

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 048**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00 (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
C08L 1/02 (2006.01)
C08L 5/02 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
C08L 5/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2011 E 16190864 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3130609**

54 Título: **Composición que comprende un agente gelificante más glucano**

30 Prioridad:

29.11.2010 GB 201020193

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

17.11.2020

73 Titular/es:

**BIOTEC PHARMACON ASA (100.0%)
Sykehusveien 23
9294 Tromsø, NO**

72 Inventor/es:

**ENGSTAD, ROLF;
RAMSØY, DAG-EIRIK y
STEENE, ERIK**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 794 048 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 que comprende un agente gelificante más glucano

5 Se divulgan composiciones compuestas de agentes gelificantes y glucanos y usos de las mismas como producto farmacéutico, como dispositivo médico, incorporadas en un dispositivo médico, como producto nutracéutico, cosmético o similares. Preferentemente, tales composiciones se usan como apósitos para heridas primarias que pueden aplicarse directamente a las superficies de la herida o proporcionarse sobre sustratos para formar un material compuesto. También se describen métodos para aplicar las composiciones de glucanos para tratar heridas. Además, se describen, en el presente documento, apósitos y kits para heridas.

15 Los glucanos son un grupo heterogéneo de polímeros de glucosa que se encuentran, entre otros, en las paredes celulares de las plantas, bacterias, hongos y protozoos. Los glucanos tienen una cadena principal y, en algunos casos, cadenas laterales que, dependiendo del origen del glucano, comprenden unidades de glucosilo enlazadas en $\beta(1,3)$, $\beta(1,4)$ y/o $\beta(1,6)$. Dependiendo de la fuente y el método de aislamiento, los beta-glucanos tienen varios grados de ramificación y tipo de enlace en la cadena principal y en las cadenas laterales. La frecuencia y el tipo de enlace en las cadenas laterales es muy relevante para la actividad biológica de la molécula. Los glucanos también difieren mucho en su peso molecular, así como en su tendencia a la agregación de la cadena, que son, ambas, características esenciales para determinar el perfil de eficacia de estas moléculas. Muchos glucanos de origen fúngico y de levaduras son insolubles en agua en su estado natural, pero pueden hacerse solubles ya sea por hidrólisis ácida o por derivación introduciendo grupos extraños como fosfato, sulfato, amina, carboximetilo y así sucesivamente en la molécula.

25 En Europa, Asia y Estados Unidos, los beta-glucanos, especialmente de la levadura de panadería, se han empleado durante mucho tiempo como aditivos para piensos para animales, en cosmética, como suplemento dietético para seres humanos, como inmunomoduladores, por ejemplo, en el tratamiento de heridas y como principio activo en formulaciones de cremas para la piel. Los glucanos se han empleado en el tratamiento del cáncer como se muestra en el documento WO 02/058711. Los beta-glucanos, en este contexto, se consideran inmunoestimulantes que aumentan la actividad de los glóbulos blancos en parte al inducir reacciones inflamatorias locales bien reguladas. Su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal también se ha descrito en el documento WO 2009/063221. Otras aplicaciones de los glucanos dentro del tratamiento de heridas se describen en el documento EP 815144 y en el documento US 6875754, así como para el tratamiento del asma y la alergia como se describe en el documento US 12/528.215.

35 Los glucanos de cereales comprenden generalmente cadenas no ramificadas de enlaces $\beta(1,3)$ y una proporción significativa de $\beta(1,4)$, mientras que los glucanos de levaduras están compuestos predominantemente por restos glucosilo enlazados en $\beta(1,3)$ con enlaces $\beta(1,6)$ actuando como puntos de ramificación para cadenas laterales que pueden comprender restos glucosilo enlazados tanto en $\beta(1,3)$ como en $\beta(1,6)$. Otras moléculas clasificadas como glucanos incluyen curdlano, una molécula básicamente lineal compuesta de restos glucosilo enlazados en $\beta(1,3)$ sin ramificaciones. El lentinano es un glucano con una cadena principal unida en $\beta(1,3)$ pero que incorpora restos glucosilo sencillos enlazados en $\beta(1,6)$ fijados esencialmente con regularidad a la cadena principal, dando una estructura en forma de peine de esta molécula. Los restos glucosilo sencillos enlazados en $\beta(1,6)$ fijados a la cadena principal equivalen a un punto de enlace $\beta(1,3,6)$ pero no se fijan moléculas adicionales a este punto de enlace y, por lo tanto, los glucanos similares a lentinano no tienen cadenas laterales. Otros ejemplos de este grupo de glucanos son el escleroglucano, laminarina y esquizofilano.

45 Las variaciones en la ramificación y la longitud y estructura de las cadenas laterales conducen a estructuras secundarias y terciarias y, por lo tanto, a actividades biológicas diferentes. Las estructuras de orden superior de los glucanos varían considerablemente y el peso molecular, la solubilidad y el tamaño de partícula influirán en la actividad de una manera generalmente impredecible. Algunos productos son inductores extremadamente potentes de citocinas inflamatorias en células diana, mientras que otros tienen el efecto contrario, inhibiendo completamente la liberación de citocinas. La inducción de toda una gama de respuestas inflamatorias es habitual para muchos productos insolubles de beta-glucanos, donde, por ejemplo, la inyección de formulaciones insolubles de beta-glucanos se ha asociado con la formación de granulomas, inducción de artritis y mayor susceptibilidad contra sepsis gramnegativa. Por otro lado, no se informa que los beta-glucanos solubles estén gravados con tales efectos secundarios negativos, pero se sabe que su eficacia como inmunoestimuladores varía sustancialmente.

50 Se ha demostrado (documento WO 95/30022), por ejemplo, que un producto de glucano derivado de levadura que se ha modificado por tratamiento con glucanasa para eliminar selectivamente las cadenas laterales enlazadas en (1,6) es más potente para estimular el sistema inmunitario de los peces que un producto con cadenas laterales enlazadas en (1,6) intactas.

65 Los glucanos tienen un gran potencial como agentes terapéuticos y adyuvantes, pero la amplia gama de variabilidad estructural, los problemas de análisis con moléculas tan grandes y complejas y la falta de comprensión sobre el mecanismo de acción y los receptores para estas moléculas, significa que todavía existe una gran necesidad de un producto de glucano mejorado, particularmente uno eficaz para el tratamiento de heridas.

Se sabe que los beta-glucanos son los llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, ya que se encuentran en la superficie de una serie de (micro)organismos patógenos, especialmente hongos. Los organismos superiores han desarrollado, por lo tanto, mecanismos para reconocer este tipo de estructuras para encontrar y destruir intrusos que pertenecen a esta clase de organismos. En los mamíferos, las llamadas células inmunitarias innatas expresan receptores específicos que reconocen los beta-glucanos y uno de los receptores más notable se llama Dectina-1, pero también están implicados otros receptores en el reconocimiento o la transducción de señales inducida por beta-glucanos, entre ellos CD11b/CD18 (CR3) y los receptores de tipo toll 2 y 4 (TLR2 y TLR4). De las células implicadas en el reconocimiento de los beta-glucanos son los fagocitos típicos del sistema inmunitario innato, es decir, monocitos, macrófagos, células dendríticas y granulocitos, pero también las células citolíticas naturales, así como varias células endoteliales y otras células más específicas de tejido las que tienen la capacidad de expresar receptores de beta-glucanos.

La etapa crucial para inducir una respuesta biológica en las células diana es la unión inicial al receptor y, además, al parecer, la capacidad de la formulación de beta-glucanos para reticular un número suficiente de receptores para inducir una transducción de señal adecuada en la célula. Se divulga un producto que tiene la capacidad de inducir un tipo específico de actividad biológica. Esto contrasta con los productos insolubles que podrían inducir una respuesta masiva mediante la unión cruzada de un gran número de receptores y, en segundo lugar, ser fagocitados, que debido a la naturaleza del glucano insoluble (o "cristalino") conduce a la ruptura lisosómica dentro de la célula que induce la activación del inflammasoma NLRP. Los beta-glucanos insolubles también pueden inducir ROS (especies reactivas de oxígeno) que también desencadenarían la activación del inflammasoma y provocarían una reacción inflamatoria desfavorable. Se divulgan productos de beta-glucano que son capaces de inducir una respuesta inflamatoria significativa que activaría varios mecanismos inmunitarios, pero sin desencadenar la activación del inflammasoma que es típica para una serie de productos de beta-glucanos (insolubles agregados).

Los productos de glucanos suelen ser particulados o en algunos casos completamente solubles en soluciones acuosas, esto último ya sea dando una solución clara y fluida como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos 5.322.841 o dando, algunas, una solución viscosa como se describe en Steiner et al (Prog Colloid Polymer Science 77, 1988). Las verdaderas formas en gel de los beta-glucanos solubles son inusuales y especialmente de glucanos de levadura solubles, pero se ha encontrado que el presente producto en gel proporciona una excelente actividad biológica, en particular en la cicatrización de heridas, en comparación con otros productos de glucanos. Además de un excelente perfil de eficacia de dispositivos farmacéuticos o médicos, en la cicatrización de heridas es de suma importancia aplicar un dispositivo farmacéutico o médico de una manera que asegure la hidratación de la herida. Además, los productos finales deben cubrir y preferentemente adherirse a la herida para evitar infecciones y proporcionar un perfil de administración que el médico considere relevante o necesario debido al tipo de herida. Habitualmente, los glucanos en su forma en partículas, semisoluble o líquida tampoco resuelven estos requisitos básicos porque no son eficaces; están en un estado que no es aplicable para fines de cicatrización de heridas, o ambos. La composición de glucano de la presente invención combina estas características necesarias, haciéndola útil para todas las aplicaciones donde una composición en gel de glucano puede encontrar un uso adecuado. Además de las aplicaciones estrictamente tópicas, otros usos incluyen la administración oral y/o mucosa, tales como en el tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal o en la cavidad oral. Las excelentes propiedades de adhesión de la composición de glucano de acuerdo con la presente invención permiten la cobertura del revestimiento de la mucosa en el sitio de acción y, por lo tanto, acelera el proceso de cicatrización. Por lo tanto, las composiciones de glucanos de la invención también pueden tener una utilidad particular en el tratamiento de la mucositis oral.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención notaron que una combinación de un beta glucano y un agente gelificante conduce a un efecto sinérgico y, por lo tanto, mejora la cicatrización de heridas. Sin quedar unido a una teoría específica, una posible explicación de este efecto de sinergia podría deberse a la presentación optimizada de los beta glucanos a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) en las células inmunitarias. Estos PRR son proteínas expresadas en la membrana celular de las células en los sistemas inmunitarios innatos. Estos PRR están diseñados para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) asociados con patógenos microbianos y estrés celular. Los PAMP instruyen a los fagocitos y a las células presentadoras de antígenos a madurar y activar además una batería adicional de funciones efectoras. Por lo tanto, un granulocito o macrófago que no haya sido estimulado con PAMP no será lo suficientemente capaz de suprimir y destruir las células y microbios diana. Los PAMP también son fundamentales en la inmunidad al garantizar que las respuestas se monten para estímulos relevantes (por ejemplo, microbios) y no para autoantígenos. Tres PRR centrales que se sabe que contribuyen en el reconocimiento de PAMP son el receptor del Complemento 3 (CD11b/CD18), el heterodímero de los receptores tipo Toll 2 y 6 y el receptor Dectina-1. La estimulación eficaz de estos receptores es una etapa crucial en la activación del sistema inmunitario innato y da como resultado un estado alterado de todas las células implicadas. Según los resultados positivos de una combinación entre dicho un beta glucano y un agente gelificante, parece que el agente gelificante puede actuar como un medio para la correcta asociación y unión cruzada de beta glucanos a los PRR ubicados en estos receptores, mejorando así la eficacia de la cascada de cicatrización de heridas.

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición de glucano para la cicatrización de heridas caracterizada por estar en forma de gel a 25 °C y a un pH entre 4 y 8 y que comprende un beta glucano derivado de levadura a una concentración de 0,1 a 6 % en

peso de la composición en una solución acuosa y del 0,2 al 3 % en peso de la composición de carboximetilcelulosa.

La presente invención también proporciona la composición anterior para su uso en terapia. La presente invención también proporciona la composición anterior para su uso en la cicatrización de heridas o úlceras, preferentemente en donde dicha úlcera es una úlcera diabética, o para su uso en el tratamiento de mucositis oral o cáncer. La presente invención también proporciona un soporte físico adecuado para la aplicación a un sitio de herida o úlcera y que se ha aplicado a la misma o incorporado a la misma la composición anterior.

Se divulga una composición en gel que comprende un glucano y un agente gelificante, cuya composición tiene un punto de fusión (gel a solución) por encima de 37 °C. El agente gelificante divulgado comprende o consiste o consiste esencialmente en uno o más carbohidratos/polisacáridos (que no sean un glucano) y está presente en una concentración que sirve para estabilizar la estructura del gel. El glucano está presente en la formulación como un gel y, por lo tanto, es una forma de glucano soluble en lugar de partículas. Se divulga un glucano que por sí solo forma un gel cuando se disuelve en agua a una concentración ≥ 1 % (por ejemplo, 1,5-6 %) a 25 °C y pH neutro.

Los productos divulgados en los que se combinan el beta-glucano y un agente gelificante, se formularían para tener las habilidades de cicatrización de heridas deseadas como se describe anteriormente. Los ejemplos incluyen 1 o 2% de beta-glucano de levadura soluble combinado con 1 o 1,5 % de carboximetilcelulosa de alto peso molecular que proporciona un gel estable y que tiene capacidades mejoradas de cicatrización de heridas en comparación con los dos cuando se usan como agentes únicos. Cuando se mezcla, el agente gelificante permitiría organizar la organización molecular del beta-glucano en un tipo de organización supramolecular favorable. Para una aplicación farmacéutica del gel divulgado, la organización de los beta-glucanos dentro del gel se estabiliza en una forma que permite la unión cruzada de los receptores en la superficie de la población de células diana, dando así una actividad inmunopotenciadora deseada, pero sin tener los efectos negativos de una formulación agregada de beta-glucano insoluble. El glucano es un glucano de levadura y preferentemente tiene una masa molar promedio en peso en una cadena sencilla de 15.000 a 50.000 g/mol y una masa molar promedio en peso en solución acuosa en una base agregada de 4 a 20×10^5 g/mol.

Una "cadena sencilla" se refiere a una molécula de glucano individual, es decir, uno en el que los restos glicosilo están enlazados covalentemente. Los "agregados" se forman a través de interacciones de enlaces de hidrógeno y definen una estructura de orden superior o supramolecular. Dichas asociaciones son menos permanentes que las proporcionadas por la unión covalente, pero los métodos descritos en el presente documento dan como resultado patrones reconocibles de agregación, cuya masa molar promedio puede analizarse utilizando las técnicas mencionadas en el presente documento. La "solución acuosa" es generalmente a pH 7.

Se aprecia que una solución acuosa puede estar en forma de gel. Las composiciones de la invención son soluciones acuosas, es decir, hidrogeles. Las composiciones en gel son preferentemente hidrocoloides hidratados. Los hidrocoloides hidratados pueden presentar un comportamiento tanto elástico como viscoso. Los hidrocoloides generalmente se gelifican cuando se favorece la unión de hidrógeno intra o intermolecular sobre la unión de hidrógeno al agua, en un grado suficiente para superar el coste entrópico.

Se divulga un agente gelificante que es preferentemente un polímero que es capaz, por sí mismo, de formar un hidrogel en solución acuosa y, en combinación con el glucano, puede potenciar las propiedades formadoras de gel del componente glucano.

Los agentes gelificantes divulgados son los que se originan a partir de celulosa, bacterias o algas como hidrogeles, alginatos, gomas gellan, así como polímeros de celulosa y derivados como carboximetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. Algunos de esos geles también han incorporado componentes adicionales como la plata. Los agentes gelificantes divulgados son preferentemente polisacáridos no glucanos. Los agentes gelificantes divulgados son preferentemente hidrocoloides y los hidrocoloides adecuados pueden ser proteicos en lugar de basados en azúcares. En todos los casos, los agentes gelificantes pueden ser agentes de origen natural, derivados de los mismos por métodos químicos o de procesamiento diferentes, o completamente sintéticos.

Se divulgan como agentes gelificantes gomas como el tragacanto y la goma xantana; alginato de sodio, gelatina y goma Gellan. Como representante de este grupo, se utiliza con frecuencia goma gellan, un producto derivado de bacterias, también calificado como AppliedGel, Phytigel o Gelrite como espesante, emulsionante y estabilizador. La goma Gellan es una goma de polisacáridos exocelular aniónica de alto peso molecular desacetilada, producida como producto de fermentación por un cultivo puro de *Pseudomonas elodea*, con una unidad repetitiva del tetrasacárido de una α -L-ramnosa, un ácido β -D-glucurónico y dos restos de 3-D-glucosa. La repetición del tetrasacárido tiene la siguiente estructura: $[D-Glc(\beta 1 \rightarrow 4)D-GlcA(\beta 1 \rightarrow 4)D-Glc(\beta 1 \rightarrow 4)L-Rha(\alpha 1 \rightarrow 3)]_n$. Las unidades de tetrasacárido están conectadas entre sí utilizando un enlace glucosídico ($\alpha 1 \rightarrow 3$). La fórmula molecular exacta de la goma gellan puede variar ligeramente (por ejemplo, dependiendo del grado en que el ácido glucurónico se neutraliza con varias sales). La goma de Gellan tiene la propiedad característica de la gelificación dependiente de temperatura e inducida por cationes. Hay tres formas básicas de producto de goma gellan que se han caracterizado y se distinguen por su 1) contenido de polisacárido, 2) el porcentaje de sustitución de o-acetilo en el polisacárido y 3) el contenido de proteína

(incluidos los restos nucleicos y otras fuentes de nitrógeno orgánico). Está disponible en dos formas (alto o bajo contenido de acilo). Los grupos acilo tienen una profunda influencia en las características del gel. La forma de alto contenido en acilo produce geles suaves, muy elásticos y no quebradizos, mientras que la forma de bajo contenido en acilo produce geles firmes, no elásticos y quebradizos. La goma gellan es prácticamente no tóxica para las ratas cuando se administra como una sola dosis grande (5 g/kg de peso corporal) en la dieta o mediante sonda.

Los productos como la carboximetilcelulosa o la metilcelulosa son representantes del grupo de agentes gelificantes derivados de la celulosa, que es un polímero de 3-D-Glucosa que se orienta con grupos $-CH_2OH$ que producen cadenas largas, sin ramificar. La celulosa es el principal material estructural de las plantas. La celulosa puede modificarse para reemplazar algunos o todos los grupos hidroxilo con otros grupos como grupos metóxido ($-OCH_3$) y grupos carboximetilo ($-CH_2-COOH$). La metilcelulosa se produce sintéticamente calentando la celulosa con una solución cáustica (por ejemplo, una solución de hidróxido de sodio) y tratándola con cloruro de metilo. Se pueden preparar diferentes tipos de metilcelulosa dependiendo del número de grupos hidroxilo sustituidos. La carboximetilcelulosa (CMC) se forma por reacción de la celulosa con álcali y ácido cloroacético. Las diferentes preparaciones de CMC pueden tener diferentes grados de sustitución, pero generalmente está en el intervalo de 0,6 - 0,95 derivados por unidad de monómero. Las moléculas de CMC son algo más cortas, en promedio, que la celulosa natural con derivatización desigual dando áreas de alta y baja sustitución. La mayoría de las CMC se disuelven rápidamente en agua fría y se utilizan principalmente para controlar la viscosidad sin gelificar como CMC, a concentraciones típicas, no gelifica incluso en presencia de iones de calcio). Su control de viscosidad permite su uso como espesante, estabilizante de fase y emulsión, y agente de suspensión. CMC también se puede utilizar por su capacidad de retención de agua, ya que es alta incluso a baja viscosidad; particularmente cuando se usa como sal de Ca^{2+} . La carboximetilcelulosa (CMC) o la goma de celulosa se usa a menudo como su sal de sodio, carboximetilcelulosa sódica.

El alginato es el biopolímero marino más abundante y, después de la celulosa, el biopolímero más abundante del mundo. La principal fuente de alginato se encuentra en las paredes celulares y los espacios intracelulares de las algas pardas, tal como algas gigantes (*Macrocystis pyrifera*). Los alginatos también son sintetizados por algunas bacterias (por ejemplo, especies de *Azotobacter* y *Pseudomonas*). Los alginatos son las sales y los ésteres del ácido alginico. Los constituyentes químicos del alginato son secuencias aleatorias de cadenas de ácidos β -D-manurónico y α -L-gulurónico unidos con enlaces 1 \rightarrow 4. Los alginatos son insolubles en agua, pero absorben el agua fácilmente. El uso de alginato como agente inmovilizante en la mayoría de las aplicaciones se basa en su capacidad para formar geles fuertes estables al calor que pueden desarrollarse y fraguarse a temperatura ambiente. Es la formación de gel de alginato con iones de calcio lo que ha sido de interés en la mayoría de las aplicaciones.

Otros agentes formadores de gel divulgados son carbómeros; polímeros hidrófilos tales como los óxidos de polietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y alcohol polivinílico.

Se divulgan combinaciones usadas para preparar composiciones eficaces que contienen glucano en forma de gel con cualquier material de partida de glucano soluble. El efecto sinérgico observado significa que, para una concentración dada de glucano, la composición en gel demostrará una actividad superior. Los expertos en la materia conocen productos de glucano solubles y algunos están disponibles comercialmente. Los glucanos presentes en la composición de la invención derivan de levadura, preferentemente de *Saccharomyces cerevisiae*. La estructura molecular básica de estos glucanos es generalmente una cadena principal β -1,3 (es decir, una cadena de moléculas de glucosa enlazadas por enlaces β -1,3), además de las cadenas laterales β -1,3 (es decir, una cadena de al menos dos moléculas de glucosa enlazadas por enlaces β -1,3) y un punto de enlace β -1,3,6 que une las cadenas laterales a la cadena principal. Además, los glucanos de levadura comprenden enlaces β -1,6 que pueden estar enlazados a las cadenas laterales o directamente a la cadena principal. Existen otros tipos de enlaces, pero a un nivel comparativamente bajo. Otras levaduras que pueden proporcionar una fuente para el glucano incluyen la levadura de cerveza, *Candida* sp. como *Candida albicans*, *Candida cloacae*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Hansenula* sp. como *Hansenula wingei*, *Hansenula ami*, *Hansenula henricii* y *Hansenula americana*, *Histoplasma* sp., *Kloeckera* sp., *Kluyveromyces* sp. como *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces polysporus*, *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces* sp. como *Saccharomyces delbruekii*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces microellipsodes*, *Saccharomyces carlsbergensis* o diferentes cepas de *Saccharomyces* como *Saccharomyces cerevisiae* R4 (NRRL Y-15903) y R4 Ad (ATCC N.º 74181), *Schizophyllum* sp., *Schizosaccharomyces* sp. como *Schizosaccharomyces pombe*, *Torula* sp. y *Torulopsis* sp.

Se divulgan glucanos derivados de otras fuentes adecuadas, por ejemplo, glucanos bacterianos, fúngicos o de cereales. La falta de capacidad de formación de gel del beta-glucano *per se* se puede compensarse con la capacidad de formación de gel de agentes como CMC, como se describe anteriormente, dando un producto con las propiedades de cicatrización de heridas deseadas. Las actividades terapéuticas de diferentes glucanos están bien documentadas en la técnica y la composición de la presente invención puede usarse en la cicatrización de heridas donde se ha demostrado, por los presentes inventores, que la forma física y la estructura intermolecular del producto de glucano, es particularmente significativa. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, una regla general es que cuanto mayor es la masa molar promedio en peso en una base de cadena sencilla del glucano utilizado en las composiciones de la invención, se pueden producir geles más eficaces.

Las cadenas laterales de un glucano que forma gel comprendido en la composición de la presente invención habitualmente comprenden 2 o más unidades de glucosilo enlazadas en $\beta(1,3)$. De acuerdo con la presente invención, las moléculas sencillas unidas a una cadena principal no se consideran "cadenas laterales".

5 Los glucanos que forman gel tienen preferentemente cadenas laterales de, es decir, que consisten o que consisten esencialmente en, unidades de glucosilo enlazadas en $\beta(1,3)$ (por ejemplo, cadenas laterales de al menos 2, 5, 10 o 20 restos glucosilo unidos). Además de las cadenas laterales enlazadas en $\beta(1,3)$, los glucanos también pueden tener una o más cadenas laterales enlazadas en $\beta(1,6)$. Al alterar las cadenas de la estructura es posible alterar las características del producto final. Hay muchas formas diferentes de alterar los glucanos, incluido el tratamiento
10 enzimático, uso de ácidos como el ácido fórmico o ácido clorhídrico o diferentes bases, así como por otros medios. Los glucanos preferidos son aquellos que se han tratado por ácido (por ejemplo, ácido fórmico) o enzima o cualquier otro método adecuado para reducir o eliminar significativamente el número de moléculas de glucosa repetitivas (1,6) enlazadas dentro del glucano. Estos restos glucosilo (1,6) enlazados normalmente se encontrarían en las cadenas laterales de beta-glucanos derivados de levadura. Los glucanos resultantes tienen cadenas principales $\beta(1,3)$ y cadenas laterales $\beta(1,3)$ que están enlazadas a ellas a través de un enlace $\beta(1,6)$ sencillos que no se escinde mediante el tratamiento de eliminación.

Los glucanos preferidos están esencialmente libres de restos glucosilo enlazados en $\beta(1,6)$ repetitivos. Los enlaces individuales (1,6) en los puntos de ramificación (los puntos de ramificación $\beta(1,3,6)$) no proporcionan unidades glucosilo enlazadas en $\beta(1,6)$ 'repetitivas'. Por "esencialmente libre" se entiende menos del 6 %, preferentemente menos del 4 % y lo más preferentemente menos del 3% de las unidades glucosilo totales.

Algunos tratamientos, tales como tratamientos enzimáticos, puede dejar hasta 4 unidades glucosilo beta-1,6 enlazadas, pero generalmente 2 beta 1,6 enlazadas sin escindir en las cadenas laterales. Dichas moléculas también están 'esencialmente libres' de unidades glucosilo repetitivas 1,6 enlazadas.

La distribución de enlaces dentro de los glucanos preferidos puede representarse de la siguiente manera:

Tipo de resto glucosilo enlazado	%
$\beta(1,3)$	80-98
$\beta(1,6)$	0-6
$\beta(1,3,6)$	1-8
Terminal	0,01-6

30 $\beta(1,3,6)$ se refiere a los restos del punto de ramificación que están (1,3) enlazados en la cadena principal y participan en una conexión (1,6) para proporcionar una cadena lateral.

El glucano podría tener la forma de una sola, fracción extraída o dos o más fracciones diferentes con diferentes pesos moleculares promedio.

Los glucanos están preferentemente sin derivatizar en términos de grupos modificadores químicos.

La masa molar de los glucanos se puede determinar de diferentes maneras. En el caso de un producto de glucano soluble, la masa molar se mide convenientemente mediante análisis SEC-MALS-RI (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo y detección de índice de refracción), y dicho análisis proporciona un valor de masa molar promedio en peso (M_w) para la muestra, así como la distribución de diferentes pesos moleculares dentro de la muestra. En la presente invención, la masa molecular promedio en peso (M_w) se define de la siguiente manera:

$$45 \quad M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i}$$

Dónde n_i es el número de moléculas con masa molar M_i . La concentración en peso C_i de moléculas con masa molar M_i es proporcional a la masa molar M_i y a la cantidad de moléculas n_i .

$$50 \quad c_i = M_i n_i \Rightarrow n_i = c_i / M_i$$

El detector RI mide la concentración de peso para cada segmento del cromatograma, mientras que el detector MALS mide la masa molar para cada segmento del cromatograma en combinación con el detector RI. Los cálculos se basan en la teoría de dispersión de luz.

55

Específicamente, la masa molecular promedio (para cadenas sencillas) se determina mediante SEC-MALS-RI en DMAc con LiCl al 0,5 % (dimetilacetamida con cloruro de litio al 0,5 %) suponiendo una dn/dc de 0,12 para el glucano en este disolvente. El disolvente DMAc/LiCl disuelve completamente el dicho glucano en cadenas sencillas y el posterior análisis SEC-MALS-RI con DMAc con 0,5 % de LiCl como eluyente, por lo tanto, proporciona una medida de la distribución del peso molecular en un nivel de cadena sencilla. En resumen, el análisis del glucano en DMAc/LiCl implica la disolución del glucano seco en el disolvente a una concentración de aproximadamente 3 mg/ml agitando la solución a temperatura ambiente durante la noche y calentándola a 100 °C durante 1 h, antes del análisis por SEC-MALS-RI utilizando 3 columnas PgelPLgel Mixed-A LS y DMAc/con LiCl al 0,5 % como eluyente. La masa molar promedio en peso para el glucano en una cadena sencilla es preferentemente de 15.000 a 50.000 g/mol, más preferentemente de 25.000 a 45.000 g/mol, lo más preferentemente de 30.000 a 40.000 g/mol.

En solución acuosa, la masa molar promedio en peso de las estructuras y agregados de glucanos de orden mayoritariamente superior presentes es preferentemente de $4-20 \times 10^5$ g/mol, más preferentemente $5-153 \times 10^5$ g/mol, y lo más preferentemente $6-12 \times 10^5$ g/mol. Estos promedios se calculan preferentemente cuando se excluyen los agregados muy grandes, es decir, masa molar por encima de $1,0 \times 10^7$ g/mol. El análisis del glucano en solución acuosa implica diluir la solución de gel a aproximadamente 3 mg/ml en NaNO_3 0,1 M/ NaN_3 al 0,02 %, calentar a 100 °C en un tubo de vidrio tapado durante 30 minutos, enfriar a temperatura ambiente, filtrar a través de un filtro de jeringa de 0,2 mm y realizar el análisis por SEC-MALS-RI usando columnas TSKgel G5000 PWXL + TSKgel G4000 PWXL y NaNO_3 0,1 M/ NaN_3 al 0,02 % como eluyente. Configuraciones similares con, por ejemplo, Na_2SO_4 0,05 M/ EDTA 0,01 M como disolvente/eluyente da resultados equivalentes. La combinación de valores de masa molar para las cadenas sencillas y las estructuras/agregados de orden superior en solución acuosa proporciona una buena indicación de la estructura molecular y supramolecular de los glucanos preferidos utilizados en las formulaciones de la invención.

Los geles de glucanos anteriores son ejemplos de glucanos de acuerdo con la presente invención. Estos productos de glucano se caracterizan por estar en forma de gel a 25 °C y a un pH entre 4 y 8. Estos geles de glucanos se caracterizan además por su perfil de viscosidad ejemplificado por la temperatura de fusión de los geles (gel a sol) por encima de 30 °C y hasta aproximadamente 80 °C, preferentemente por encima de la temperatura corporal normal.

El punto de fusión del gel para un producto de glucano, es decir, la temperatura de transición gel \rightarrow sol, se determina convenientemente mediante mediciones oscilatorias de tensión pequeña utilizando un reómetro Stresstech HR o similar y examinando los cambios viscoelásticos durante el enfriamiento (70 \rightarrow 10 °C) y el calentamiento (10 \rightarrow 70 °C) de la solución de glucanos. Otra forma de determinar la temperatura de fusión aproximada del gel es medir la viscosidad (por ejemplo, usando un viscosímetro rotacional) del gel a una temperatura secuencialmente más alta hasta que la viscosidad desaparezca esencialmente y el gel se haya transformado en una solución.

Los glucanos preferidos comprendidos en la composición de la presente invención desencadenan la expresión de TNF α y CXCL2/MIP2 α en macrófagos peritoneales de ratón. También se observa una inducción débil de TNF α en células dendríticas mieloides humanas derivadas de monocitos de sangre periférica.

El efecto de los beta glucanos preferidos sobre la liberación de TNF α depende de la dosis y parece disminuir a concentraciones de glucano por encima de un cierto valor umbral, por ejemplo, 2-4 mg/ml en una variante de la línea celular RAW que sobreexpresa el receptor de beta glucano dectina-1. Una inducción de moderada a baja de TNF α y CXCL-2 es especial para los productos de la presente invención. Tanto TNF α como CXCL-2 son instrumentales en la cicatrización de heridas. La quimiocina murina CXCL2 estimula la migración celular y la angiogénesis y puede usarse como marcador sustituto de la actividad angiogénica en el tejido de granulación inflamatoria.

Los glucanos preferidos comprendidos en la composición de la presente invención no desencadenan una potente expresión de IP-10 (CXCL-10). IP-10 es miembro de la familia de quimiocinas alfa o cisteína-X aminoácido-cisteína (CXC) de citocinas quimiotácticas. Se han detectado altos niveles de expresión de IP-10 en una serie de afecciones inflamatorias humanas crónicas, incluyendo psoriasis, una enfermedad inflamatoria común de la piel. Los pacientes generalmente han mostrado una respuesta de cicatrización de heridas anormal caracterizada por una fase inflamatoria más intensa y una fase de granulación prolongada y desorganizada con formación de vasos sanguíneos deteriorada. Los glucanos comprendidos en la composición de la presente invención no deberían potenciar la expresión inducida por LPS de IP10 a partir de células dendríticas humanas, y preferentemente inhibir la expresión inducida por LPS de IP-10 a partir de macrófagos cosechados de ratones db/db. Esto muestra que los glucanos preferidos comprendidos en la composición de acuerdo con esta invención activan elementos beneficiosos del proceso de cicatrización de heridas mientras que desactivan los inhibidores que conducen a una fase de cicatrización prolongada.

Además, las composiciones en gel de glucano de la invención activan preferentemente el sistema del complemento.

Las composiciones de glucanos de la presente invención tienen excelente eficacia *in vivo* como agentes de cicatrización de heridas, como se muestra en los Ejemplos.

El glucano usado en la composición de la presente invención puede ser una variante más potente, específicamente los beta glucanos solubles con capacidad para inducir la diferenciación de las células dendríticas mieloides humanas hacia un fenotipo inflamatorio, estimular significativamente la secreción de TNF-alfa y también inducir la producción

de G-CSF e IL-10 por las células dendríticas. En todos los casos, la secreción de CXCL-10 debería ser básicamente a nivel basal y no verse afectada por el tratamiento descrito en el presente documento, es decir, combinación con un agente gelificante. Esto es importante e ilustra que el glucano preferido estimula la secreción de un conjunto o combinación específicos de citocinas. El glucano preferido también puede estimular a los macrófagos de ratones diabéticos (db/db) para secretar PGE2 y GM-CSF.

El gel de glucano usado en los Ejemplos de acuerdo con la presente invención era un gel acuoso y aunque la forma del gel puede confirmarse mediante inspección visual, el perfil de viscosidad no newtoniano y la naturaleza pseudoplástica y tixotrópica del gel de glucano también se pueden determinar mediante la medición de la viscosidad, por ejemplo, utilizando un viscosímetro rotacional. Un gel de glucano al 2 % como se usa en los ejemplos, tiene una viscosidad de al menos 1000 cP, preferentemente al menos 1500 cP, medido a 25 °C y una velocidad de rotación de 10 rpm utilizando un viscosímetro programable Brookfield DV-II + Pro con un pequeño adaptador de muestra y husillo SC4-31 (correspondiente a una velocidad de corte de 3,40 segundos⁻¹). Un método conveniente para medir la viscosidad de este gel pseudoplástico y tixotrópico es usar una llamada rampa de velocidad ascendente-descendente, por ejemplo, comenzando a 2 rpm y subiendo en incrementos de 2 rpm a 10 rpm y luego bajando nuevamente en etapas de 2 rpm. Los datos de tal experimento pueden demostrar tanto las características pseudoplásticas (disminución de la viscosidad al aumentar la velocidad de corte) como tixotrópicas (disminución de la viscosidad con el tiempo mientras se somete a corte), así como proporcionar una medida de, por ejemplo, una viscosidad de 10 rpm.

Los glucanos con las propiedades ventajosas anteriores para su uso en las composiciones de la invención se pueden preparar por cualquiera de los dos métodos descritos a continuación y con más detalle en los Ejemplos. En cada caso, se toma una solución de moléculas de glucano y después se trata mediante calentamiento (u otra fuente de energía) o con un agente químico que destruye los enlaces de hidrógeno intermoleculares existentes. Después, ese producto se enfría rápidamente para formar un gel o se añade un agente que sirve para alentar la reformación de los enlaces de hidrógeno entre las cadenas de glucano. Como se analiza posteriormente, el agente gelificante puede añadirse antes de la etapa de tratamiento para disociar los enlaces de hidrógeno entre (y potencialmente intra) cadenas. Alternativamente, el agente gelificante se puede añadir después de esa etapa, pero antes de la etapa de tratamiento que da como resultado la formación de enlaces de hidrógeno y, por lo tanto, la formación de gel. Se divulga un método para producir una composición en gel como se divulga en el presente documento que comprende:

- a) tratar una solución acuosa de moléculas de glucano, opcionalmente junto con un agente gelificante, para disociar los enlaces de hidrógeno del glucano;
- b) opcionalmente añadir agente gelificante al producto de la etapa a); y después
- c) tratar la solución acuosa para reformar los enlaces de hidrógeno dentro del glucano. En particular, los enlaces de hidrógeno se forman entre las cadenas/moléculas de glucano, estos enlaces se "reformaron" porque después de la etapa a) la cantidad de enlaces de hidrógeno se redujo significativamente y aumentó en la etapa c). No están "reformados" en el sentido de que el patrón de enlace de hidrógeno dentro del material de partida se regenera, si no que el proceso genera un patrón diferente.

De acuerdo con un método divulgado para producir una composición como se divulga anteriormente, una solución acuosa de moléculas de glucano se calienta a una temperatura de 120-130 °C, preferentemente 120-125 °C y se mantiene a esa temperatura durante 10-30 minutos, la solución de glucanos se enfría después a una temperatura de 35-50 °C, preferentemente 35-40 °C, durante un período de tiempo no mayor de 80 minutos, preferentemente menos de 60 minutos, por ejemplo, 50-60 minutos. Los tiempos de enfriamiento más cortos (por ejemplo, 25-50 minutos) pueden ser apropiados para volúmenes más pequeños (por ejemplo, menos de 100 litros), las cifras anteriores se refieren a un volumen de producto de partida de 220 litros. Los tiempos de enfriamiento anteriores se consideran rápidos, ya que no dependen de un retorno sin asistencia a temperatura ambiente. Al hacer esto, se creará un gel en "almiar" altamente organizado al azar sin tener la típica estructura de triple hélice de las cadenas de beta-glucano "emparejadas". De acuerdo con esta etapa de calentamiento y enfriamiento, se energiza una preparación de beta-glucano solubilizado para solubilizar esencialmente el gel de glucano, destruyendo así la estructura de orden superior existente e induciendo una organización aleatoria con una gran proporción de moléculas de cadena sencilla libres.

Por enfriamiento rápido, las moléculas se "congelan" a una nueva conformación molecular estableciendo rápidamente interacciones intermoleculares en las que el producto no forma principalmente estructuras helicoidales triples. Las moléculas se congelan así en una posición molecular más aleatoria.

El calentamiento se realiza preferentemente en un tanque aislado y agitado lo suficientemente grande como para contener todo el lote de producto, con una funda o estructura similar para permitir el calentamiento del exterior del tanque. El tamaño del lote, la capacidad del sistema de calentamiento, la relación volumen a superficie del tanque y el efecto del agitador deben equilibrarse de tal manera que todo el lote pueda calentarse a las temperaturas especificadas dentro de un período de tiempo razonable, asegurando al mismo tiempo un calentamiento homogéneo de todo el lote. Alternativamente, la etapa de energización puede tener lugar después de que el producto se haya llenado en su recipiente final, ya sea por calentamiento en un autoclave o por formas alternativas de energización, por ejemplo, ultrasonido o micro ondas.

Si la etapa de energización se ha realizado para todo el lote en un tanque, el enfriamiento activo se realiza

preferentemente en el mismo tanque y requerirá la capacidad de usar la funda del tanque para enfriar la superficie del tanque. De nuevo el tamaño del lote, la capacidad del sistema de enfriamiento, la relación volumen a superficie del tanque y el efecto del agitador deben equilibrarse para permitir que el enfriamiento tenga lugar dentro del tiempo especificado, asegurando al mismo tiempo un enfriamiento homogéneo de todo el lote. Este enfriamiento inicial debe estar seguido por el llenado del producto en los recipientes finales y el posterior enfriamiento de los recipientes a temperatura ambiente. La etapa de enfriamiento se realiza preferentemente de manera inmediata después de la etapa de calentamiento, es decir, inmediatamente (en la medida en que sea práctico con el equipo en cuestión) después de que el glucano se haya mantenido a temperatura elevada durante 10-30 minutos.

En el ejemplo 1 se describe un procedimiento adecuado para realizar las etapas de calentamiento y enfriamiento en un proceso industrial.

Si la etapa de energización se ha realizado en los recipientes finales, estos recipientes deben enfriarse a temperatura ambiente dentro del marco temporal descrito anteriormente.

La etapa de calentamiento y enfriamiento descrita anteriormente puede repetirse, por ejemplo, una vez más.

La concentración de glucano en solución acuosa antes de la etapa de calentamiento y enfriamiento rápido es preferentemente de 1,5-6 %.

La etapa de calentamiento y enfriamiento anterior se puede realizar en cualquier solución acuosa de moléculas de glucano; los glucanos preferidos, incluidos los glucanos con ramificación modificada, se analizan anteriormente y la solución de glucanos será preferentemente una solución de glucanos de levadura. El material de partida para las etapas de calentamiento y enfriamiento puede estar en forma de gel, así, el calentamiento da como resultado una transición a sol y el enfriamiento da como resultado la formación de una estructura de gel diferente a la del material de partida. La masa molar promedio en peso (M_w) de los glucanos en la solución de partida es preferentemente alta, preferentemente, basada en una sola sencilla, la masa molar promedio en peso de los glucanos en solución está por encima de 15.000, más preferentemente por encima de 20.000, más preferentemente por encima de 25.000 g/mol. Los métodos adecuados para determinar estos valores de masa se dan anteriormente.

Los glucanos generalmente se extraen de su material fuente (por ejemplo, hongos, levaduras o cereales) en forma de partículas, pero los métodos para generar formas solubles a partir de glucanos en partículas son conocidos en la técnica e incluyen tratamientos con ácidos o álcalis, tal como la etapa de formolisis descrita en el documento WO 95/30022. Los productos de glucanos solubles de cereales como la cebada están disponibles en Sigma Chemical. Un material de partida en partículas, tal como se puede preparar por el protocolo en el Ejemplo 1 del documento WO 95/30022, se solubilizará, preferentemente, calentando en ácido fórmico durante al menos dos horas. La formolisis realizada sobre material de partida de glucanos en partículas puede causar convenientemente la eliminación selectiva de cualquier cadena lateral de glucosilo enlazada en $\beta(1,6)$, así como solubilizar el glucano en partículas.

El método de producción anterior también puede comprender una etapa de calentamiento preliminar, antes de la etapa de calentamiento y enfriamiento rápido descrita anteriormente, donde el producto tratado con ácido fórmico se hierve ($> 100^\circ\text{C}$) durante al menos 30 minutos. Después de que el producto se haya enfriado, se trata preferentemente para eliminar los materiales en partículas por métodos habituales conocidos en la técnica, por ejemplo, por centrifugación o filtración.

El glucano en partículas que se trata para producir una forma soluble para procesamiento adicional deriva preferentemente de paredes celulares, en particular de paredes celulares de levaduras, a las que se les han eliminado los componentes proteicos y otros restos como el manano y la quitina, por ejemplo, mediante lavado.

Un ejemplo de un producto de glucano de levadura en partículas adecuado está producido por Biotec Pharmacon ASA, que proviene de la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) y se conoce como NBG Cos®. Otro ejemplo de materias primas de glucanos en partículas son las partículas de glucano completas como el producto Imprime WGP™. NBG Cos® es un glucano $\beta(1,3)/(1,6)$ en partículas no derivatizado (en términos de grupos químicos modificadores), caracterizado por RMN y análisis químico que consiste en polímeros de D-glucosa enlazada en beta-1,3 que contienen cadenas laterales de D-glucosa enlazadas en beta-1,3 y beta-1,6.

Como alternativa al protocolo anterior, la misma solución de partida de moléculas de glucano puede tratarse con un agente capaz de disociar enlaces de hidrógeno entre cadenas de glucano, seguido de tratamiento con un agente capaz de restaurar las interacciones entre enlaces de hidrógeno intercatenarios.

Uno de estos agentes para disolver los enlaces de hidrógeno entre los grupos OH en la cadena de poliglucosa sería el hidróxido de sodio (NaOH) en una concentración suficiente que desprotonaría los numerosos grupos OH en las cadenas. Esto conduciría a una disociación completa de todos los enlaces intermoleculares habituales de estos glucanos de alto peso molecular, dando como resultado una organización aleatoria de las cadenas en solución. Al neutralizar la solución mediante la adición de ácido para neutralizar el álcali, los grupos OH se reforman y se pueden establecer nuevos enlaces de hidrógeno entre las cadenas.

El uso de NaOH como agente generalmente necesitaría la adición de, por ejemplo, solución de NaOH 2 M a una concentración final por encima de 50 mM, o más preferentemente de aproximadamente 150 mM a una concentración de glucano soluble de 1-6 % en solución acuosa, más preferentemente 1,5-4 % o lo más preferentemente 2-4 %. Para neutralizar la solución, se puede añadir una cantidad equimolar de, por ejemplo, ácido clorhídrico (HCl) 2 M a la solución en agitación durante un breve período que es lo suficientemente largo como para garantizar una neutralización eficaz, por ejemplo, menos de un minuto para un volumen similar a 1000 ml, después de lo cual se deja la solución para establecer la conformación en gel, por ejemplo, 1-10 minutos para un volumen de 1000 ml. Cualquier otro agente que tenga la capacidad de disociar los enlaces de hidrógeno podría reemplazar al NaOH y cualquier otro agente capaz de permitir rápidamente el restablecimiento de los enlaces de hidrógeno que forman un tipo de gel en "almiar" podría reemplazar al HCl. El experto en la materia conoce otros agentes que pueden alterar y después restaurar los enlaces de hidrógeno, las bases y los ácidos, son particularmente convenientes ya que uno puede equilibrarse fácilmente contra el otro para neutralizar el impacto del agente que ha roto los enlaces de hidrógeno. Se pueden usar otros ácidos fuertes tal como el ácido fórmico o el ácido sulfúrico. También pueden ser agentes potenciales para la desprotonación y ruptura de los enlaces de hidrógeno, otras sales alcalinas que incluyen, pero sin limitación, hidróxido potásico, hidróxido de litio e hidróxido de calcio, así como posiblemente las llamadas superbases tal como el hidruro de sodio o la amida de sodio. Se puede utilizar cualquier ácido con la calidad adecuada para neutralizar la solución y para restaurar los enlaces de hidrógeno, esto incluye, pero sin limitación, ácido fosfórico, ácido acético y ácido cítrico. La urea o la formamida también se usan comúnmente para alterar los enlaces de hidrógeno y posiblemente podrían usarse en este proceso. La naturaleza del agente de restauración estaría dictada por los requisitos establecidos por las aplicaciones posteriores y específicamente la presencia de sales.

Se apreciará que en un sistema que involucra moléculas orgánicas grandes y complejas, no es factible ni necesario garantizar que todos los enlaces de hidrógeno se hayan roto o que todas las cadenas moleculares participen en enlaces de hidrógeno significativos después de que se hayan aplicado condiciones que permitan la restauración de los enlaces de hidrógeno. Sin embargo, las condiciones aplicadas serán tales como alterar radicalmente la organización y el grado de enlace de hidrógeno en la solución de glucanos en general. El lector experto es consciente del impacto en una solución de glucanos de, por ejemplo, NaOH 150 mM y se puede seleccionar, en consecuencia, la concentración de otros destructores de enlaces de hidrógeno. El propósito de la segunda etapa, donde se proporcionan condiciones que permiten el restablecimiento de enlaces de hidrógeno, es neutralizar o revertir rápidamente, de manera eficaz, el efecto sobre las posibles interacciones electrostáticas intermoleculares causadas por la adición del destructor de enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, la naturaleza y concentración de este segundo agente procederá de la selección del destructor de enlaces de hidrógeno.

En un proceso industrial, las etapas se realizarán convenientemente en un tanque lo suficientemente grande como para contener todo el lote de producto.

Pueden repetirse las etapas de ruptura y después la restauración de enlaces de hidrógeno como se describe anteriormente, por ejemplo, una vez más.

La composición comprende 0,1-6% de glucano derivado de levadura en una solución acuosa. Preferentemente, la composición comprende 0,2-2 % de dicho glucano en una solución acuosa. El uso de diferentes concentraciones ciertamente depende del propósito y los diferentes modos de administración. Un agente gelificante o un agente de viscosidad o una mezcla apropiada de tales agentes estará generalmente presente en un 0,2 -3 %, preferentemente en un 0,25-2 %, más preferentemente en un 0,75 -1,75 %, lo más preferentemente en un 1-1,5 % en peso de la composición.

Para ayudar a la formación de gel y aumentar la viscosidad, se usan otros agentes formadores de gel tales como, pero sin limitación, goma arábiga, agar, ácido acrílico y sus derivados, poliacrílico y sus derivados tal como el polibutylmetacrilato y el ácido polimetacrílico, polimetacrilato, palmitato de ascorbilo, carbómero, cera de carnauba, gel gellan, ácido alginico y las sales correspondientes, derivados de celulosa tales como ftalatos de acetato de celulosa, croscarmelosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa y compuestos relacionados, carboximetilcelulosa y sus sales, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hipromelosa, alcohol cetílico y derivados, cera microcristalina, poloxámero, polietilenglicol, poliuretano, acetato de polivinilo, ftalato de acetato de polivinilo, alcohol de polivinilo, goma de silicona y derivados, goma laca, derivados de triglicéridos, y combinaciones de los mismos.

La composición puede consistir en un agente humectante o emoliente tal como, pero sin limitación, glicerina, propilenglicol, triacetina, ciclometicona, povidona y combinaciones de los mismos.

Como ejemplos de geles en combinación de acuerdo con la invención sería glucano soluble al 1 o 2 % mezclado con una carboximetilcelulosa de alto peso molecular hasta una concentración final de este último de 1 o 1,5 %. El gel de la formulación puede establecerse añadiendo la cantidad apropiada de CMC en una solución acuosa de glucano al 1 o 2 %. Después de que CMC se haya disuelto completamente, la formulación se calienta por encima de o aproximadamente a 100 °C y se enfría rápidamente para formar un gel con las propiedades apropiadas.

Una formulación en gel descrita es un glucano al 2 % mezclado con un gel gellan hasta una concentración final del 0,3 %, donde la solución de glucano se calienta por encima de o aproximadamente a 100 °C y se añade la cantidad apropiada de polvo seco de goma gellan. Se deja que el polvo se disuelva y se enfría a aproximadamente 50 °C donde después se añade CaCl₂ a una concentración final de aproximadamente 5 mM se agrega para inducir la formación de gel. La solución se enfría rápidamente para estabilizar el gel formado.

Una formulación en gel descrita es un glucano al 0,5 % mezclado con un gel gellan hasta una concentración final del 0,5 %, donde la solución de glucano se calienta por encima de o aproximadamente a 100 °C y se añade la cantidad apropiada de polvo seco de goma gellan. Se deja que el polvo se disuelva y se enfría a aproximadamente 50 °C donde después se añade CaCl₂ a una concentración final de aproximadamente 5 mM se agrega para inducir la formación de gel. La solución se enfría rápidamente para estabilizar el gel formado.

Un ejemplo de un gel en combinación sería un glucano al 1 % mezclado con una carboximetilcelulosa de alto peso molecular y glicerol hasta una concentración final de los dos últimos al 1 % y 20 %, respectivamente. El gel de formulación puede establecerse añadiendo la cantidad apropiada de CMC en una solución acuosa de glucano al 1%. Después de que CMC se haya disuelto completamente, la formulación se calienta por encima de o aproximadamente a 100 °C seguido de la adición de glicerol. A continuación, la formulación se enfría rápidamente para formar un gel con las propiedades apropiadas.

Las composiciones de glucano de la presente invención son agentes terapéuticos potentes y, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona las composiciones como se describen en el presente documento para uso en terapia, en particular para el tratamiento de afecciones en las que un sujeto necesita una potenciación sistémica o local de la respuesta inmunitaria, por ejemplo, donde hay daño tisular o infección. Las composiciones son de particular utilidad para ayudar a la cicatrización de heridas o úlceras y en el tratamiento de mucositis oral. También son de utilidad para tratar cáncer o reducir el tamaño tumoral.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona, por lo tanto, la composición de glucano de la presente invención como se describe en el presente documento para su uso para ayudar a la cicatrización de heridas o úlceras o para tratar mucositis oral o cáncer en un sujeto que lo necesite.

El glucano se administra preferentemente por vía oral. El glucano se administra, preferentemente, a una dosis de 5 a 200 mg/kg/día, más preferentemente de 20 a 100 mg/kg/día.

Se hace referencia a "ayudar" a la cicatrización de heridas o úlceras porque algunas heridas o úlceras cicatrizarán de manera natural y otras no podrán, pero se ha demostrado que las composiciones de la invención aceleran la cicatrización de heridas y úlceras. En algunos casos, la cicatrización puede no producirse satisfactoriamente sin tratamiento. Un ejemplo de este tipo de herida que requiere tratamiento para la cicatrización es la úlcera del pie diabético. En esta indicación, el paciente desarrolla heridas debido a la causa subyacente que es la diabetes. Debido a la causa subyacente con frecuencia no tratada y al hecho de que estas heridas se encuentran en los pies de los pacientes, estas úlceras no cicatrizan por sí mismas y causan grandes problemas al paciente, que habitualmente terminan en amputación del pie.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden comprender un glucano y un agente gelificante como se define anteriormente y uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables, preferentemente agua y opcionalmente uno o más estabilizantes o diluyentes o vehículos adicionales fisiológicamente aceptables. Las composiciones pueden formularse convenientemente en cualquier forma de dosificación tópica. Las formas de dosificación tópicas pueden ser cremas, lociones, soluciones, geles, pomadas, pastas, aerosoles, películas, etc. La composición en gel de la invención es adecuada para el almacenamiento en y la dispensación desde un tubo, por ejemplo, un tubo de plástico.

En algunas variaciones, las composiciones como se describen en el presente documento están en forma de una pomada. La base de la pomada puede ser una base oleaginosa, una base emulsionable, una base en emulsión, o una base soluble en agua. En otras variaciones, Las composiciones de acuerdo con la presente invención están en forma de crema. Las cremas pueden ser líquidos viscosos o emulsiones semisólidas, ya sea aceite en agua o agua en aceite. Las bases en crema pueden ser lavables con agua y contener una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. En aún más variaciones, las composiciones de la presente invención están en forma de una loción. Las lociones pueden formularse como suspensiones de sólidos y contener agentes de suspensión para producir mejores dispersiones. Las composiciones de acuerdo con la presente invención también pueden ser pastas formuladas. Las pastas son formas de dosificación semisólidas en las que el principio activo está suspendido en una base adecuada. Dependiendo de la naturaleza de la base, las pastas se dividen entre pastas grasas o aquellas preparadas a partir de geles acuosos monofásicos.

En algunas variaciones, las composiciones forman una película sobre la superficie de la herida. Para ayudar a la formación de películas, se usan agentes formadores de películas tales como, pero sin limitación, ácido acrílico y sus derivados, poliacrílico y sus derivados tal como el polibutilmetacrilato y el ácido polimetacrílico, polimetacrilato, palmitato de ascorbilo, carbómero, cera de carnauba, derivados de celulosa tales como ftalatos de acetato de celulosa,

crosscarmelosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa y compuestos relacionados, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hipromelosa, alcohol cetílico y derivados, cera microcristalina, poloxámero, polietilenglicol, poliuretano, acetato de polivinilo, ftalato de acetato de polivinilo, alcohol de polivinilo, goma de silicona y derivados, goma laca, derivados de triglicéridos y combinaciones de los mismos.

5 Las composiciones también pueden incluir al menos un agente plastificante de películas que puede servir para ablandar la película de polímero formada por el agente formador de películas de modo que sea lo suficientemente flexible para moverse con el área del cuerpo donde está aplicada sin agrietarse ni despegarse.

10 En algunas variaciones, las composiciones pueden fundirse en una película antes de la aplicación a la herida o aplicarse a la herida directamente donde se polimerizan in situ. Una película "extendida" se polimeriza cuando se aplica a la piel y puede suministrarse como una crema o pomada desde un tubo, roll-on, aerosol y similares. La película puede crearse incorporando una goma de silicona, en la fase externa. Al mezclar con la fase interna, la emulsión resultante se deja curar y proporciona una película "extendida", que polimeriza cuando se aplica a la herida. La emulsión se puede extender sobre un sustrato para lograr el espesor deseado.

En otros casos, las composiciones se pueden preformar en una capa o parche. El parche puede ser de grosor variable. El parche también se puede cortar para tener una forma que generalmente siga los bordes de la herida.

20 En algunas variaciones, los parches pueden incluir un material adhesivo farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el parche a la herida o la piel. También se puede incluir una capa de refuerzo del parche.

25 Las composiciones pueden colocarse directamente sobre una herida, o colocarse sobre un sustrato para su aplicación sobre una herida. Se puede usar cualquier sustrato (vehículo) con las composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden usar sustratos tejidos, no tejidos, de punto, de espuma y adhesivos. También se pueden usar sustratos absorbentes o no absorbentes. En algunas variaciones, las composiciones están rociadas o extendidas sobre el sustrato. En otras variaciones, las composiciones están impregnadas dentro del sustrato.

30 Los apósitos para heridas pueden aplicarse durante cualquier período de tiempo adecuado. Por ejemplo, pueden aplicarse durante un período de un día, durante varios días, durante varias semanas o durante varios meses o más. En general, los apósitos para heridas se volverán a aplicar hasta que cicatrice la herida. La duración del tratamiento de la herida con los apósitos descritos en el presente documento puede depender de factores tales como el tipo de herida a tratar, ubicación de la herida y forma de la composición a aplicar. Dependiendo de la forma utilizada, La composición puede eliminarse con agua, o limpiarse o despegarse de la herida.

35 Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para tratar heridas resultantes de cualquier etiología. Por ejemplo, las heridas pueden deberse a quemaduras, infecciones, isquemia, linfedema, neoplasias, neuropatía, daño por radiación, procedimientos quirúrgicos, insuficiencia venosa y trauma. Las composiciones de la presente invención son de particular utilidad para ayudar a la cicatrización de heridas o úlceras.

40 La invención proporciona además un soporte físico, por ejemplo, cualquier dispositivo o material médico para uso médico que se haya aplicado al mismo, incluyendo impregnado en el mismo, una composición de la invención como se define en el presente documento.

45 Una característica importante de los glucanos de estas composiciones es su capacidad de retención de agua y las características de formación de gel incluso en ausencia de condiciones como pH no neutro o cationes que podrían promover la cicatrización con gel. Algunos beta-glucanos formarían geles en concentraciones tan bajas como 1 %, pero más generalmente en el intervalo de 2-4 %. Un beta-glucano soluble de levadura como los glucanos preferidos descritos en el presente documento formará un gel tixotrópico y pseudoplástico cuando se disuelva en solución acuosa a una concentración de 1-6 % en un intervalo de pH de 3-7, independiente de la presencia de cationes.

50 Están abarcados por los términos 'herida' y 'úlceras' las heridas superficiales, heridas quirúrgicas, quemaduras, fracturas abiertas, úlceras en las piernas, úlceras aftosas, úlceras diabéticas y úlceras de decúbito. Las heridas pueden ser el resultado de una lesión, cirugía o enfermedad, pero todas se caracterizan por una pérdida de integridad dérmica, la piel puede estar desgarrada, cortada o perforada y se requiere un nuevo crecimiento de la piel para sellar la apertura. Se ha demostrado que las composiciones de la presente invención aceleran el cierre de la herida. Tal como se muestra en los Ejemplos, la eficacia puede demostrarse fácilmente midiendo el tamaño de una herida abierta.

60 Las composiciones se aplican preferentemente por vía tópica, por ejemplo, como un gel, parche transdérmico, loción, pomada, crema, etc. Las composiciones pueden aplicarse a diario, con mayor o menor frecuencia, por ejemplo, dos veces al día o en días alternos y durante un tiempo determinado por un médico o, en algunos casos, por el paciente u otro asesor de salud. La duración del tratamiento dependerá de la naturaleza y la gravedad de la herida o úlcera y el progreso generalmente se determina fácilmente mediante inspección visual.

65 La administración tópica incluye la administración en la boca y se conocen en la técnica, geles, pastillas para chupar, pastas, aerosoles, etc., adecuados, para suministro a la mucosa oral.

Las composiciones encuentran utilidad en medicina humana y veterinaria. Como se usa en el presente documento, el término "médico/a" incluye aplicaciones y contextos veterinarios. Los seres humanos son sujetos preferidos para el tratamiento, pero otros animales que pueden tratarse de manera útil incluyen el ganado y los animales de compañía.

Las composiciones de la invención pueden aplicarse o incorporarse en un soporte físico/sólido tal como un parche, apósito, esparadrapo, vendaje, película, gasa, etc., que se puede aplicar al sitio de la herida o úlcera y dichos productos constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

Se apreciará que se aplican las características preferidas aplicables a un aspecto o realización de la invención, *mutatis mutandis*, a todos los aspectos y realizaciones.

En general, la herida se irriga con solución salina normal o agua estéril y se completa el desbridamiento del tejido necrótico y calloso. Después se aplica a la herida una composición de acuerdo con la presente invención. La forma de la composición puede depender de factores tales como el área superficial de la herida a cubrir, el tipo de herida a tratar y la ubicación de la herida. Por ejemplo, una composición en forma de gel, crema o pomada puede ser útil para úlceras y quemaduras, mientras que la gasa impregnada con una solución de la composición de acuerdo con esta invención puede ser útil para heridas quirúrgicas o traumáticas.

La composición de la presente invención puede estar en forma de kits. Los kits descritos en el presente documento pueden incluir una o más de las composiciones de la invención e instrucciones de uso. Se pueden incluir opcionalmente uno o más sustratos. En algunas ocasiones, también se puede proporcionar un aplicador para extender las composiciones. Las composiciones incluidas en los kits pueden tener la misma forma tópica o diferentes formas tópicas. También se pueden emplear las mismas o diferentes cantidades de las composiciones. Los sustratos también pueden tener la misma o diferente forma. Los sustratos también pueden tener diferentes formas y grosores.

La invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos y figuras no limitantes en los que:

La Figura 1 ilustra los cromatogramas SEC-MALS-RI de varios lotes de glucanos de levadura preferidos, definidos como glucano $\beta(1,3)$ ramificado con $< 2\%$ de unidades de glucosilo enlazadas en $\beta(1,6)$ repetitivas, analizados en DMAc/con LiCl al $0,5\%$ suponiendo un $dn/dc = 0,12$. Como se puede observar, la distribución del peso molecular está en el intervalo de aproximadamente 10.000 g/mol hasta aproximadamente 200.000 g/mol en el nivel de cadena sencilla.

La Figura 2 muestra cromatogramas SEC-MALS-RI de varios lotes de glucanos de levadura preferidos, definidos como glucano $\beta(1,3)$ ramificado con $< 2\%$ de unidades de glucosilo enlazadas en $\beta(1,6)$ repetitivas, analizados en tampón acuoso ($\text{NaNO}_3\ 0,1\ \text{M}$) suponiendo un $dn/dc = 0,15$. Como se puede observar, la distribución del peso molecular está en el intervalo de aproximadamente 10.000 g/mol hasta aproximadamente $10.000.000\text{ g/mol}$ en el nivel de cadena sencilla. Los resultados de SEC-MALS-RI acuosa, en combinación con los resultados en DMAc/LiCl, muestran que los glucanos de levadura preferidos existen como agregados/estructuras supramoleculares en la solución acuosa.

La Figura 3: muestra el supuesto mecanismo de acción del beta glucano soluble usado en la presente invención. La figura muestra que las ramas de beta glucano (BG) se unen simultáneamente a receptores en, por ejemplo, macrófagos y, por lo tanto, activan el sistema inmunitario innato.

La Figura 4 muestra el cierre de la herida de heridas de grosor completo en un modelo de ratón db/db estimulado por la administración tópica de SG solo (2%), carboximetilcelulosa sola (CMC al 1%), la combinación de los dos (SG al 2% , CMC al 1%), frente a vehículo (agua) y control positivo (rh-PDGF-BB (1 mg) + rh-TGF- α (1 mg) en HPMC al $0,5\%$ y CMC al 1%).

La Figura 5 muestra el cambio en el % medio de área restante de la herida con el tiempo (6 sem) - Grupos: (1) Vehículo control, (4) Methocel, (5) Intrasite, (9) SG al 2% (CMC al 1%), (12) control positivo (HPMC), y (13) control positivo (CMC)

La Figura 6 muestra el cambio en el % medio del área de la herida original cerrada por contracción con el tiempo (6 sem) - Grupos: (1) Vehículo control, (2) CMC al 1% , (6) SG al 2% , (9) SG al 2% (CMC al 1%), (12) control positivo (HPMC), y (13) control positivo (CMC)

La Figura 7 muestra el cambio en el % medio del área de la herida original cerrada por contracción con el tiempo (6 sem) - Grupos: (1) Vehículo control, (4) Methocel, (5) Intrasite, (9) SG al 2% (CMC), (12) control positivo (HPMC), y (13) control positivo (CMC)

La Figura 8 muestra el cierre de la herida de heridas de espesor completo en un modelo de ratón db/db estimulado por la administración tópica de dos formulaciones diferentes de Biogel Woulgan de Biotec Pharmacon, el hidrogel solo, un producto de beta-glucano de avena, frente a vehículo (agua) y control positivo (rh-PDGF-BB (10 mg) + rh-

TGF- α (1 mg) en hidrogel

La Figura 9 muestra SG y SG mezclado con carboximetilcelulosa al 1,5 % almacenado en envases de aluminio. T = 0 representa la apariencia al inicio del estudio, y T = 6 indica muestras almacenadas 6 meses a temperaturas de deambulaci3n, cambiando cada semana entre 4 y 37 °C.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparaci3n del producto de glucano en gel (SG)

Se trat3 una soluci3n acuosa de mol3culas de glucano de levadura al 1,5-2 % como se describe a continuaci3n. Esta soluci3n acuosa se prepar3 a partir de una preparaci3n de glucanos en part3culas por formolisis para eliminar selectivamente las cadenas laterales β -1,6 y la posterior purificaci3n y diafiltraci3n para eliminar la materia en part3culas y los componentes de bajo peso molecular de la soluci3n de formolisis. Una etapa de formolisis adecuada se divulga en el Ejemplo 3 del documento EP 0759089 B1. El glucano en part3culas se prepar3 a partir de las paredes celulares de la levadura de panader3a (*S. cerevisiae*) mediante extracciones por separado con 3lcali, etanol y agua, siendo cada extracci3n seguida por un secado apropiado (secado por aerosol y secado al vac3o).

a. Tratamiento t3rmico:

El tratamiento t3rmico se lleva a cabo despu3s de que se haya ajustado la concentraci3n de la soluci3n de glucano, normalmente dando un volumen de producto de aproximadamente 220 litros a una temperatura de aproximadamente 60 °C, en un tanque cerrado y agitado de 800 litros que se calienta mediante la introducci3n de vapor a una funda que rodea el tanque.

El producto se calienta lentamente a aproximadamente 105 °C para garantizar un calentamiento uniforme de todo el lote, y despu3s m3s r3pidamente a 123 °C. El tiempo de calentamiento normal de 60 a 123 °C es de 40 a 50 minutos. El producto se mantiene a 123 - 125 °C durante 20 minutos.

b. Enfriamiento activo:

Despu3s se inicia el enfriamiento activo. Se opera manualmente, por apertura y cierre directo de v3lvulas manuales. Primero se evacua cuidadosamente el vapor de la funda para drenar y se dejan abiertas las v3lvulas de drenaje. Despu3s se introduce cuidadosamente agua de enfriamiento en la funda, lentamente al principio para evitar un estr3s t3rmico excesivo en el acero del tanque. A medida que baja la temperatura, aumenta el flujo de agua. El enfriamiento normalmente contin3a hasta que la temperatura del producto alcanza 35 - 40 °C. El tiempo de enfriamiento normal de 123 a 40 °C es de 50 a 60 minutos.

Ejemplo 2: Preparaci3n del producto de glucano en gel

Se trat3 una soluci3n acuosa de mol3culas de glucano de levadura al 1,5-2 % como se describe a continuaci3n. Esta soluci3n acuosa se prepar3 a partir de una preparaci3n de glucano en part3culas por formolisis para eliminar selectivamente las cadenas laterales β -1,6, como se describe en el Ejemplo 1.

a. Ruptura de los enlaces de hidr3geno mediante la adici3n de hidr3xido de sodio:

La adici3n de hidr3xido de sodio tuvo lugar despu3s de ajustar la concentraci3n de la soluci3n de glucano, dando un volumen de producto de aproximadamente 185 litros en un tanque cerrado y agitado de 800 litros que se calienta o enfr3a mediante la introducci3n de vapor o agua a una funda que rodea el tanque.

El producto se enfri3 a 18 °C y se vertieron lentamente (aproximadamente 1 litro por minuto) 24 moles (960 g) de NaOH, disuelto en aproximadamente 10 litros de agua purificada, a trav3s de una escotilla en el tanque.

b. Restauraci3n de los enlaces de hidr3geno mediante la adici3n de 3cido clorh3drico:

El proceso de restauraci3n se inici3 inmediatamente despu3s de que el 3ltimo NaOH se hubiera vertido en el tanque.

Un poco menos de 24 moles de HCl, aproximadamente 9 litros de soluci3n de HCl 2,4 M en agua purificada, se verti3 en el tanque relativamente r3pido (en aproximadamente 2 minutos), se midi3 el pH del producto y se a3adi3 m3s 3cido en peque3as porciones hasta que el pH alcanz3 aproximadamente 4. La cantidad total de HCl a3adida fue de 23,4 moles.

c. Eliminaci3n de sal

Para eliminar los iones (Na^+ y Cl^-) a3adidos durante las etapas a y b, El producto se diafiltr3 sobre un filtro tangencial contra 4 vol3menes de agua purificada.

Ejemplo 3: Composición de la cicatrización de heridas in vivo

Se investigó el impacto de un glucano en gel solo (SG, por sus siglas en inglés) preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, vehículo (carboximetilcelulosa o goma gellan) solo, o una combinación de SG y vehículo en la cicatrización de heridas mediante el análisis de la reparación de heridas cutáneas por escisión de espesor completo en el modelo de ratón diabético (db/db) (es decir, ratones BKS.Cg-m Dock7^m +/- Lepr^{db}/J). El producto de combinación de la invención también se preparó de acuerdo con el método de calentamiento y enfriamiento rápido descrito en el presente documento y ejemplificado en el Ejemplo 1, en resumen, el glucano y el vehículo se disolvieron en solución acuosa y después se calentaron en un autoclave a aproximadamente 120 °C durante aproximadamente 18 minutos. Después, el producto se enfrió rápidamente para permitir la formación de gel como se describe en el Ejemplo 1.

Tras la aclimatación (5-7 días sin perturbaciones) los animales se alojaron en grupos de 5 animales de acuerdo con las reglamentaciones de la Home Office y los requisitos específicos de los animales diabéticos. Después de una herida experimental, los animales se alojaron en jaulas individuales (dimensiones de la jaula de 35 x 15 x 15 cm con camas de serrín, cambiado dos veces por semana), en un ambiente mantenido a una temperatura ambiente de 23 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Los ratones recibieron alimentos (dieta convencional para roedores) y agua *ad libitum*. Después de todos los eventos anestésicos, los animales se colocaron en un ambiente cálido y se monitorizaron hasta que se recuperaron completamente del procedimiento. Todos los animales recibieron analgesia apropiada (buprenorfina) después de la cirugía y analgésicos adicionales, según se necesitara. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo en un establecimiento con licencia de Home Office bajo Licencias de Home Office (PCD: 50/2505; PPL: 40/3300; PIL: 50/3482; PIL: 70/4934). La salud de los animales se monitorizó diariamente durante todo el estudio.

El día 0, los animales se anestesiaron (isoflurano y aire) y el dorso se afeitó y limpió con una gasa empapada en solución salina. Se creó una única herida normalizada de espesor completo (10,0 mm x 10,0 mm) en la piel del flanco dorsal izquierdo de cada animal experimental. Posteriormente, las heridas en todos los grupos de tratamiento se vendaron con una banda en circunferencia del apósito de película transparente Bioclusive™ (Systagenix Wound Management, Reino Unido); después de lo cual recibieron bien SG, vehículo, o una combinación de SG y vehículo por inyección de 50 ml de material disuelto en agua purificada a través de la película Bioclusive usando una aguja de calibre 29. Los animales diabéticos se asignaron al azar a uno de los regímenes de tratamiento utilizando el programa informático apropiado.

Los tratamientos se volvieron a aplicar en los días 2, 4 y 6 posteriores a la herida. Los sitios de la herida en estos animales se monitorizaron de cerca para determinar la acumulación excesiva de agentes aplicados y la hidratación excesiva del sitio de la herida; si la acumulación/hidratación excesiva del agente aplicado era aparente, el material aplicado previamente se eliminó por aspiración antes de volverse a aplicar.

En los días 4, 8, 12, 16, 20 y 24 posteriores a la herida, todos los animales se volvieron a anestesiar, se quitaron sus vendajes de película y cualquier residuo libre, y se limpiaron sus heridas con una gasa estéril empapada con solución salina. Después de la fotografía los días 4, 8, 12, 16, 20 y 24, las heridas se volvieron a vendar como se indica anteriormente con apósito de película Bioclusive. Se evaluó la cicatrización de la herida (no cuantitativamente) de acuerdo con la presencia de fibrina, tejido de granulación, angiogénesis y reepitelización. Basándose en la apariencia de los factores mencionados anteriormente, la formación de tejido dérmico nuevo (cicatrización) se clasificó como: Muy buena, buena, ligera, no.

Los datos de cierre de la herida se determinaron adicionalmente a partir de imágenes de herida a escala tomadas de cada herida en cada punto de evaluación. El área de una herida dada, en un momento dado, se expresó como un porcentaje del área de esa herida inmediatamente después de la lesión (es decir, el día 0). Se calculó el porcentaje medio del área restante de la herida (y el error estándar de la media) para cada grupo y se mostró gráficamente. El impacto de cada preparación de glucano se comparó con el de las heridas que recibieron: i). vehículo; y ii) PDGF-BB + TGF- α (control positivo).

Tabla 1: Fracción de cicatrización de heridas, día 8.

Tratamiento	Cicatrización (formación de tejido dérmico nuevo)			
	Muy buena	Buena	Ligera	No
Carboximetilcelulosa al 1 %	0/10	3/10	2/10	5/10
SG al 2 %	0/10	5/10	4/10	1/10
SG al 4 %	2/10	4/10	3/10	1/10
Carboximetilcelulosa al 1 % + SG al 1 %	0/10	5/10	4/10	1/10
Carboximetilcelulosa al 1 % + SG al 2 %	3/10	5/10	2/10	0/5
Carboximetilcelulosa al 1 % + SG al 4 %	1/10	9/10	0/5	0/5
Phytigel al 0,3 %	0/10	5/10	3/10	2/10
Phytigel al 0,3 % + SG al 2 %	0/10	8/10	2/10	0/10

Los resultados en la Tabla 1 muestran que la frecuencia de cicatrización de heridas que recibían el glucano solo fue mayor en relación con las heridas que recibían el vehículo solo. Esto sugiere que el glucano solo es un mejor inductor de la formación de tejido dérmico nuevo en comparación con el agente gelificante (el vehículo). Además, hay un claro cambio dependiente de la concentración de una solución de glucanos al 2 % a una al 4 % que muestra un aumento en la cicatrización de la herida (de buena a muy buena). Sin embargo, la combinación del glucano y ambos vehículos fue superior al uso único de cada agente (cambio significativo de ligera a buena y muy buena), sugiriendo un efecto sinérgico de los productos combinados.

Ejemplo 4: El impacto de las preparaciones de glucano de acuerdo con la invención en la cicatrización de heridas

Se realizó un estudio para evaluar las preparaciones basadas en glucano de acuerdo con la invención con respecto a su capacidad para promover la reparación de tejidos en un modelo *in vivo* de cicatrización tardía de heridas. Los pacientes con diabetes son propensos a la cicatrización deficiente de heridas, siendo la ulceración del pie particularmente frecuente. Este retraso en la cicatrización de heridas también se extiende a los animales diabéticos, incluyendo el ratón espontáneamente diabético (db/db) (es decir, ratones BKS.Cg-m Dock7^m +/- Lepr^{db}/J).

En este estudio, la cicatrización de heridas en ratones diabéticos que recibían glucano SG 131-9 de Biotec (a varias concentraciones, con o sin diferentes vehículos) se comparó con la de heridas similares expuestas a los vehículos: (i) agua purificada [agua para inyección], (ii) carboximetilcelulosa al 1,0 % y (iii) Phytigel al 0,3 %. La cicatrización de heridas diabéticas que recibían glucano SG 131-9 de Biotech también se comparó con los comparadores: (i) Methocel - un material de polisacárido de comparación y (ii) Intrasite Gel - una preparación de hidrogel líder en el mercado para el tratamiento de heridas. El factor de crecimiento recombinante derivado de plaquetas humanas BB (rh-PDGF-BB) en combinación con el factor de crecimiento transformante humano recombinante alfa (rh-TGF- α) se utilizaron como "control positivo" en este estudio. Este control positivo se aplicó con dos vehículos: hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) al 0,5 % y carboximetilcelulosa (CMC) al 1,0 %.

Materiales y métodos

Materiales en prueba

1. Agua para inyección
2. Carboximetilcelulosa (CMC, Sigma C5013, sal de sodio) al 1,0 % en agua purificada
3. Phytigel al 0,3 % + CaCl₂ 4 mM
4. Methocel al 2,0 %
5. Intrasite
6. SG al 2,0 %
7. SG al 4,0 %
8. CMC al 1,0 % + SG al 1,0 %
9. CMC al 1,0 % + SG al 2,0 %
10. CMC al 1,0 % + SG al 4,0 %
11. Phytigel al 0,3 % + SG al 2,0 %
12. rh-PDGF-BB [10 %] + rh-TGF- α [1 %] - en HPMC al 0,5 %
13. rh-PDGF-BB [10%] + rh-TGF- α [1%] - en CMC al 1,0 %

Los materiales anteriores se prepararon de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 3. Phytigel siempre se usa con CaCl₂

Modelo en ratones diabéticos BKS.Cg-m Dock7^m +/- Lepr^{db}/J

Los ratones se trajeron al Reino Unido con una edad de aproximadamente 5-6 semanas y se mantuvieron internamente hasta las 12 semanas (+1 semana) - de acuerdo con las regulaciones de la Home Office y los requisitos específicos de los animales diabéticos.

Brevemente, en el día 0 los ratones se anestesiaron usando isofluorano y aire; y se cortó y se limpió su piel del flanco dorsal de acuerdo con el protocolo. Se creó una única herida normalizada de espesor completo (10 mm x 10 mm) en la piel del flanco dorsal izquierdo de cada animal experimental. Los animales diabéticos se asignaron aleatoriamente a uno de los 13 grupos experimentales (como se describe en la tabla a continuación). Las heridas en todos los grupos se vendaron con una banda en circunferencia del apósito de película semioclusiva Bioclusive™ (Systagenix Wound Management, Reino Unido) y los tratamientos (en volúmenes de 50 ml [grupos 1-11] y 100 ml [grupos 12 y 13]) se aplicaron por inyección hipodérmica a través de la película Bioclusive. La condición de los materiales de los apósitos se examinó diariamente durante todo el estudio y se reemplazó según fuera necesario.

Se restringieron los animales en los grupos 1 a 11 y los tratamientos se volvieron a aplicar mediante inyección hipodérmica a través de la película Bioclusive en los días 2, 4 y 6 posteriores a la herida. Cualquier acumulación de hidratación/agente aplicado previamente se eliminó por aspiración antes de la nueva aplicación. Para los grupos

experimentales 12 y 13 (controles positivos) los tratamientos se volvieron a aplicar diariamente hasta el día 6 posterior a la herida.

5 En el día 4 todos los animales fueron anestesiados nuevamente, se fotografiaron las heridas y se permitió que los animales se recuperaran en un ambiente cálido (34 °C). Como los límites de las heridas eran claramente visibles a través del apósito Bioclusive™ y para minimizar el daño alrededor de la herida mediante la eliminación repetida del apósito, se decidió que los apósitos de película se conservarían en este punto de evaluación.

10 En los días 8 y 12, 16 y 20 todos los animales se anestesiaron nuevamente, se quitaron sus vendajes de película y cualquier residuo libre y se limpiaron sus heridas con una gasa estéril empapada con solución salina estéril. Las heridas se fotografiaron, se volvieron a vendar (como anteriormente) con apósito de película Bioclusive™ y se permitió que los animales se recuperaran en un ambiente cálido (34 °C).

15 Inmediatamente después de la herida y posteriormente los días 4, 8, 12, 16, 20 y 24, todas las heridas se fotografiaron digitalmente junto con una placa de calibración/identidad (después de la eliminación del apósito y la limpieza de la herida, cuando corresponda).

Grupos experimentales:

Grupo Tx	Tratamiento	Nombre del grupo	Códigos de animales y cosecha	"n"
1	Agua para inyección	EXP-01	BIOT-02.01 a 02.10	10
2	Carboximetilcelulosa (CMC) al 1,0 % en agua purificada (50 ml)	EXP-02	BIOT-02.11 a 02.20	10
3	Phytigel 0,3 % + CaCl ₂ 4 mM (50 ml)	EXP-03	BIOT-02.21 a 02.30	10
4	Methocel al 2,0 (50 ml)	EXP-04	BIOT-02.31 a 02.40	10
5	Intrasite (50 ml)	EXP-05	BIOT-02.41 a 02.50	10
6	SG al 2,0 % (50 ml)	EXP-06	BIOT-02.51 a 02.60	10
7	SG al 4,0 % (50 ml)	EXP-07	BIOT-02.61 a 02.70	10
8	CMC al 1,0 % + SG al 1,0 % (50 ml)	EXP-08	BIOT-02.71 a 02.80	10
9	CMC al 1,0 % + SG al 2,0 % (50 ml)	EXP-09	BIOT-02.81 a 02.90	10
10	CMC al 1,0 % + SG al 4,0 % (50 ml)	EXP-10	BIOT-02.91 a 02.100	10
11	Phytigel al 0,3 % + SG al 2,0 % (50 ml)	EXP-11	BIOT-02.101 a 02.110	10
12	rh-PDGF-BB [10 mg] + rh-TGF- α [1ug] - (100 ul) en HPMC al 0,5%	EXP-12	BIOT-02.111 a 02.117	7
13	rh-PDGF-BB [10 mg] + rh-TGF- α [1ug] - (100 ul) en CMC al 1,0 %	EXP-13	BIOT-02.118 a 02.124	7

20 *Análisis por imagen del cierre de la herida:*

25 Se utilizó el programa informático de análisis por imagen Image Pro Plus (versión 4.1.0.0, Media Cybernetics, EE. UU.) para calcular el cierre de la herida a partir de imágenes de las heridas a escala tomadas en cada punto de evaluación. Como el proceso de cierre de la herida implica los efectos de la contracción de la herida (el movimiento interno del tejido marginal), esto también se determinó

Se realizaron las siguientes evaluaciones:

30 1. Porcentaje de área restante de la herida con el tiempo es decir, el área abierta de la herida que queda en un momento dado, en relación con el área de la misma herida inmediatamente después de la lesión en el día 0.

35 2. Porcentaje de contracción de la herida con el tiempo es decir, la diferencia entre el área de la herida contraída en un momento dado y el área de la herida original [como un porcentaje del área de la herida original.

Evaluación del inicio de la cicatrización de las heridas (generación de tejido dérmico nuevo):

Todas las heridas en el estudio se evaluaron visualmente diariamente hasta el día 8, y posteriormente en los días 10, 12, 14, 16, 20 y 24 para establecer su estado de "cicatrización". Se calificó cada herida en cuanto a si mostraba "actividad de generación de tejido dérmico nuevo" o no (es decir, si la herida había iniciado el proceso de cicatrización o no). Cada herida se evaluó por dos observadores independientes y el porcentaje promedio de heridas que muestran "actividad de generación de tejido dérmico nuevo" se comparó entre los grupos de tratamiento en cada punto de evaluación.

Se consideró que la formación de tejido dérmico nuevo se iniciaba cuando los vasos sanguíneos dentro de la fascia de la base de la herida se ocultaban por el "material" suprayacente. Esta ocultación puede ser el resultado de la formación de exudado turbio, fibrina polimerizada/semipolimerizada o tejido de granulación. Invariablemente, el primer signo de iniciación del tejido dérmico nuevo es la formación de un exudado rojizo dentro del vacío de la herida.

Resultados

Cierre de la herida:

Para una herida dada en un momento dado, el cierre de la herida se expresó como el porcentaje de área restante de la herida en relación con el área de la herida inicial inmediatamente después de la lesión (es decir, el día 0). Los datos de porcentaje medio del área restante de la herida para todos los grupos de tratamiento se describen en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2: Porcentaje de datos del "Área Restante de la Herida" para todos los grupos de estudio.

		% de área restante de la herida con el tiempo - área abierta de la herida (media +/- error estándar)					
Días posteriores a la herida		4	8	12	16	20	24
Tratamiento	(1) Vehículo - agua purificada	96,7 ± 2,8	70,1 ± 2,9	60,6 ± 4,7	41,0 ± 6,3	30,8 ± 5,8	22,9 ± 5,6
	(2) Vehículo - CMC al 1 %	97,5 ± 1,9	66,9 ± 4,2	42,3 ± 4,5	21,9 ± 4,3	12,9 ± 3,4	6,1 ± 1,7
	(3) Vehículo - Phytigel al 0,3 % + CaCl ₂ 4 mM	95,2 ± 3,4	70,4 ± 4,4	49,2 ± 5,1	34,0 ± 6,2	21,6 ± 5,9	12,9 ± 5,3
	(4) Methocel al 2,0 %	99,0 ± 2,2	58,3 ± 5,5	44,4 ± 6,2	28,2 ± 7,3	16,4 ± 5,8	9,3 ± 4,1
	(5) Intrasite	95,2 ± 2,2	74,4 ± 4,4	49,1 ± 5,0	28,0 ± 4,6	15,0 ± 3,9	7,8 ± 2,8
	(6) SG al 2,0 %	93,2 ± 2,8	63,7 ± 3,8	37,5 ± 5,0	19,9 ± 3,4	13,1 ± 4,6	8,7 ± 4,3
	(7) SG al 4,0 %	100,2 ± 4,4	64,5 ± 4,7	39,6 ± 5,7	25,6 ± 5,0	20,3 ± 4,7	15,7 ± 5,2
	(8) SG 131-9 al 1,0 % (en CMC al 1 %)	97,8 ± 2,7	68,8 ± 2,8	37,4 ± 5,0	19,2 ± 4,0	14,9 ± 4,0	10,2 ± 3,9
	(9) SG 131-9 al 2,0 % (en CMC al 1 %)	98,1 ± 3,0	60,2 ± 6,5	31,3 ± 6,2	15,0 ± 3,6	7,7 ± 2,3	3,9 ± 1,6
	(10) SG 131-9 al 4,0 % (en CMC al 1 %)	97,2 ± 2,8	66,6 ± 4,5	53,5 ± 5,5	30,4 ± 3,9	18,9 ± 3,7	11,2 ± 2,5
	(11) SG 131-9 al 2,0 % (en Phytigel al 0,3 %)	97,0 ± 2,0	67,3 ± 3,0	38,7 ± 3,7	24,5 ± 3,3	11,2 ± 1,9	7,0 ± 1,7
	(12) Control positivo (en HPMC al 0,5 %)	93,7 ± 3,2	58,0 ± 6,2	17,9 ± 3,9	4,8 ± 2,2	0,04 ± 0,04	0,0 ± 0,0
	(13) Control positivo (en CMC al 1,0 %)	91,2 ± 2,4	57,3 ± 1,9	22,2 ± 3,3	6,2 ± 2,3	1,8 ± 1,2	0,9 ± 0,9

Como se muestra en la Tabla 2 y en las Figuras 4 y 5, los perfiles de cierre de la herida de los datos del "% de área restante de la herida con el tiempo", se encontró que difieren notablemente entre los diferentes grupos de tratamiento. Las heridas que recibían agua sola demostraron el cierre más lento de la herida y las heridas que recibían los controles positivos mostraron el cierre más rápido, encontrándose en medio todos los otros grupos de tratamiento. Se encontró que las heridas que recibían SG al 2% (en CMC) se cerraron más rápidamente que cualquier otro grupo de tratamiento

experimental (excluyendo los controles positivos).

Ambos comparadores (Methocel e Intrasite) tendieron a acelerar el cierre de la herida en comparación con el tratamiento con agua. Los niveles finales de cierre de la herida alcanzados el día 24 fueron ~ 91 % para Methocel y - 92 % para Intrasite.

La aplicación de SG 131-9 (1, 2 o 4 %) en CMC tendió a acelerar el cierre de la herida en comparación con el tratamiento con agua. El tratamiento con SG 131-9 al 1 % (en CMC) dio como resultado un cierre significativamente elevado en los días 12 a 20 posteriores a la herida. El tratamiento con SG 131-9 al 2 % (en CMC) pareció conducir a efectos más sustanciales y sostenidos y se descubrió que daba como resultado una aceleración significativa en el cierre desde el día 12 en adelante. El tratamiento con SG 131-9 al 4 % (en CMC) aunque más eficaz que el agua, parecía menos eficaz que los tratamientos tanto al 1 % como al 2 %. Los niveles finales de cierre de la herida alcanzados en el día 24 fueron: 90% para SG 131-9 al 1 % (en CMC), 96% para SG 131-9 al 2 % (en CMC) y 89% para SG 131-9 al 4 % (en CMC).

El SG 131-9 al 2 % aplicado en CMC al 1 % tendió a elevar el cierre de la herida en mayor grado que el SG 131-9 al 2 % aplicado en agua. Cuando se comparan los tres regímenes de tratamiento de SG 131-9 al 2 %, se puede ver que los tres promovieron el cierre a un nivel mayor que sus correspondientes vehículos control (es decir, agua, CMC al 1 % y Phytigel al 0,3 %). En términos absolutos, El SG al 2 % en CMC tendió a dar como resultado el nivel más alto de cierre. El perfil de cierre del SG al 2 % en el grupo de tratamiento con agua fue similar al del SG al 2 % en el grupo de tratamiento con Phytigel, ambos mostraron niveles más bajos de cierre que las heridas tratadas con el SG 131-9 al 2 % en la formulación con CMC.

De todas las preparaciones de SG 131-9 evaluadas, SG 131-9 al 2 % en CMC al 1 % parece ser la más eficaz. Se encontró que el SG 131-9 al 2 % (en CMC) promueve el cierre de la herida en un mayor grado que Intrasite, un material de polisacárido comparador y Methocel, una preparación de hidrogel para el tratamiento de heridas líder en el mercado.

Contracción de la herida

La contracción es el movimiento centrípeto de los márgenes de la herida, debido a la compactación del tejido de granulación dentro del "cuerpo" de la herida. Las fuerzas "compactadoras", que impulsan este proceso, se cree que residen en células del linaje de fibroblastos. En este estudio, El% de contracción se calculó como:

$$\% \text{ de contracción} = \frac{\text{El área definida por el límite de lo normal}}{\text{El área original de la herida (día 0)}} \times 100$$

Los resultados de la contracción de las heridas se muestran en la Tabla 3 a continuación y en las Figuras 6 y 7.

Tabla 3:

	Días posteriores a la herida	% del área original de la herida cerrada por contracción (media +/- error estándar)					
		4	8	12	16	20	24
Tratamiento	(1) Vehículo - agua purificada	3,3 ± 2,8	16,9 ± 2,9	25,5 ± 4,2	40,2 ± 4,2	52,6 ± 4,9	60,2 ± 5,5
	(2) Vehículo - CMC al 1 %	2,5 ± 1,9	24,4 ± 2,9	44,7 ± 4,3	60,4 ± 3,9	69,3 ± 3,9	76,9 ± 3,1
	(3) Vehículo - Phytigel al 0,3 % + CaCl ₂ 4 mM	4,8 ± 3,4	19,1 ± 4,3	38,4 ± 5,3	53,5 ± 6,5	64,6 ± 6,6	72,5 ± 6,5
	(4) Methocel al 2,0 %	1,0 ± 2,2	26,9 ± 5,4	42,1 ± 6,3	56,0 ± 6,7	68,4 ± 5,6	77,2 ± 4,3
	(5) Intrasite	4,8 ± 2,2	16,1 ± 4,6	41,3 ± 4,2	60,0 ± 4,0	72,9 ± 3,3	80,0 ± 2,9
	(6) SG al 2,0 %	6,8 ± 2,8	25,4 ± 3,6	48,0 ± 5,9	67,0 ± 4,3	74,0 ± 4,3	80,9 ± 4,4
	(7) SG al 4,0 %	-0,2 ± 4,4	23,6 ± 4,0	49,7 ± 4,8	62,9 ± 4,5	72,8 ± 4,3	76,3 ± 5,2
	(8) SG 131-9 al 1,0 % (en CMC al 1 %)	2,2 ± 2,7	21,9 ± 3,0	45,7 ± 3,4	62,8 ± 4,1	71,4 ± 4,2	76,5 ± 4,0
	(9) SG 131-9 al 2,0 % (en CMC al 1 %)	1,9 ± 3,0	31,0 ± 6,5	56,7 ± 5,5	71,7 ± 3,2	80,1 ± 3,3	88,8 ± 1,4
	(10) SG 131-9 al 4,0 % (en CMC al 1 %)	2,8 ± 2,8	23,4 ± 3,4	41,8 ± 5,1	62,0 ± 3,7	73,7 ± 3,3	79,9 ± 2,9
	(11) SG 131-9 al 2,0 % (en Phytigel al 0,3 %)	3,0 ± 2,0	21,9 ± 3,9	50,1 ± 4,0	66,1 ± 2,9	79,8 ± 2,4	85,4 ± 2,2
	(12) Control positivo (en HPMC al 0,5 %)	6,3 ± 3,2	27,3 ± 5,2	60,0 ± 2,4	69,2 ± 1,8	76,2 ± 2,8	80,3 ± 3,4
	(13) Control positivo (en CMC al 1,0 %)	8,8 ± 2,4	29,2 ± 2,3	59,1 ± 3,1	70,2 ± 2,6	79,2 ± 2,0	83,7 ± 1,6

Fue evidente una contracción notablemente menor en el grupo de tratamiento con agua solo en comparación con todos los demás grupos de tratamiento. Los niveles más altos de contracción se observaron con ambos regímenes de

control positivo, SG al 2 % (en CMC) y en los puntos de tiempo posteriores (días 20 y 24) con SG al 2 % (en Phytigel).

5 Ambos comparadores, Methocel e Intrasite, promovieron la contracción de las heridas en relación con el tratamiento con agua. Las heridas tratadas con Methocel se contrajeron significativamente más que las tratadas con agua los días 8, 20 y 24, mientras que las heridas tratadas con Intrasite mostraron una contracción significativamente mayor a partir del día 12 en adelante. Ambos grupos de tratamiento con comparadores tendieron a mostrar menos contracción de las heridas que las heridas tratadas con control positivo.

10 El tratamiento con SG 131-9 (1 %, 2 % o 4 %) formulado en CMC al 1% promovieron la contracción de las heridas en relación con el tratamiento con agua. El tratamiento con cada una de las concentraciones dio como resultado una contracción significativamente mayor que el tratamiento con agua desde el día 12 en adelante. Se encontró que el SG 131-9 al 2 % (en CMC) promueve la contracción de las heridas en comparación con CMC solo, con contracción significativamente elevada observada en los días 16 y 24. Se descubrió que SG al 2 % (en CMC) era más eficaz para promover la contracción que SG 131-9 tanto al 1 % como al 4 % (en CMC). El tratamiento con SG al 2% (en CMC) dio como resultado niveles de contracción similares a los de las heridas tratadas con controles positivos hasta el día 20 inclusive, sin diferencias significativas medidas entre ellas; mientras que, tal y como se describe anteriormente, CMC solo dio como resultado menos contracción que los tratamientos con controles positivos. Curiosamente, en el punto de evaluación final (día 24), se encontró que las heridas tratadas con SG 131-9 al 2 % (en CMC) se habían contraído en mayor grado que las tratadas con ambos tratamientos con controles positivos.

20 El SG 131-9 al 2 % aplicado en CMC al 1 % tendió a elevar la contracción de las heridas en un mayor grado que el SG 131-9 al 2 % aplicado en agua. En términos absolutos, el SG al 2 % en CMC tendió a dar como resultado el nivel más alto de contracción. También se encontró que SG 131-9 al 2 % (en Phytigel) promueve la contracción de las heridas en comparación con el tratamiento con agua y en comparación con Phytigel solo.

25 De todas las preparaciones de SG 131-9 evaluadas, SG 131-9 al 2 % en CMC al 1 % parece ser la más eficaz en términos de contracción de las heridas. Se encontró que el SG 131-9 al 2 % (en CMC) promueve la contracción de heridas en un mayor grado que Methocel.

30 *Iniciación de la cicatrización de heridas (generación de tejido dérmico nuevo)*

35 Todas las heridas en el estudio se evaluaron visualmente a diario hasta el día 8 y posteriormente en los días 10, 12, 14, 16, 20 y 24 para establecer su estado de "cicatrización". Se calificó cada herida en cuanto a si mostraba "actividad de generación de tejido dérmico nuevo" o no (es decir, si la herida había iniciado el proceso de cicatrización o no). Cada herida se evaluó por dos observadores independientes y el porcentaje promedio de heridas que muestran "actividad de generación de tejido dérmico nuevo" se comparó entre los grupos de tratamiento en cada punto de evaluación.

40 Se encontró que las heridas en los diferentes grupos de tratamiento demostraron los primeros signos de cicatrización en diferentes momentos después de la herida. De acuerdo con estos datos, el orden en el que se encontró que respondían los diferentes grupos fue, del más rápido al más lento:

Basándose en el número medio de días para responder	
Orden	Tratamiento
1	control positivo (CMC), control positivo (HPMC)
3	SG 131-9 al 2 % (CMC al 1 %) SG 131-9 al 4 % (CMC al 1 %) SG131-9 al 2 % SG131-9 al 4 % Intrasite
8	Methocel
9	SG131-9 al 2 % (Phyta)
10	SG131-9 al 1 % (CMC al 1 %)
11	Phytigel
12	CMC al 1 %
13	Agua

45 Se encontró que siete de las diez heridas (70 %) aleatorizadas para el tratamiento con agua iniciaron la formación de tejido dérmico nuevo al concluir el estudio el día 24. Se encontró que todas las heridas en todos los demás grupos

habían iniciado la formación de tejido dérmico nuevo en este momento.

5 Al considerar SG formulado en CMC al 1 %, las heridas que recibieron SG al 2 % y 4 % tendieron a responder primero, seguido de heridas que recibieron SG al 1 %. En comparación con el tratamiento con agua, un número significativamente mayor de heridas tratadas con SG 131-9 al 1% había respondido en los días 6 a 14, un número significativamente mayor que recibieron SG 131-9 al 2 % había respondido en los días 3 a 14, y un número significativamente mayor tratado con SG 131-9 al 4 % había respondido en los días 4 a 14. No se observaron diferencias significativas entre estos tres grupos de tratamiento y los dos grupos de tratamiento con control positivo después del día 4. En términos del número promedio de días para responder, las tres concentraciones respondieron significativamente antes que las heridas tratadas con agua.

15 Se encontró que las heridas que recibieron SG al 2 % formuladas en Phytigel respondieron antes que las heridas que recibieron Phytigel solo. En comparación con los grupos de control, respondieron significativamente más heridas que recibieron SG al 2 % (en Phytigel) en los días 4 a 14 que las heridas que recibieron agua. En términos del número promedio de días para responder, SG al 2 % (Phytigel) respondió significativamente antes que agua o Phytigel solo.

Ejemplo 5: Estabilidad de gel de glucano

20 Se preparó Woulgan® de la siguiente manera:

- SBG (beta glucano de levadura soluble de Biotec en agua purificada) al 2,7 %
- Mientras se agitaba, se añadió Blanose TM (7H4XF PH, Kirsch Pharma GmbH, carboximetilcelulosa de grado farmacéutico) a una concentración final del 1,5 % (p/v).
- Se agitó hasta que CMC se disolvió
- 25 • Se añadió Glicerol (99,7 %) hasta una concentración final del 20 %.
- Se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 18 min
- Se enfrió rápidamente y el gel se dejó solidificar como se describe en el Ejemplo 1.

30 y se almacenó en tubos de aluminio en condiciones que aceleran la degradación (agitación con temperaturas alternas de 4 °C y 37 °C) hasta seis meses. El SG solo, es decir, sin la carboximetilcelulosa, se preparó de acuerdo con el Ejemplo 1 y se almacenó en condiciones idénticas. El material de partida de SBG es el mismo material de partida utilizado en el Ejemplo 1.

35 Como se muestra en la Figura 9, la degradación del gel de SG se ve potenciada por estas condiciones de almacenamiento. Los signos de degradación, es decir, sinéresis, se puede visualizar desde 1 mes en estas condiciones. Después de 6 meses, el gel de SG muestra signos claros de sinéresis y se describe como un gel muy suave, ligero, heterogéneo grumoso, agrietado, granular, mientras que el gel que consiste en SG con carboximetilcelulosa añadida no se altera en comparación con su apariencia al comienzo del estudio y se conserva un gel homogéneo y pegajoso durante todo el estudio, al menos hasta 6 meses. Se ha demostrado que los productos de combinación tienen una estabilidad potenciada en comparación con SG solo.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de glucano para la cicatrización de heridas caracterizada por estar en forma de gel a 25 °C y a un pH entre 4 y 8 y que comprende un beta-glucano derivado de levadura a una concentración del 0,1 al 6 % en peso de la composición en una solución acuosa y del 0,2 al 3 % en peso de la composición de carboximetilcelulosa.
- 10 2. La composición de glucano tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el glucano proviene de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 15 3. La composición de glucano tal como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde el beta-glucano comprende una cadena principal de restos glucosilo enlazados en β -(1,3) y cadenas laterales que comprenden 2 o más restos glucosilo enlazados en β -(1,3), estando fijadas las cadenas laterales a la cadena principal a través de un enlace β -(1,6).
- 20 4. La composición de glucano tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el glucano está esencialmente libre de restos repetitivos de glucosilo enlazados en β -(1,6).
- 25 5. La composición de glucano tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende del 0,2 al 4 % en peso de la composición de dicho glucano y del 0,25 al 2 % en peso de la composición de carboximetilcelulosa.
- 30 6. La composición de glucano tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende aproximadamente el 2 % en peso de la composición de dicho glucano y aproximadamente el 1,5 % en peso de la composición de carboximetilcelulosa.
- 35 7. La composición de glucano tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha composición comprende además un humectante o emoliente, en donde dicho humectante o emoliente es glicerol.
- 40 8. La composición de glucano tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en terapia.
9. La composición de glucano tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso para ayudar en la cicatrización de heridas o úlceras, preferentemente en donde dicha úlcera es una úlcera diabética, o para su uso en el tratamiento de mucositis oral o cáncer.
10. La composición de glucano para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en donde la composición se aplica tópicamente a un sujeto.
11. Un soporte físico adecuado para la aplicación en el sitio de una herida o úlcera y que se ha aplicado al mismo o se ha incorporado al mismo la composición de glucano tal como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
12. El soporte físico de la reivindicación 11, en donde dicho soporte se selecciona del grupo que consiste en un sustrato tejido, no tejido, de punto, de espuma o adhesivo; un parche, apósito, esparadrapo, vendaje, película o gasa.

Figura 1:

masa molar frente al tiempo

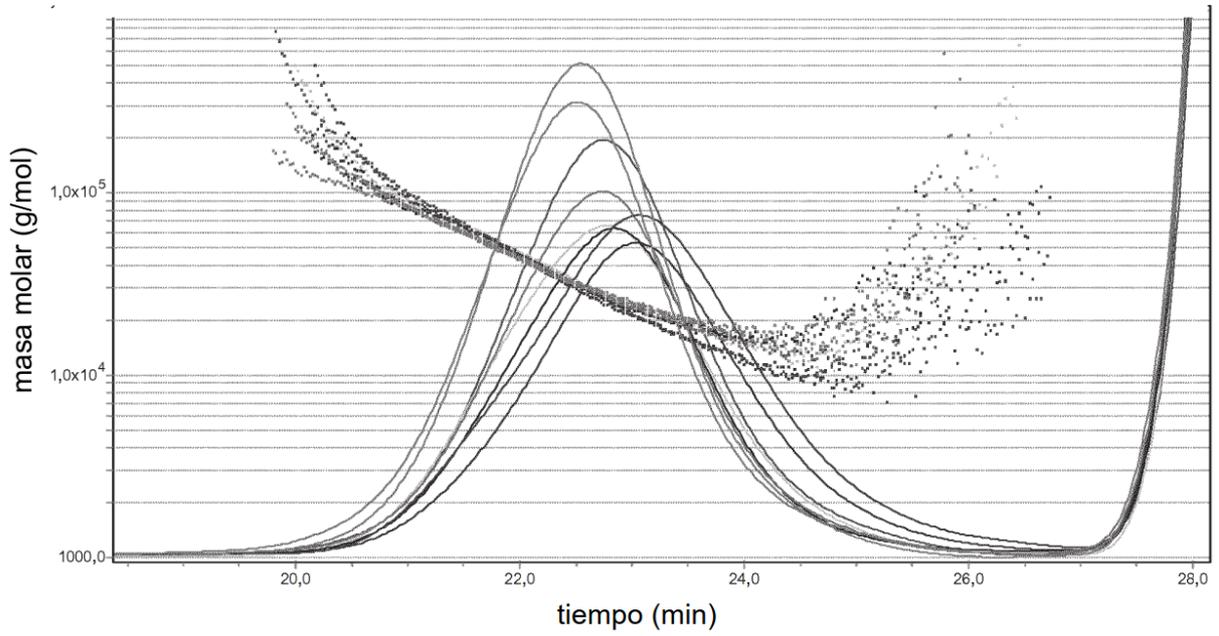


Figura 2:

masa molar frente al tiempo

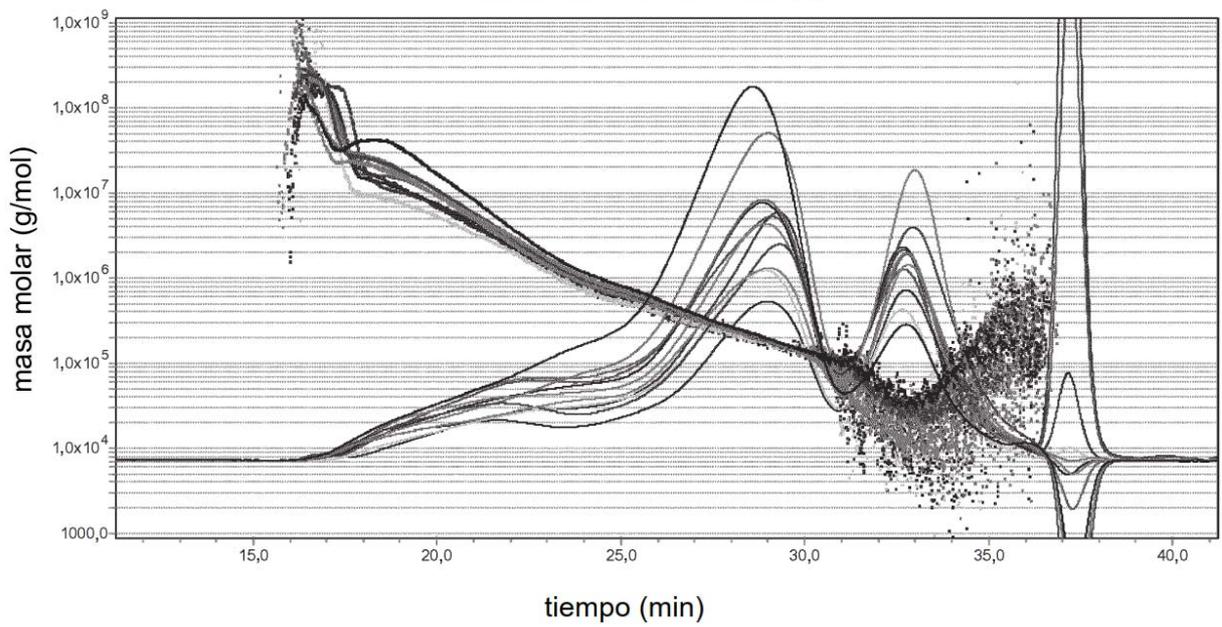


Figura 3:

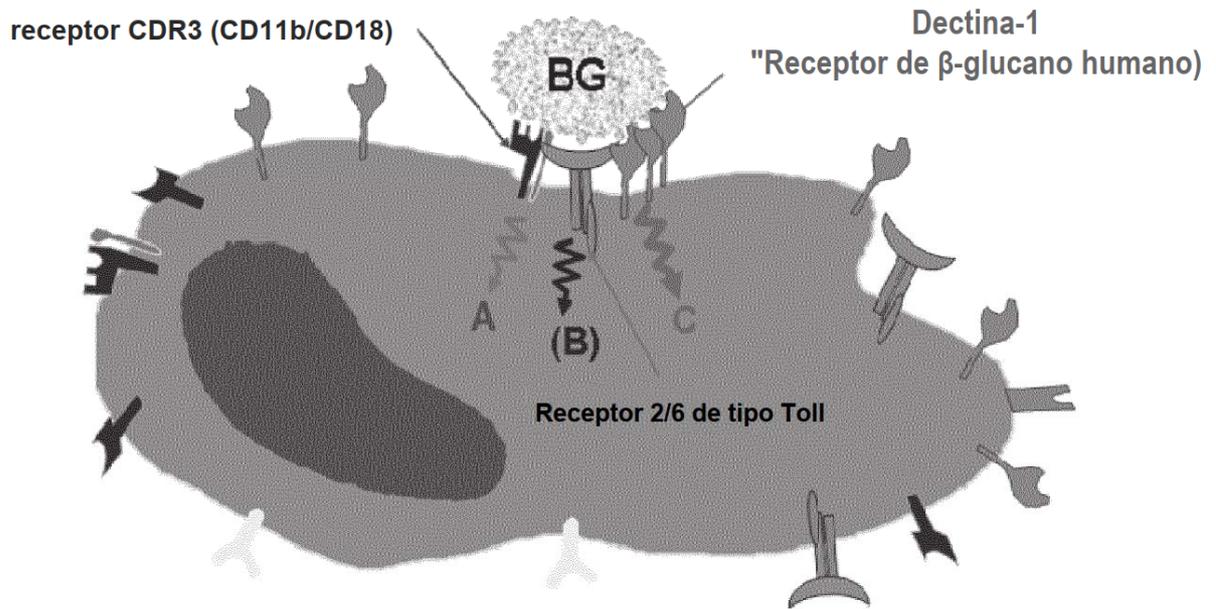


Figura 4:

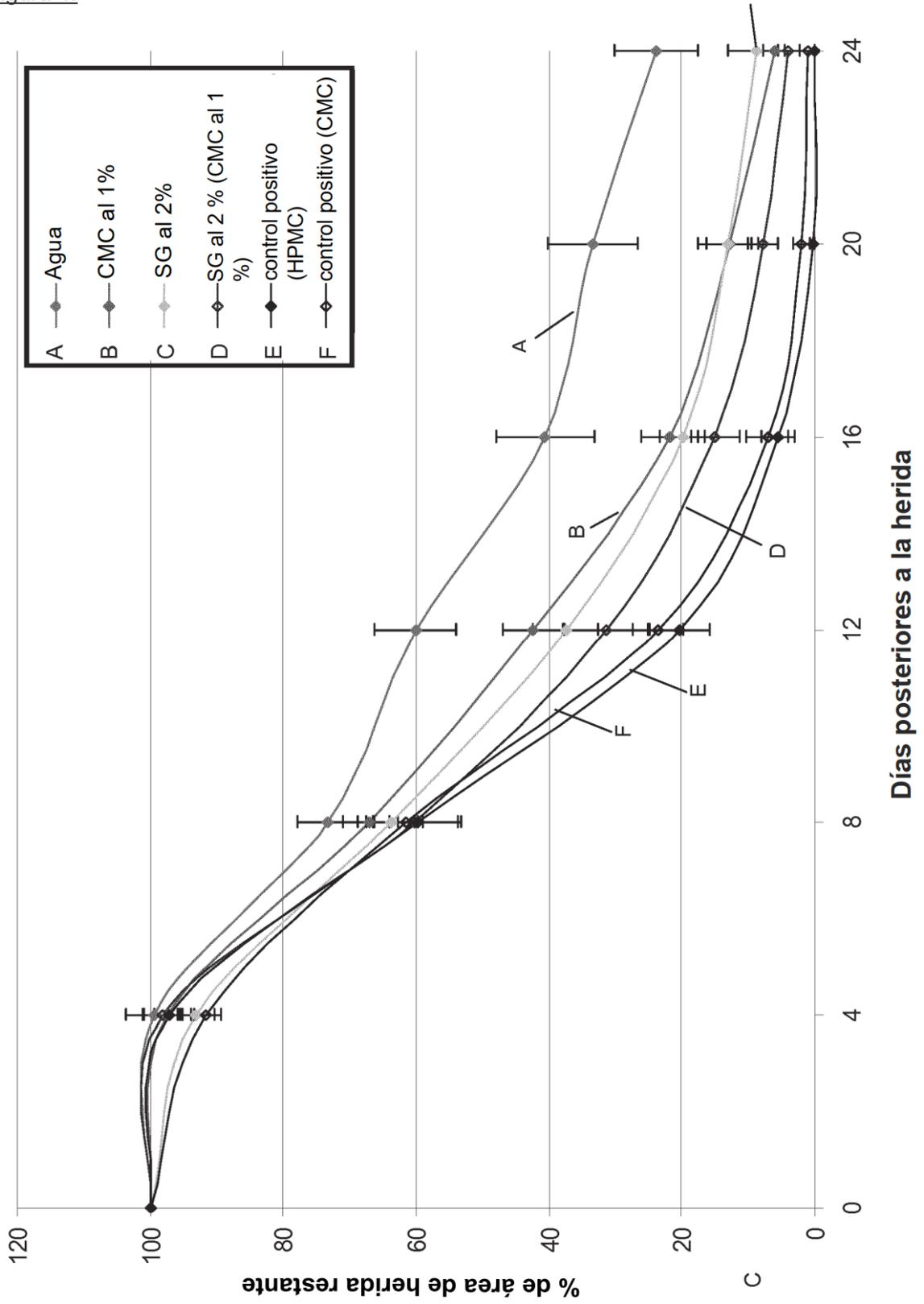


Figura 5:

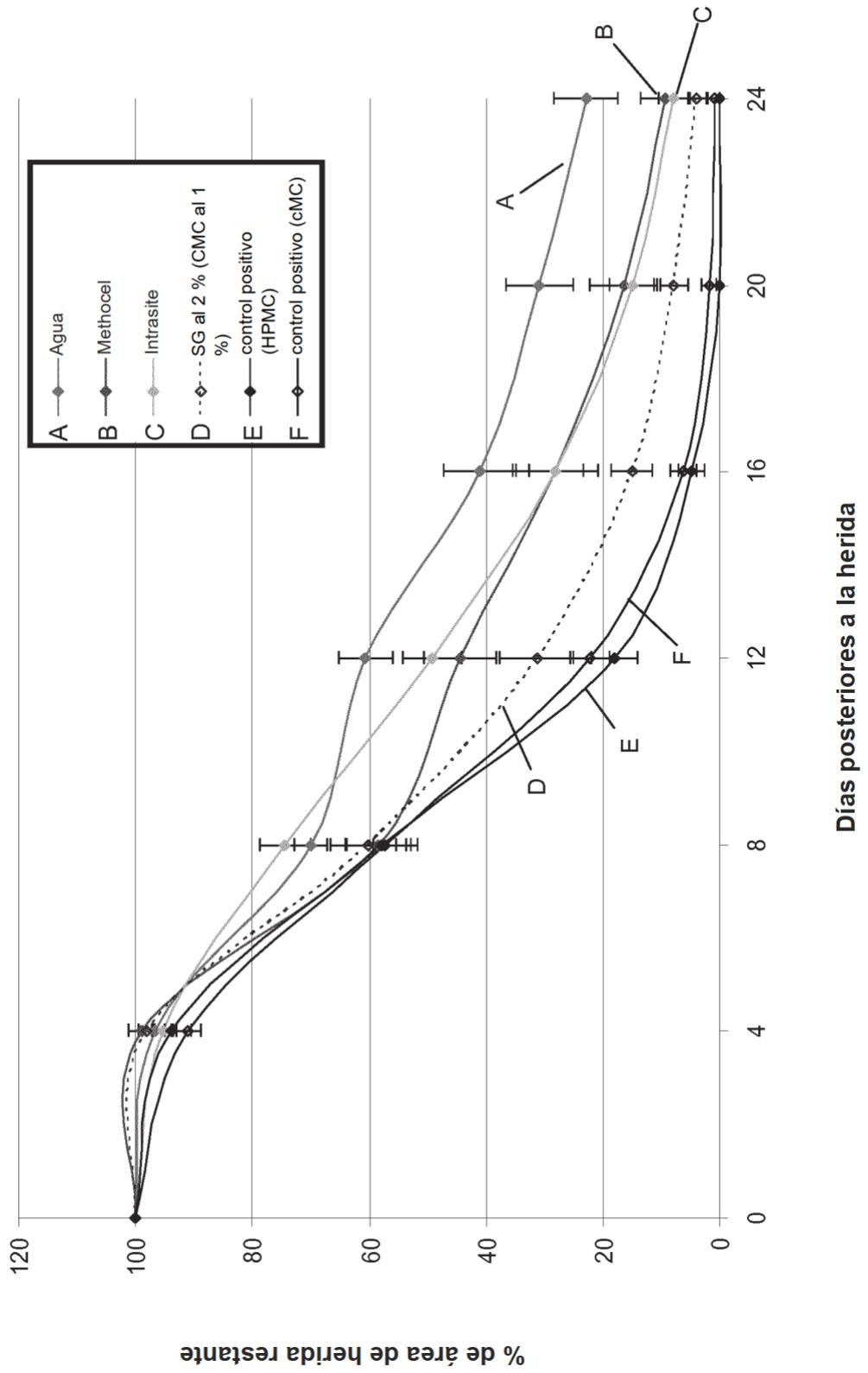


Figura 6:

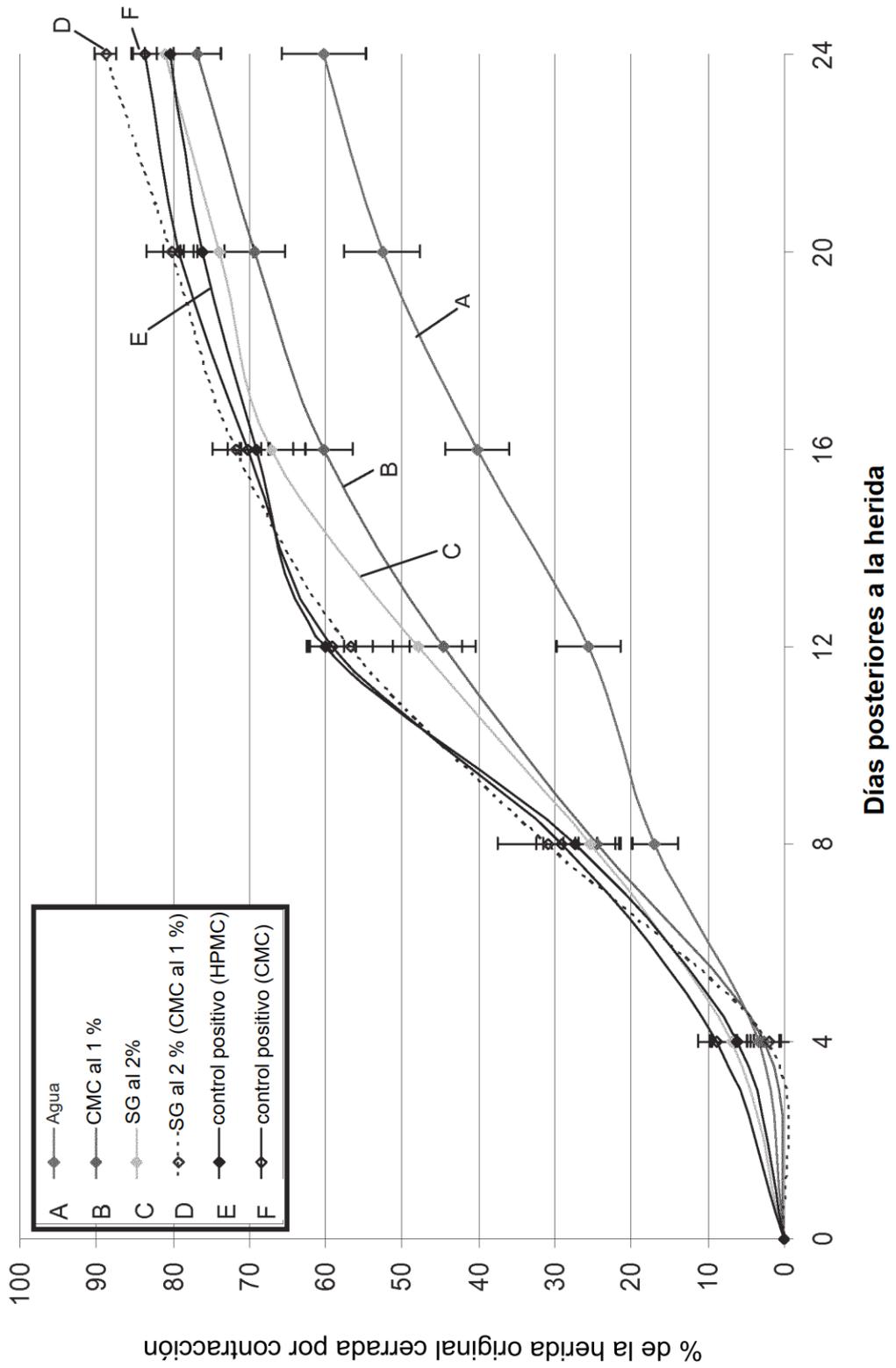


Figura 7:

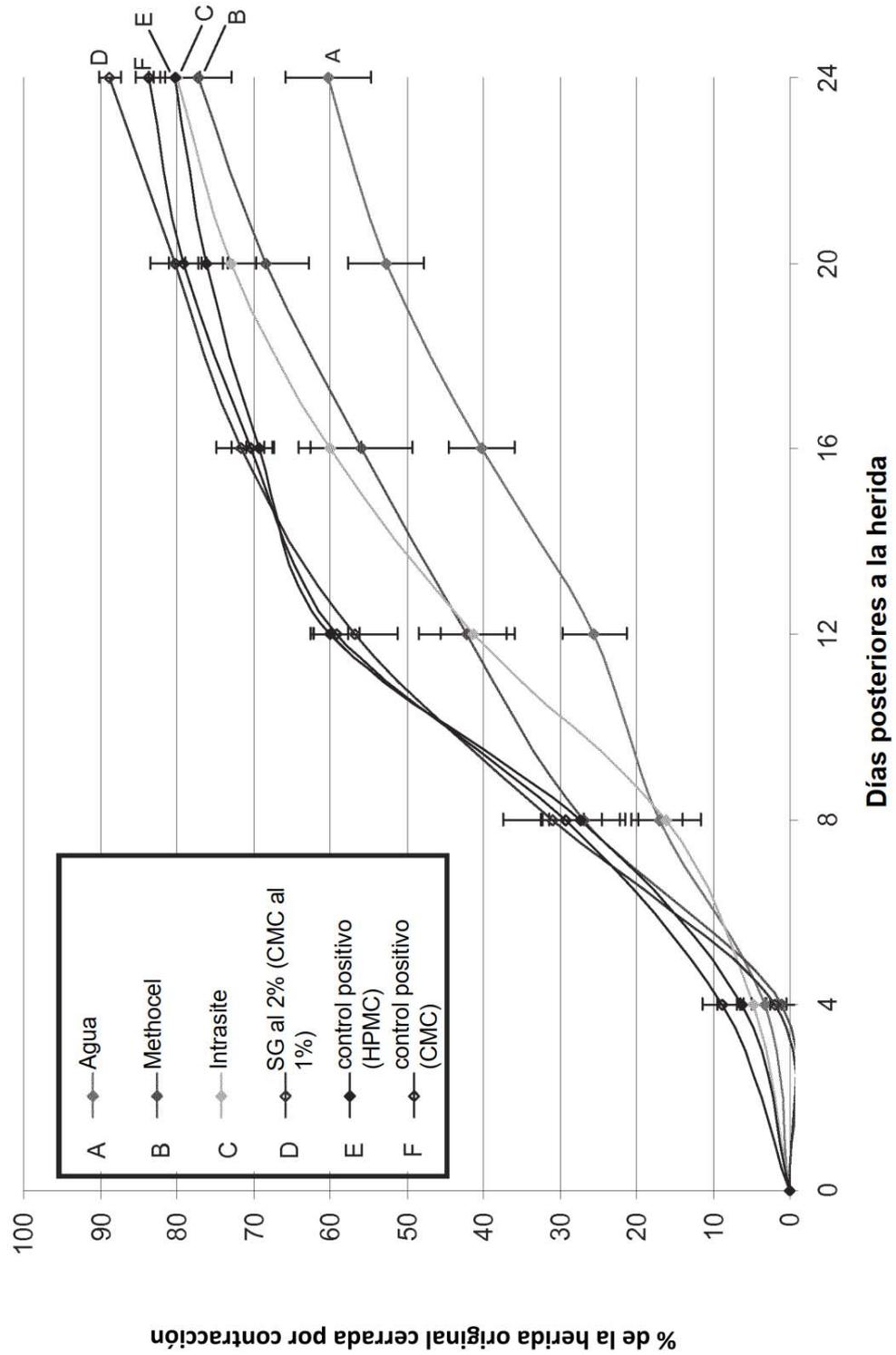


Figura 8:

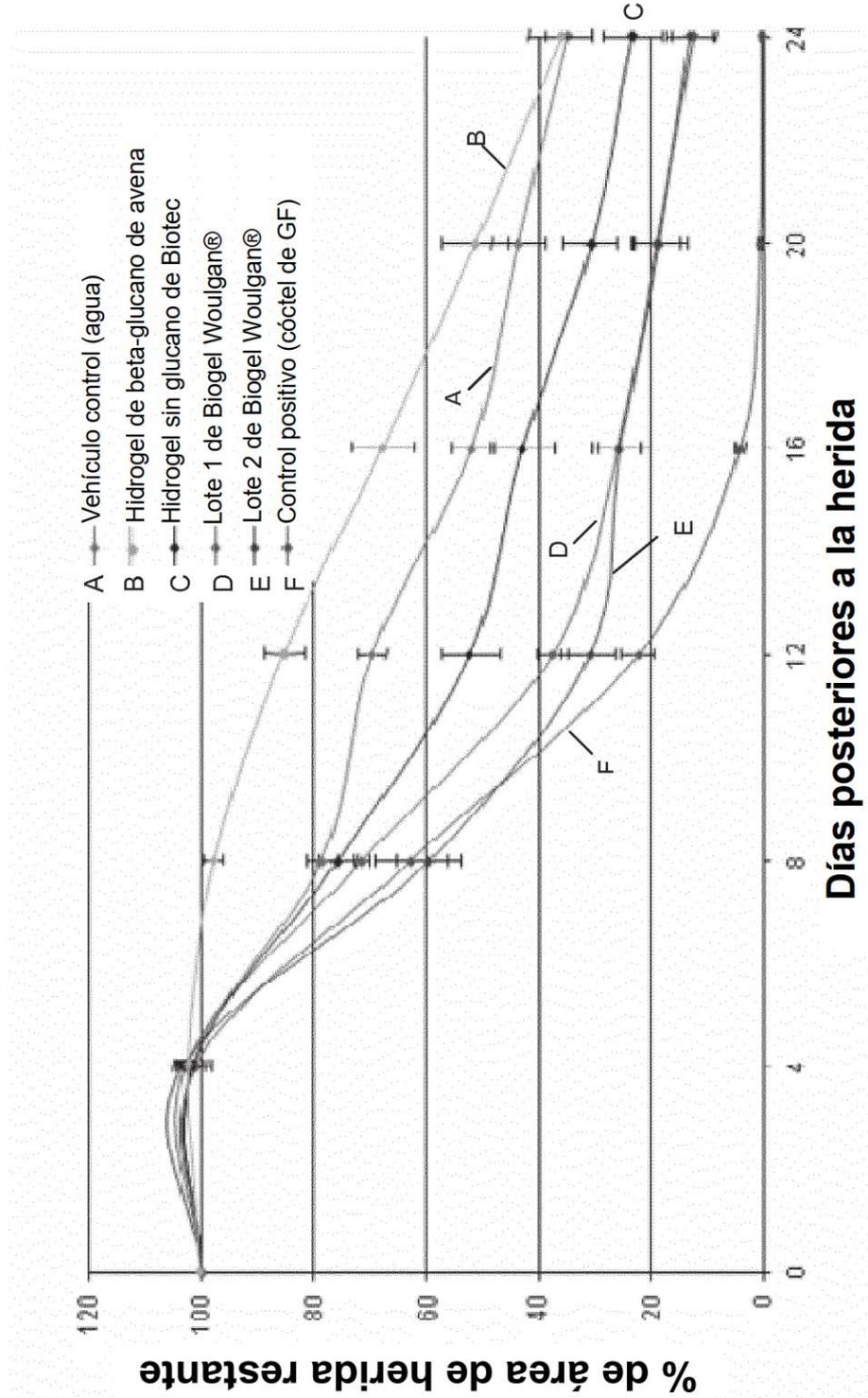


Figura 9:

