP tiene que atribuirse a la mezcla natural de GAG que constituyen la sulodexida.
- 25 El Ejemplo 6 proporciona el soporte de las características de SDX-DS en la reducción de MMP, en comparación con dos sulfatos de dermatán diferentes comercialmente disponibles en el mercado. En la misma concentración de 5 µg/ml, el SDX-DS induce una reducción de MMP-9 superior al 50%, mientras que los dos sulfatos de dermatán comerciales (Sigma y Calbiochem) inducen una reducción de menos del 10%.
- Se ha encontrado que SDX-DS reduce MMP, y en particular MMP-9, al menos tres veces más que las preparaciones comerciales de DS.
- 30 El ejemplo 7 demuestra que también la SDX-HEP tiene características únicas, de hecho la mezcla de heparina de bajo peso molecular y sulfato de dermatán comprendido en sulodexida, actúa de manera diferente con respecto a la mezcla sintética preparada añadiendo parnaparina al sulfato de dermatán comercial y SDX-DS;
- 35 Con mayor detalle, se compara la sulodexida con mezclas de heparina de bajo peso molecular y sulfatos de dermatán mezclados en aproximadamente la misma proporción presente en la sulodexida de aproximadamente 80% de parnaparina y de aproximadamente 20% de sulfato de dermatán. Los datos presentados en la Tabla 11 indican que la sulodexida muestra un porcentaje significativamente mayor de inhibición con respecto a las mezclas de parnaparina/DS y parnaparina/SDX-DS.
- 40 En particular, la observación de que la sulodexida tiene una actividad superior con respecto a la mezcla de heparina/SDX-DS permite demostrar que el componente de heparina comprendido en la sulodexida tiene también propiedades únicas que afectan al nivel de MMP circulantes.
- También se ha demostrado la capacidad de la sulodexida con respecto a las MMP en una muestra biológica como la pared interna de las venas.
- Las paredes internas de las venas son particularmente importantes porque este es el sitio de acción de las MMP, causando varias patologías relacionadas con el remodelado proteolítico de la matriz extracelular.
- 45 El Ejemplo 8 muestra el efecto comparativo de la sulodexida, SDX-DS y parnaparina sobre las MMP en las paredes venosas en el experimento de inmunohistoquímica. Este experimento confirma el efecto de la sulodexida y SDX-DS en todas las patologías en las que están implicadas las MMP y en particular en la reducción y/o inhibición de la concentración de expresión de MMP. Se añadieron sulodexida, SDX-DS y parnaparina en una concentración respectivamente de 25, 5 y 20 µg/ml a segmentos de vena safena humana, obtenidos quirúrgicamente de 10 mujeres sanas (edad media 42 años), que se sometieron a safenectomía por vena varicosa.
- 50 Después de la apropiada inclusión tisular, se incubaron secciones en serie de aproximadamente 5 µm de espesor con un anticuerpo monoclonal anti-MMP-9 y después de incubación con un anticuerpo secundario biotinilado, el complejo se detectó por reacción de peroxidasa de acuerdo con los métodos estándar. El complejo después de la incubación se detectó con avidina-peroxidasa, de acuerdo con los métodos estándar.

Las muestras de tejido tratadas con sulodexida mostraron superficies reducidas del área teñida, lo que demuestra una menor concentración local de MMP, con respecto a las muestras de control y tratada con heparina.

5 La Tabla 12 demuestra que, al asignar un valor correspondiente a 100 a la muestra sin adición, la sulodexida en una concentración de aproximadamente 25 µg/ml reduce la intensidad del área de tinción de MMP-9, correspondiente a aproximadamente 60%; SDX-DS en una concentración de aproximadamente 5 µg/ml reduce la intensidad a aproximadamente 70% y la parnaparina en una concentración de aproximadamente 20 µg/ml no reduce la intensidad de MMP-9. Estos resultados in vitro de sulodexida y SDX-DS in vitro son transferibles a uso in vivo y son aplicables a la reducción de MMP en todas las patologías en las que están implicados.

10 El Ejemplo 9 muestra el efecto de la sulodexida, SDX-DS y parnaparina en las MMP en las paredes venosas mediante zimografía in situ (citoquímica).

Se añadieron sulodexida, SDX-DS y parnaparina en una concentración respectivamente de aproximadamente 25, 5 y 20 µg/ml a segmentos de vena safena humana, obtenidos quirúrgicamente a partir de 10 mujeres sanas (edad media 42 años), que se sometieron a safenectomía por varices.

15 Después del tratamiento, las secciones de vena se incubaron con un sustrato de gelatina fluorogénica y se observó la actividad proteolítica comparando la imagen de microscopio de porciones venosas a 530 nm.

En estos experimentos, el nivel de fluorescencia es proporcional a las actividades de MMP en el tejido y los resultados de la zimografía in situ se dan en la Tabla 13.

20 La Tabla 13 demuestra que, asignando un valor correspondiente a 100 a la muestra sin ninguna adición, la sulodexida en una concentración de aproximadamente 25 µg/ml reduce la intensidad de MMP-9 a aproximadamente 50%; SDX-DS en una concentración de aproximadamente 5 µg/ml reduce la intensidad de MMP-9 a aproximadamente 80% y la parnaparina en una concentración de aproximadamente 20 µg/ml reduce la intensidad de MMP-9 a aproximadamente 40%.

El efecto de la sulodexida, SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial) en el tejido venoso para la reducción y/o inhibición puede extenderse a todos los tejidos en los que están implicadas las MMP.

25 Por ejemplo, la sulodexida, SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial) también pueden usarse en el tratamiento de la úlcera intestinal y otros daños imputables a las MMP sin ninguna limitación.

30 Con el fin de obtener las concentraciones de eficacia in vivo en la reducción de las MMP y en particular de la MMP-9, la sulodexida puede administrarse por vía intravenosa, inyectando de 1 a 4 viales de solución que contiene aproximadamente 60 mg/ml de sulodexida con excipientes farmacéuticamente aceptables. Alternativamente, la sulodexida puede administrarse en dosificación terapéuticamente equivalente por vía intramuscular u oral. En este último caso es posible administrar dosis de hasta 1000 mg/día y mayores, sin acontecimientos adversos, como se describe en EP 1292315.

35 La propiedad de la sulodexida en la reducción de las MMP circulantes y especialmente la acción selectiva contra la MMP-9, es un efecto desconocido e inesperado, en particular útil en todas las patologías en las que están implicadas las MMP, y en particular la MMP-9, como la enfermedad vascular, insuficiencia venosa crónica (CVI), venas varicosas, úlceras venosas, patologías pulmonares, aumento y progresión del tumor, crecimiento en el tumor primario, angiogénesis, extravasaciones e intravasación de células neoplásicas.

40 Los experimentos indicados demuestran un nuevo uso de sulodexida, SDX-DS (referencial) y la fracción de heparina de sulodexida (referencial), para la reducción/inhibición de liberación de MMP, en particular MMP-9, liberada por leucocitos y plaquetas y la inhibición de los valores de MMP en las paredes internas de las venas. Los resultados ex vivo son completamente transferibles al uso de sulodexida, SDX-DS (referencial) y fracción de heparina de sulodexida (referencial) in vivo por medio de una composición farmacéutica que comprende sulodexida de aproximadamente 20 a 1000 mg y superior; SDX-DS de aproximadamente 4 mg a aproximadamente 200 mg y más; SDX-HEP de aproximadamente 16 a aproximadamente 700 y más.

45 Además, la administración de sulodexida, SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial) puede ocurrir por vía de inyección, intramuscular y/o intravenosa o vía oral, sin ninguna limitación.

50 La dosificación del ingrediente activo, sulodexida, SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial) puede variar considerablemente dependiendo del modo de administración, edad del paciente, peso y estado general del paciente, así como la gravedad de la enfermedad, y puede determinarse mediante técnicas estándar. Además, se pueden usar opcionalmente ensayos in vitro y en animales para ayudar a identificar rangos de dosificación opcionales. Preferiblemente, la composición farmacéutica está en una forma aceptable para administración oral. En la presente invención, la sulodexida, el SDX-DS (referencial) y la fracción de heparina de sulodexida (referencial) pueden estar comprendidos en una composición en forma de comprimidos, cápsulas, granulados, suspensiones, soluciones o aerosoles.

La composición farmacéutica oral puede proporcionar una liberación controlada.

La composición farmacéutica oral puede proporcionar propiedades bioadhesivas para aumentar la mucoadhesividad.

Los excipientes para la preparación oral se seleccionan entre uno o más aglutinantes, deslizantes, disgregantes, diluyentes, agentes naturales.

5 Los excipientes para uso oral pueden comprender disgregantes, diluyentes y combinación de los mismos. Los disgregantes se pueden seleccionar entre crospovidona, glicolato sódico de almidón, almidón de maíz, derivados de celulosa y combinación de los mismos. Los diluyentes se pueden seleccionar de lactosa, manitol, xilitol, celulosa microcristalina, azúcar, dextrina, hidrato de carbono hidrófilo, y combinación de los mismos. La forma farmacéutica oral puede comprender excipientes bioadhesivos.

10 Los comprimidos pueden comprender además un recubrimiento que comprende hidroxipropilmetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, dextrina, maltodextrina, compuestos a base de poli(acetato de vinilo), hidroxipropilcelulosa, acetato de celulosa, ftalato de celulosa, derivado de los mismos, o combinación de los mismos.

La forma oral también puede comprender agentes aromatizantes, colorantes o edulcorantes.

15 Las composiciones farmacéuticas que comprenden sulodexida o SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial) con respecto a los compuestos conocidos y estudiados para la reducción/inhibición de la liberación controlada de MMP, proporcionan muchas ventajas y resuelven muchos problemas tales como la selectividad específica con respecto a MMP-9, tolerabilidad, seguridad y aceptabilidad.

20 Esta invención se refiere a un nuevo uso terapéutico diferente con respecto a aquellos para los que se comercializa la sulodexida en la prevención de patologías vasculares con riesgo trombótico.

En la práctica farmacéutica, se pueden combinar sulodexida, SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial) con excipientes aceptables usando las técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia.

La composición se puede administrar en dosis única o múltiple, una o más veces en un día en composición de liberación controlada.

25 La técnica anterior describe el uso de sulodexida en patologías relacionadas con la diabetes, tales como nefropatía diabética, mientras que sólo ahora, después de la presente invención, es posible tener un nuevo uso médico para la sulodexida.

Un aspecto particular de la presente invención es el uso anterior para el tratamiento de patologías en las que está implicada la relajación venosa, seleccionadas entre la formación de venas varicosas y patologías neoplásicas.

30 Se describe adicionalmente SDX-DS aislado a partir de sulodexida y su uso para inhibir y/o reducir la liberación de MMP in vitro e in vivo.

Se describe adicionalmente SDX-DS obtenido de sulodexida con un proceso de purificación.

Se describe adicionalmente SDX-DS con cromatografía de afinidad con una columna funcionalizada con AT III.

El proceso para el aislamiento de SDX-DS comprende los siguientes pasos:

- 35 A) preparación de una columna cromatográfica de afinidad con ATIII en una concentración entre 5 y 10 mg/ml de gel;
- B) cargar la sulodexida en dicha columna de la etapa a) en una concentración comprendida entre 0,1 a 5 mg/ml de gel en un tampón que comprende TRIS 50 mM, NaCl 50 mM, a pH 7,4;
- 40 C) mezclar las fracciones de sulfato de dermatán eluidas en la fracción no absorbida y opcionalmente liofilizar dicho sulfato de dermatán combinado;
- D) transformar opcionalmente dicho sulfato de dermatán en una sal, solvato, hidrato, clatrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es SDX-HEP obtenido de sulodexida con un proceso de purificación.

Otro aspecto particular es SDX-HEP con cromatografía de afinidad con una columna funcionalizada con AT III.

45 El procedimiento para el aislamiento de SDX-HEP comprende los siguientes pasos:

- A) preparación de una columna cromatográfica de afinidad con ATIII en una concentración entre 5 y 10 mg/ml de gel;

- B) cargar la sulodexida en una concentración comprendida entre 0,1 y 5 mg/ml de gel en una solución tampón que comprende TRIS 50 mM, NaCl 50 mM a pH 7,4;
- C) eluir la heparina de bajo peso molecular de dicha columna de cromatografía con una solución tampón que comprende TRIS 50 mM, NaCl 3 M a pH 7,4;
- 5 D) poner en común la fracción de heparina de bajo peso molecular eluida y opcionalmente liofilizar dicha heparina combinada;
- E) opcionalmente transformar dicho bajo peso molecular en una sal, solvato, hidrato, clatrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

Se describe adicionalmente SDX-HEP y su uso para inhibir y/o reducir la liberación de MMP in vitro e in vivo.

- 10 Se describen adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden sulodexida, en forma sólida, suspensión, gránulo, aerosol para el tratamiento de patologías en las que están implicadas MMP y necesitan ser reducidas.

Se describen además kits que comprenden una composición farmacéutica que comprende sulodexida, SDX-DS y SDX-HEP.

- 15 Se describen adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden sulodexida o uno de sus componentes, en particular SDX-DS o SDX-HEP o una mezcla de los mismos, en una dosificación adecuada para la administración de al menos aproximadamente 5 mg/día. Ejemplos de dosis diarias son de 5 a 1000 mg/día, de 15 a 800 mg/día, de 50 a 200 mg/día, de 20 a 1000 mg/día o más, en una o más administraciones, sin ninguna limitación.

- 20 Una dosis diaria preferida para SDX-DS es de 1 a 300 mg o más, en particular de 4 a 300 mg en administración única o múltiple sin ninguna limitación.

Una dosis diaria preferida para SDX-HEP es de 16 a 900 mg o más, en particular de 19 a 800 mg, en administración única o múltiple sin ninguna limitación.

La composición farmacéutica que comprende sulodexida, SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial) puede administrarse a pacientes que reciben terapias concomitantes, sin ningún efecto negativo.

- 25 El uso de sulodexida como se reivindica, SDX-DS (referencial) y SDX-HEP (referencial), descrito en la presente invención, tiene que ser considerado un uso médico para el tratamiento de todas las patologías en las que están implicadas las MMP y se pide su reducción y/o inhibición. El uso de sulodexida, SDX-DS (referencial) y fracción de heparina de sulodexida (referencial), en comparación con los compuestos estudiados anteriormente en la técnica, supera varios e importantes problemas tales como la selectividad específica para MMP-9, el cumplimiento y la fácil administración.
- 30

La invención se muestra en detalle en los siguientes ejemplos.

Figuras

Figura 1: Perfil de permeabilidad en gel de sulodexida;

Figura 2: Perfil de permeabilidad en gel de sulfato de dermatán obtenido de sulodexida;

- 35 Figura 3: Perfil de permeabilidad en gel de heparina obtenida de sulodexida.

Ejemplo 1

Proceso para obtener la fracción de sulfato de dermatán a partir de sulodexida (Referencial)

- 40 Se disolvió una cantidad de sulodexida extraída de mucosa intestinal de animal, correspondiente a 8 mg, en un tampón de unión constituido por TRIS 50 mM y NaCl 50 mM a pH 7,4 y se cargó en una columna de afinidad preparada por acoplamiento de 7,5 mg de ATIII/ml de gel de Sepharose activado con CNBr (GE).

La columna se lavó con la misma solución tampón y el material absorbido se eluyó con una solución tampón que consistía en TRIS 50 mM, NaCl 3 M a pH 7,4.

La fracción de sulfato de dermatán se recogió en el material no absorbido presente en el flujo, mientras que la fracción de heparina se recogió en las fracciones eluidas.

- 45 El sulfato de dermatán y la fracción de heparina se pueden almacenar a -20° u opcionalmente liofilizar.

Las fracciones agrupadas de heparina y las fracciones combinadas de sulfato de dermatán se analizaron en cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) y en gel de agarosa.

Los perfiles cromatográficos se obtuvieron en el sistema HPLC HP 1090, equipado con columna de GPC TSKgel, G2000 SWXL (7,8 X 300 mm) eluido con Na₂SO₄ 0,2 M, pH 5 con un caudal correspondiente a 0,2 ml/min y detectado con el detector de índice de refracción.

5 La Figura 1 muestra los perfiles cromatográficos de sulodexida cargada en la cromatografía de afinidad con un amplio perfil cromatográfico de GPC con un pico máximo agudo a TA que corresponde a aproximadamente 30 min.

La Figura 2 muestra la fracción de sulfato de dermatán presente en el flujo de la cromatografía de afinidad con un pico más corto con un máximo a TA de aproximadamente 27 min.

La Figura 3 muestra la fracción de heparina eluida mediante cromatografía de afinidad caracterizada por un pico amplio.

10 El análisis en gel de agarosa se obtuvo disolviendo agarosa en una concentración de 0,6% (p/v) en tampón de acetato de bario 0,04 M a pH 5,8. La solución caliente se colocó sobre una placa de vidrio con unas dimensiones de aproximadamente 7,5 cm x 4,5 cm y se cargaron en el gel de agarosa sulodexida, SDX-DS y SDX-HEP en una concentración de aproximadamente 10 mg/ml, que contenía una pequeña cantidad de rojo de cresol. La separación electroforética se realizó en dos etapas: la primera etapa en tampón de acetato de bario 0,04 M a pH 5,8, a 100 V durante aproximadamente 25 min, y la segunda etapa en 1,3-diaminopropano 0,05 M, pH 9 a 110 V durante aproximadamente 30-40 minutos. La placa se sumergió entonces en la solución de fijación que consistía en cloruro de cetilpiridinio al 0,1% (p/v) en agua durante aproximadamente 3 horas. Después de secar la placa bajo aire caliente, la placa se sumergió en la solución de tinción consistente en azul de toluidina al 0,1% (p/v) en etanol/agua/ácido acético 50:50:1 (v/v/v) se decoloró en la misma solución sin tinción y se secó bajo aire caliente.

20 En la Tabla 1 se presenta la movilidad relativa (Rf) de la sulodexida, sus componentes separados SDX-DS y SDX-HEP y sulfato de dermatán comercial.

Tabla 1

Componente (µg/ml)	Rf
Sulodexida*	0,86
	0,75
Fracción de sulfato de dermatán (SDX-DS)	0,84
Fracción de heparina (SDX-DS)	0,75
Sulfato de dermatán comercial (Sigma)	0,86
*inversión	

Ejemplo 2

25 Efecto de la sulodexida sobre las MMP circulantes en muestras de sangre

Se colocaron muestras de sangre de 50 voluntarios sanos, 25 mujeres y 25 varones de entre 25 y 58 años, edad promedio de 37 años, en tubos de ensayo y se prepararon dos series de muestras; en el primer conjunto se añadieron cantidades variables de sulodexida hasta obtener la concentración final correspondiente a 0, 12, 24, 48 µg/ml, en el segundo conjunto se añadieron cantidades variables de dermatán obtenido como en el Ejemplo 1, hasta la concentración final correspondiente a 0, 2,5, 5 y 10 µg/ml. Las muestras sin la adición de sulodexida y dermatán se utilizaron como control y a las bandas de MMP de estas muestras se atribuyó el valor arbitrario de intensidad de 100%. La intensidad de las bandas de MMP de las muestras tratadas se dio como porcentaje con respecto a las muestras no tratadas.

35 Las muestras totales se centrifugaron a 1550 g durante 10 minutos a 4°C, se analizó una cantidad de líquidos sobrenadantes de muestras de suero (S) correspondientes a 150 µg de proteínas totales, determinadas por el método de Bradford, mediante zimografía en gelatina. Las muestras se cargaron en gel de zimografía y la separación por electroforesis se comparó con el estándar de MMP, preparado por dilución de sangre capilar de voluntarios sanos por 15 volúmenes de tampón Laemmli U.K (Nature, 227 (1970), 680-685), en condiciones no reductoras.

40 Los zimogramas en gelatina se prepararon mediante poliacrilamida al 7,5% (p/v) que contenía gelatina al 0,2% (p/v) aislada de piel de cerdos (Tipo A 90 Bloom, Sigma).

45 La electroforesis se llevó a cabo a 35 mA durante 75 minutos, los geles se lavaron con soluciones de Triton X-100 en una concentración de 2,5% (v/v) y se incubaron durante 24 horas a 37°C en una solución constituida por 50 mM de Tris- HCl, pH 7,5, CaCl₂ 5 mM, NaCl 100 mM, ZnCl₂ 1 mM, NaN₃ 0,3 mM, 0,02% (p/v) de detergente Brij®-35 y 0,25% (v/v) de Triton X-100. La detección de la actividad de la gelatinasa in situ se produce mediante la tinción de

los geles con azul brillante de Coomassie R-250 en una concentración de 0,2% (p/v) y posteriormente blanqueo con una solución de metanol-ácido acético en una relación volumétrica igual a 80/20.

- 5 La sulodexida y SDX-DS, obtenido como en el Ejemplo 1, actúa solamente sobre la banda relativa a MMP-9, mientras que la intensidad de la banda de MMP-2 permanece sin cambios con respecto al control y se atribuye un valor del 100%. El cálculo de las áreas se realizó con un densitómetro con analizador de imágenes. En la Tabla 1 se indican las áreas porcentuales de digestión gelatinolítica relacionadas con MMP-9 en muestras de suero con o sin sulodexida, con o sin fracción de dermatán.

Tabla 2

Gelatina-Zimografía: Concentraciones de MMP-9 en suero después del tratamiento con sulodexida y sulfato de dermatán obtenido como en el Ejemplo 1			
Sulodexida* (µg/ml)	Área % MMP-9	Sulfato de dermatán obtenido por el Ejemplo 1 (µg/ml)	Área % MMP-9
0	100 ± 7	0	100 ± 7
12	57 ± 4	2,5	46 ± 3
24	41 ± 5	5	30 ± 7
48	7 ± 1	10	4 ± 7
*invención			

- 10 Las concentraciones de MMP-9 en las muestras se determinaron también en Elisa, para las mediciones de actividad enzimática de la metaloproteinasa, utilizando el ensayo Biotrak de MMP, Amersham, que reconoció las formas pro-MMP de gelatinasa con un LOD de 0,37-0,25 µg/l para MMP-9 y MMP-2, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. Los resultados de Elisa no muestran diferencias estadísticamente significativas respecto a la actividad gelatinolítica observada en las zimografías.

15 Tabla 3

Ensayo Elisa: Concentración de MMP en suero después del tratamiento con sulodexida y sulfato de dermatán obtenido como en el Ejemplo 1			
Sulodexida* (µg/ml)	% MMP-9	Sulfato de dermatán obtenido por el Ejemplo 1	% MMP-9
0	100 ± 4	0	100 ± 4
12	61 ± 6	2,5	47 ± 4
24	43 ± 8	5	31 ± 5
48	6 ± 3	10	5 ± 1
*invención			

Ejemplo 3

Efecto de la sulodexida sobre las cantidades de MMP circulantes en el plasma

- 20 Se recogen muestras de sangre de 50 voluntarios sanos, 25 mujeres y 25 hombres de entre 25 y 58 años de edad, edad media de 37, y se añade 1 ml de cada muestra a 38 µl de una solución de citrato sódico 0,13 M y se centrifuga a 1550 g durante 10 minutos a 4 °C.

Se añaden cantidades incrementadas de sulodexida a las muestras hasta obtener una concentración final correspondiente respectivamente a 0, 12, 24 y 48 µg/ml.

- 25 Se analiza una cantidad correspondiente a 150 µg de proteínas totales de líquidos sobrenadantes de muestras de plasma (P) obtenidas por centrifugación, medida mediante el método de Bradford, mediante zimografía-gelatina. Se carga en el gel el patrón de gelatinasa, que se prepara diluyendo la sangre capilar de voluntarios sanos mediante 15 volúmenes de tampón Laemmli, en condiciones no reductoras.

Los zimogramas en gelatina y los experimentos de electroforesis se ejecutan como se describe en el Ejemplo 2.

Las áreas en los zimogramas de la banda se determinan usando un densitómetro con un analizador de imágenes,

calculando el aumento del área de las bandas en relación con la metaloproteinasa en comparación con las del plasma sin adición de sulodexida. Las áreas porcentuales de digestión gelatinolítica con relación a MMP-9 en muestra de sangre con o sin sulodexida se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4

Zimografía en gelatina: Concentración de MMP-9 plasmática después del tratamiento con sulodexida	
Concentración de sulodexida (µg/ml)	Área % MMP-9
0	100 ± 5
12	98 ± 4
24	101 ± 4
48	99 ± 4

5

El análisis densitométrico de la MMP-9 del zimograma se confirma mediante el análisis cuantitativo de Elisa, cuyos datos, presentados en la Tabla 4, no muestran diferencias significativas en comparación con el análisis densitométrico del zimograma.

Tabla 5

Ensayo Elisa: Concentración de MMP plasmática después del tratamiento con sulodexida	
Concentración de sulodexida (µg/ml)	Concentración % MMP
0	100 ± 7
12	99 ± 5
24	100 ± 3
48	98 ± 4

10

Ejemplo 4

Efecto de la sulodexida sobre las cantidades de MMP circulante en suero, después de la formación del suero

Muestras de sangre recolectadas de 50 voluntarios sanos, 25 mujeres y 25 varones de entre 25 y 58 años, edad promedio de 37 años, se colocan en tubo de ensayo y se centrifugan a 1500 g durante diez minutos a 4 °C.

15 Se añaden cantidades crecientes de sulodexida a 150 µg de proteínas de suero, medidas por el método de Bradford, para obtener una concentración final de sulodexida correspondiente respectivamente a 0, 12, 24, 48 µg/ml. Las muestras obtenidas se analizan mediante zimografía-gelatina en comparación con el patrón de gelatinasa, que se prepara por dilución de la sangre capilar de voluntarios sanos en 15 volúmenes de tampón Laemmli, en condiciones no reductoras.

20 Los zimogramas, el curso de electroforesis y la coloración/decoloración se ejecutan como se describe en el Ejemplo 2.

25 Las áreas en los zimogramas de la banda se determinan usando un densitómetro con analizador de imágenes, calculando la disminución del área de las bandas en relación con la metaloproteinasa en comparación con las del suero sin adición de sulodexida. Las áreas porcentuales de digestión gelatinolítica con respecto a MMP en una muestra de suero con o sin sulodexida se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

Zimografía en gelatina: Concentraciones de MMP-9 en suero en presencia de concentraciones crecientes de sulodexida	
Concentraciones de sulodexida (µg/ml)	Área (%) MMP-9
0	100 ± 6
12	98 ± 4
24	101 ± 3
48	99 ± 4

Los datos obtenidos por zimografía, no muestran diferencias significativas en comparación con los obtenidos por Elisa, como se indica en la Tabla 7.

Tabla 7

Ensayo Elisa: Concentraciones de MMP plasmática con diferentes concentraciones de sulodexida	
Concentraciones de sulodexida (µg/ml)	Concentración % MMP-9
0	100 ± 5
12	99 ± 2
24	101 ± 4
48	97 ± 6

5 Ejemplo 5: Ejemplo comparativo

Evaluación de sulodexida, sulfato de dermatán obtenido en el Ejemplo 1 y parnaparina

La muestra de sangre preparada como se describe en el Ejemplo 2 se dividió en tres grupos en los que un grupo se trató con sulodexida en una concentración final correspondiente a 24 µg/ml, un grupo con parnaparina en la concentración final correspondiente a 5 µg/ml y el último grupo con fracción dermatánica obtenida en el Ejemplo 1 en una concentración de 5 µg/ml, y se compararon en zimografía y Elisa.

10

Los resultados se presentan en la Tabla 8 y la Tabla 9.

Tabla 8

Comparaciones de muestras de suero analizadas en zimografía					
Sulodexida* (µg/ml)	% MMP-9	Parnaparina (µg/ml)	% MMP-9	Sulfato de dermatán Ejemplo 1 (µg/ml)	Área% MMP-9
0	100 ± 7	0	100 ± 7	0	100 ± 7
24	41 ± 5	19	69 ± 7	5	30 ± 6
*inversión					

Tabla 9

Comparaciones de muestras de suero analizadas en Elisa					
Sulodexida* (µg/ml)	% MMP-9	Parnaparina (µg/ml)	% MMP-9	Sulfato de dermatán Ejemplo 1 (µg/ml)	Área% MMP-9
0	100 ± 7	0	100 ± 7	0	100 ± 7
24	43 ± 8	19	67 ± 9	5	32 ± 8
*inversión					

15

Estos Ejemplos confirman el efecto de la sulodexida y de la fracción de sulfato de dermatán presente en la sulodexida para reducir y/o inhibir la MMP y en particular la MMP9.

Ejemplo 6: Ejemplo Comparativo (Referencial)

Comparación entre sulfato de dermatán comercial y sulfato de dermatán obtenido en el ejemplo 1

20

La muestra de sangre preparada como se describe en el Ejemplo 2 se dividió en tres grupos en los que el primer grupo se trató con sulfato de dermatán comercial comercializado por Sigma Aldrich (Italia); el segundo grupo con sulfato de dermatán comercializado por Calbiochem (Italia) y el tercero con DS extraído de sulodexida como en el Ejemplo 1, todos en una concentración final correspondiente a 5 µg/ml. Las muestras se analizaron en Elisa como en el Ejemplo 2, y los resultados finales se indican en la Tabla 10.

25

Tabla 10

Sulfato de dermatán (Sigma Aldrich) (µg/ml)	% MMP-9	Sulfato de dermatán Calbiochem (µg/ml)	% MMP-9	Sulfato de dermatán del Ejemplo 1 (µg/ml)	Área % MMP-9
0	100 ± 5	0	100 ± 5	0	100 ± 7
5	89 ± 8	5	95 ± 7	5	32 ± 8

Ejemplo 7: Ejemplo comparativo

Comparación entre sulfato de dermatán comercial y sulfato de dermatán obtenido en el ejemplo 1

5 La muestra de sangre preparada como se describe en el Ejemplo 2 se dividió en cinco grupos:

Grupo 1: muestra de sangre con parnaparina comercial en una concentración de 19 µg/ml;

Grupo 2: muestra de sangre con sulodexida en una concentración de 24 µg/ml;

Grupo 3: muestra de sangre con DS obtenido como en el Ejemplo 1 en una concentración de 5 µg/ml;

10 Grupo 4: muestra de sangre con una mezcla de parnaparina en una concentración de 19 µg/ml y DS obtenido de sulodexida como en el Ejemplo 1 en una concentración de 5 µg/ml;

Grupo 5: muestra de sangre con una mezcla de parnaparina en una concentración de 19 µg/ml y DS comercial en una concentración de 5 µg/ml.

Las muestras se analizaron en Elisa como se describe en el Ejemplo 2 y los resultados se indican en la Tabla 11.

15 La reducción de MMP-9 se calculó con respecto a las muestras sin ninguna adición, a la que se asignó valores de área correspondientes al 100%.

TABLA 11

Composición	Concentración (µg/ml)	Área% MMP-9
Sulodexida*	24	43 ± 8
SDX-DS	5	31 ± 6
Parnaparina	19	73 ± 9
Parnaparina + SDX-DS	19+5	55 ± 4
Parnaparina + DS-Sigma	19+5	87 ± 6
DS comercial Sigma y Calbiochem mostraron los mismos resultados. *invención		

Ejemplo 8

20 Evaluación ex vivo de sulodexida, sulfato de dermatán (SDX-DS) y parnaparina en paredes venosas en inmunohistoquímica

25 Los segmentos de vena safena humana, obtenidos quirúrgicamente de 10 mujeres sanas (edad media 42 años) que se sometieron a safenectomía por varices, se mantuvieron en condiciones estériles en incubadora con CO₂ (5% CO₂ a 37°C durante 24 horas) en NaCl al 0,9% y se dividió en tres porciones. La primera porción se trató con sulodexida en una concentración de 24 µg/ml; la segunda porción se trató con parnaparina en una concentración de 19 µg/ml y la tercera porción con SDX-DS obtenido mediante el Ejemplo 1 en una concentración de 5 µg/ml. Los segmentos de vena se fijaron en solución de formalina al 10%, se procesaron y se embebieron en cera de parafina. Los bloques embebidos acabados estaban ortogonalmente orientados con respecto a la dirección original del flujo sanguíneo, secciones transversales de 5 mm de espesor se cortaron y montaron sobre portaobjetos recubiertos con 3-aminopropil-trietoxisilano. Parte de la pared venosa se cortó en secciones de serie de 5 µm de espesor. Secciones en serie fueron examinadas por tinción de Miller Elastic van Gieson y hematoxilina de Harris y eosina. Las secciones se sometieron a bloqueo proteico con suero de cabra normal y luego se incubaron durante una noche a 4°C, con un anticuerpo monoclonal primario anti-MMP-9 (Santa Cruz) diluido 1:50 en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

30 Las secciones de vena se incubaron posteriormente con un anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de

ratón biotinilado) como los métodos estándar y se usó un complejo de avidina biotina peroxidasa.

Después de lavar con PBS las secciones de vena se tiñeron con solución de DAB y H₂O₂ de acuerdo con el método estándar.

5 Posteriormente, las secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron, se aclararon y se montaron. Siempre se incluyeron controles positivos y negativos con cada lote de tinción para asegurar la consistencia entre ciclos consecutivos.

10 Las imágenes se obtuvieron con microscopio electrónico (40X) y los resultados se resumen en la Tabla 12. La intensidad del color se midió por inspección óptica, se asignó un valor 100 al tejido sin ninguna adición (control) y se evaluó la reducción visible del color negro determinada por la adición de SDX-DS, SDX-HEP y parnaparina. Los valores se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12

	Concentración (µg/ml)	Reducción de la intensidad%
Sulodexida*	24	60
SDX-DS	5	70
Parnaparina	19	0
*inversión		

Ejemplo 9

15 Evaluación ex vivo de sulodexida, sulfato de dermatán y parnaparina en paredes venosas en zimografía in situ (citoquímica)

20 Los segmentos de vena safena humana, obtenidos quirúrgicamente de 10 mujeres sanas (edad media 42 años) que se sometieron a safenectomía por varices, se mantuvieron en condiciones estériles en incubadora con CO₂ (5% CO₂ a 37°C durante 24 horas) en NaCl al 0,9% y se dividió en tres porciones. La primera porción se trató con sulodexida en una concentración de 24 µg/ml; la segunda porción se trató con parnaparina en una concentración de 19 µg/ml y la tercera porción con SDX-DS obtenida mediante el Ejemplo 1 en una concentración de 5 µg/ml. Los segmentos de vena se fijaron en solución de formalina al 10%, se procesaron y se embebieron en cera de parafina. Los bloques embebidos acabados estaban ortogonalmente orientados con respecto a la dirección original del flujo sanguíneo, secciones transversales de 5 mm de espesor se cortaron y montaron sobre portaobjetos recubiertos con 3-aminopropil-trietoxisilano. Se cortaron segmentos de pared venosa en secciones seriadas de 5 µm de espesor.

25 Las secciones de vasos se incubaron a 37°C durante 5 horas con un sustrato de gelatina fluorogénica (DQ Gelatina, Molecular Probes) en una concentración de 25 µg/ml en tampón constituido por Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; CaCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM; ZnCl₂ 1 mM; NaN₃ 0,3 mM.

30 Las actividades proteolíticas se observaron in situ comparando los segmentos venosos a 530 nm, e identificándolos como fluorescencia verde. El análisis densitométrico de la zimografía in situ, en el tejido venoso, mediante la tinción citoquímica de MMP-9 de gelatina fluorogénica en presencia de SDX-DS, SDS-HEP y parnaparina con respecto al control y los datos se presentan en la Tabla 13. Se asignó un valor 100 al tejido sin ninguna adición y se midió la reducción de la fluorescencia después de la adición de SDX-DS, SDS-HEP y parnaparina.

Tabla 13

	Concentración (µg/ml)	Reducción de la intensidad %
Sulodexida*	24	50
SDX-DS	5	80
Parnaparina	19	50
*inversión		

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende sulodexida, o una sal, solvato, hidrato o clatrato farmacéuticamente aceptable de la misma, para uso en el tratamiento de una patología en la que están implicadas metaloproteinasas de matriz (MMP), seleccionadas entre la formación de venas varicosas, patologías neoplásicas y aneurisma aórtico abdominal, en donde la sulodexida se administra con una dosis diaria de 20 mg a 1000 mg por vía intravenosa, intramuscular u oral.

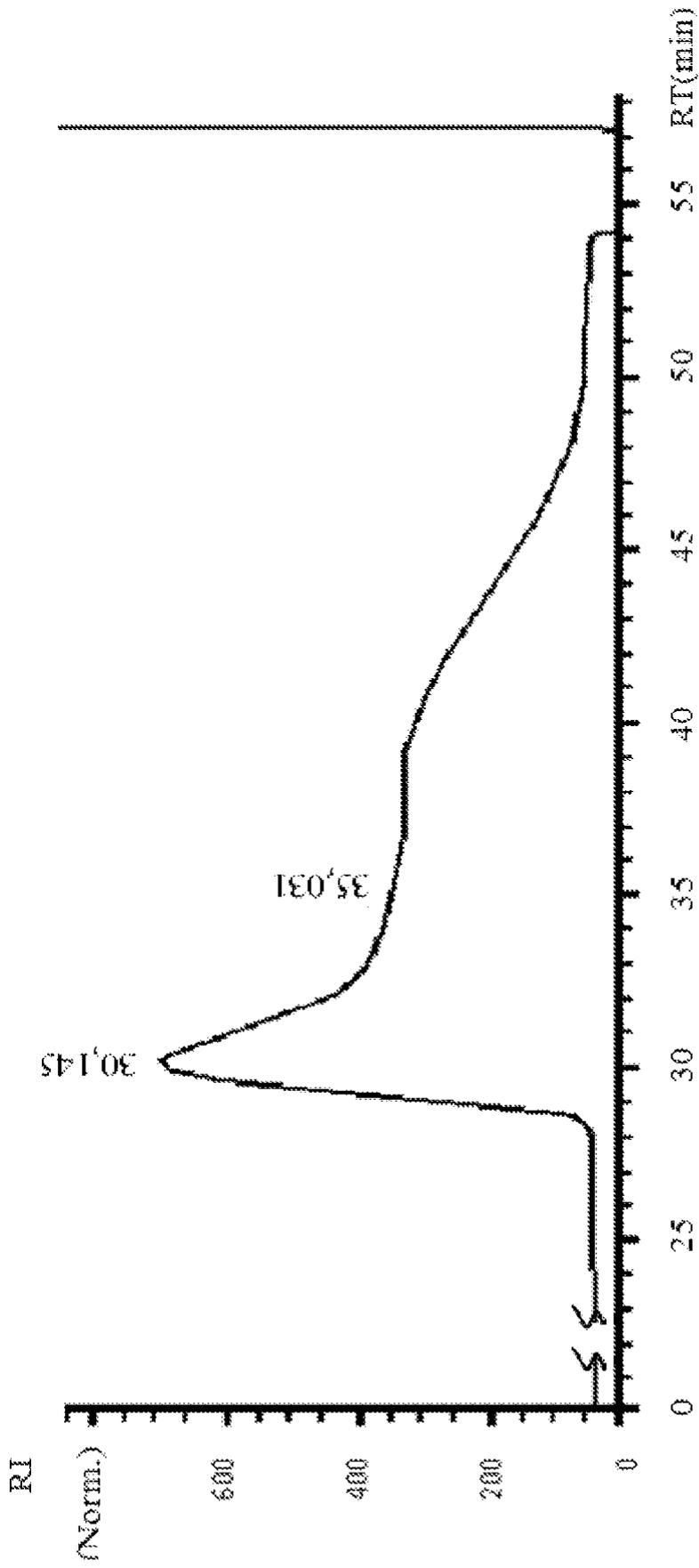


Figura 1: Perfil de permeabilidad en gel de sulodexida

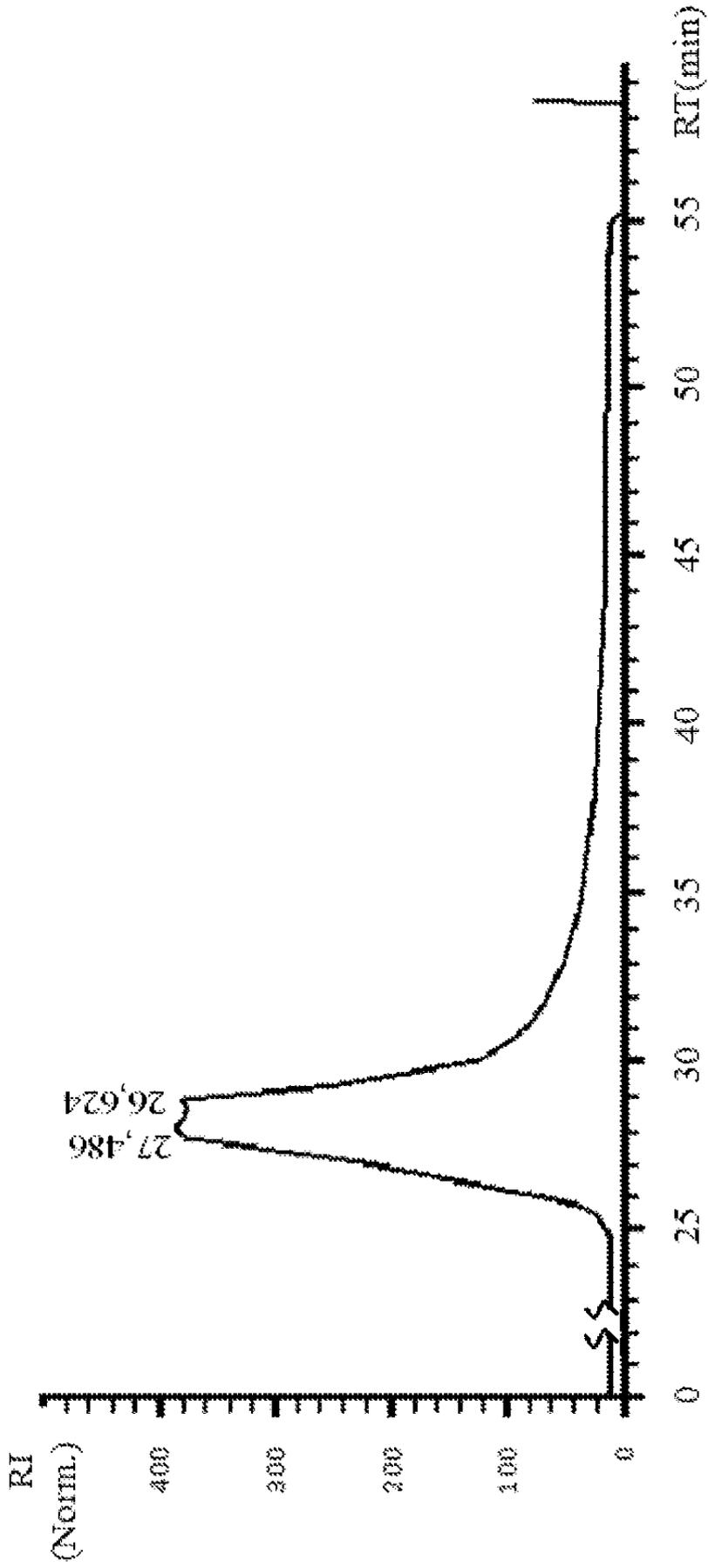


Figura 2: Perfil de permeabilidad en gel de sulfato de dermatán obtenido de sulodexida

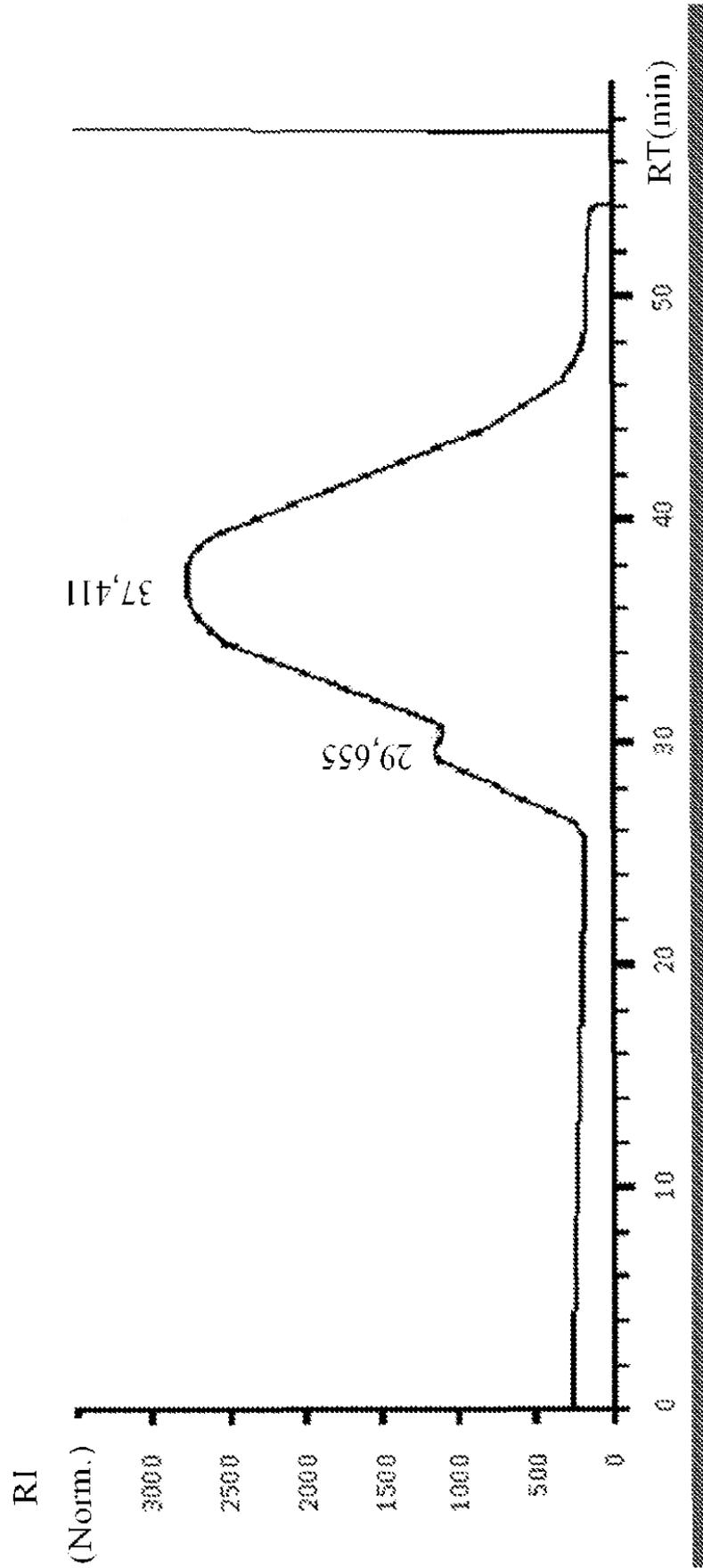


Figura 3: Perfil de permeabilidad en gel de heparina obtenida de sulodexida