



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 357 601**

② Número de solicitud: 201130087

⑤ Int. Cl.:

**C08B 37/10** (2006.01)

**A61K 31/727** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **26.01.2011**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **28.04.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**28.04.2011**

⑰ Solicitante/s:  
**LABORATORIOS FARMACÉUTICOS ROVI, S.A.**  
c/ Julián Camarillo, 35  
28037 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Franco Rodríguez, Guillermo y**  
**Gómez Ochoa, María Teresa**

⑳ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

② Título: **Procedimiento de preparación de derivados de glicosaminoglicanos donadores de óxido nítrico, nitroderivados obtenidos y su uso en tratamiento de úlceras crónicas.**

③ Resumen:

Procedimiento de preparación de derivados de glicosaminoglicanos donadores de óxido nítrico, nitroderivados obtenidos y su uso en tratamiento de úlceras crónicas, como las úlceras de pie diabético, las úlceras producidas por quemaduras y las úlceras de presión. Más en particular, se refiere a procedimientos para la preparación de nitroderivados de heparina no fraccionada (HNF), derivados de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y derivados de heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM), todos ellos con capacidad para donar óxido nítrico, así como a su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras crónicas, y más en concreto de úlceras de pie diabético, úlceras producidas por quemaduras y/o úlceras de presión.

ES 2 357 601 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de preparación de derivados de glicosaminoglicanos donadores de óxido nítrico, nitroderivados obtenidos y su uso en tratamiento de úlceras crónicas.

5

**Campo de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento de preparación de derivados de glicosaminoglicanos donadores de óxido nítrico para el tratamiento de úlceras crónicas, en concreto pero de forma no limitativa para el tratamiento de úlceras de pie diabético, úlceras de quemados y úlceras de presión. Más en particular, se refiere a composiciones de derivados de heparina no fraccionada (HNF), derivados de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y derivados de heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM), todos ellos con capacidad para donar óxido nítrico en el tratamiento de úlceras crónicas, y más en concreto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras crónicas.

15 **Estado de la técnica**

La ulceración de algunas zonas corporales, como el pie o las extremidades inferiores, es una complicación significativa de enfermedades crónicas como la diabetes con una incidencia anual ligeramente superior al 2% (Abbott CA, *et al* (2002) The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort. *Diabet Med*, 19(5):377-84). Se estima que un 15% de los pacientes con diabetes desarrollarán úlceras en algún momento de su vida (Reiber G. E. (1996) The epidemiology of diabetic foot problems. *Diabet Med*. 13 Suppl 1:S6-11) y que alrededor de un 10%-30% de los que presenten úlceras progresarán con la amputación del miembro (Lipsky B.A. (2004) Medical treatment of diabetic foot infections. *Clin, Infed Dis*, 39 Suppl 2:S104-14). Además, esto se complica en el caso en el que se produce una isquemia en la extremidad inferior en la que aparece la úlcera, siendo producida en la mayor parte de los casos por insuficiencia de riego sanguíneo por alta incidencia de trombosis.

En relación con la mortalidad a los 5 años de los pacientes a los que se les practica una amputación de miembros inferiores, es de 50-60% (Reiber G. E. (1996) The epidemiology of diabetic foot problems. *Diabet, Med*, 13 Suppl 1:S6-11). Se han utilizado diversos métodos para el tratamiento del paciente con pie diabético que incluyen el control metabólico estricto, profilaxis de los factores de riesgo modificables, desbridamiento, empleo de apósitos, tratamiento antimicrobiano de las infecciones, eliminación de la presión del área lesionada, uso de injertos de piel, administración de factores de crecimiento y el empleo de métodos de revascularización en caso de existir indicación.

En la mayoría de los casos el tratamiento de este tipo de úlceras crónicas se realiza por vía tópica, por ejemplo, el empleo de apósitos en las úlceras como las del pie diabético es comúnmente utilizado. Entre los nuevos tipos de apósitos estudiados en ensayos clínicos controlados se encuentran los apósitos que se basan en membrana polimérica semipermeable, Promogran (matriz de colágeno), alginato, carboximetilcelulosa, hialuronan y presión subatmosférica (Eldor R. Y col. (2004) New and experimental approaches to treatment of diabetic foot ulcers: a comprehensive review of emerging treatment strategies. *Diabet. Med*. 21(11):1161-73). También se han desarrollado métodos para crear sustitutos de piel que son colocados sobre la lesión ulcerosa. El Dermagraft® se produce sembrando fibroblastos de dermis humana sobre un andamio sintético de material bioabsorbible que ha demostrado ser eficaz en las úlceras de bajo grado con una mayor proporción de curación en un menor tiempo (Marston WA, *et al*. (2003) Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group. The efficacy and safety of Dermagraft® in Improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* 28:1701-5). El Apligraf® consta de una capa de dermis compuesta de fibroblastos humanos en una matriz de colágeno tipo I bovino y una capa de epidermis formada de queratinocitos humanos. De manera similar, este sustituto de piel ha mostrado asociarse significativamente a una mayor y más rápida curación de lesiones cuando se aplica en úlceras neuropáticas de bajo grado y no infectadas (Veves A., *et al* (2001) Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care* 24:290-5). En un ensayo clínico fase III, aleatorizado, de doble ciego y controlado con placebo, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (Platelet Derived Growth Factor, abreviado PDGF) en forma de gel mostró ser eficaz y seguro para el tratamiento de pacientes diabéticos que presentaban úlceras neuropáticas con buena perfusión sanguínea (Wieman TJ., *et al* (1998) Clinical efficacy of beclaplerin (rh PDGF-BB) gel. *Diabetes Care* 21 (5):822-7). La mayoría de los pacientes (95%) incluidos en este estudio tenían úlceras con un área < 10 cm<sup>2</sup> según la evaluación por planimetría. El gel de becaplermina 100 µg/g, en comparación con placebo, aumentó significativamente la proporción de cierre completo de la lesión en un 43% (50 vs. 35%, p = 0.007) y redujo el tiempo para lograr dicho efecto en un 32% (86 vs. 127 días, p = 0.013). Los resultados satisfactorios con el PDGF o becaplermina (Regranex®) llevaron a su aprobación para el tratamiento de las úlceras neuropáticas en las extremidades inferiores del diabético que se extienden hasta el tejido subcutáneo o más profundamente y tienen un adecuado flujo sanguíneo (Brem H., Sheehan P., Bouillon AJ. (2004) Protocol for treatment of diabetic foot ulcers. *Am. J. Surg.* 187(5A): 1S-10S).

La definición de pie diabético propuesta por el Grupo de Consenso sobre Pie Diabético de la Sociedad Española de Angiología y Cirugía Vasculare es: "Alteración clínica de base etiopatogénica neuropática inducida por la hiperglicemia mantenida, en la que con o sin coexistencia de isquemia, y previo desencadenante traumático, se produce la lesión y/o ulceración del pie".

65

En cuanto a tratamientos por vía parenteral local de este tipo de afección, hace unos años se ha publicado un método de administración de un agente cicatrizante como el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), que consiste en la infiltración de una solución de la biomolécula en la lesión mediante varias inyecciones (WO 03053458). Este tratamiento ha mostrado tener efectividad en la prevención de la amputación del pie diabético pero tiene el inconveniente de que resulta traumático para el paciente ya que la aplicación de inyecciones en la lesión es muy dolorosa y en cada tratamiento deben aplicarse varias inyecciones durante varias semanas. También, en el documento EP 1499317 se divulga un método de tratamiento de complicaciones diabéticas tales como el pie diabético con inhibidores del intercambiador sodio-hidrógeno de tipo 1 (NHE-1), y en la publicación internacional WO 02077155 se describe que el factor de crecimiento de queratinocitos (KFG-2) promueve o acelera la curación de heridas.

Finalmente, la publicación internacional WO2007087759 se refiere a una composición farmacéutica que contiene microesferas con factores de crecimiento de epidermis para administración parenteral para pacientes que poseen afecciones crónicas en la piel, como son las úlceras de pie diabético. Muchas otras patentes se han enfocado sobre otros métodos de acelerar el rango de cicatrización. Sin embargo, ninguno de estos métodos ha probado ser ampliamente eficaz.

En la literatura no patente, por otro lado, se han publicado algunos estudios que divulgan ciertos resultados alentadores para enfermos de pie diabético tratados con heparinas de bajo peso molecular (HBPM), sobre la base de que las heparinas son conocidos antitrombóticos y antiinflamatorios que pueden mejorar la microcirculación vascular. En "Effect of Dalteparin of healing of chronic foot ulcers in diabetic patients with peripheral arterial occlusive disease", *Diabetes Care*, vol. 26(9), Septiembre 2003, así como en la publicación del mismo grupo de M. Kalani, *et al.* titulado "Beneficial effects of dalteparin on haemostatic function and local tissue oxygenation in patients with diabetes, severe vascular disease and foot ulcers", *Thrombosis Research*. 120, 653-661, 2007 en los se describen ensayos clínicos que demuestran que una heparina de bajo peso molecular (HBPM) tal como la dalteparina mejora la evolución de las úlceras de pie diabético en pacientes con enfermedad arterial oclusiva periférica. Sin embargo, llama la atención que en estos artículos los pacientes son tratados de forma conjunta con ácido acetilsalicílico, es decir, se deja entrever cómo la asociación de dos principios activos con efecto anticoagulante favorecen de forma sinérgica la evolución de las úlceras de pie diabético en pacientes con enfermedad arterial oclusiva periférica. También, en "Low molecular weight heparin seem to improve local capillary circulation and healing of chronic foot ulcers in diabetic patients", *VASA*, Brand 22, 1993, FET 2, se divulga la realización de ensayos clínicos, controlados con placebo, doble ciego, para evaluar la eficacia de dalteparina en enfermos con úlceras de pie diabético. Los resultados preliminares de este estudio parecen indicar que la dalteparina podría tener un efecto beneficioso sobre la prevención de este tipo de heridas, aunque siempre en dosis de profilaxis, es decir en ningún momento se emplean dosis de dalteparina superiores a 2500 UI/día, ya que se prevén hemorragias durante el tratamiento a dosis superiores, sin que este aumento suponga una eficacia mayor en el caso de pacientes con úlcera de pie diabético. Esto se debe a la creencia general en el estado de la técnica de que los pacientes diabéticos tienen mayor riesgo de sangrado que pacientes que no tienen la enfermedad (*Adverse impact of bleeding on prognosis in patients with acute coronary syndromes*, Eikelboom JW *et al.* *Circulation*. 2006 Aug 22; 114 (8):774-82).

En la publicación internacional WO201000906, se ha establecido que el efecto beneficioso cicatrizante de la administración de los glicosaminoglicanos no está relacionado con su actividad antitrombótica, mediada vía un pentasacárido de estructura definida ya que se demuestra experimentalmente que lo realmente importante es la presencia de una proporción de secuencias oligosacáridicas ricas en ciertos monosacáridos específicos que no necesariamente contienen el pentasacárido.

Por otro lado, aunque en el estado de la técnica los procesos de cicatrización estudiados se han centrado más en los pacientes diabéticos (ya que tienen alterado el proceso de cicatrización de las úlceras provocadas por la propia enfermedad), existe otro tipo de pacientes que presentan este tipo de ulceración crónica, como los pacientes encamados o que presentan úlceras de presión por otros motivos, ancianos, pacientes con úlcera isquémica, quemados o pacientes con ulceraciones agudas recurrentes, entre otros. Para este tipo de úlceras crónicas, cronificadas o recurrentes, las soluciones propuestas en el estado de la técnica son insuficientes, incluso aquellas que se basan en la aplicación de factores de crecimiento, por ello en los últimos años los especialistas proponen a los investigadores que promuevan más las alternativas terapéuticas, para, este tipo de necesidades médicas no satisfechas.

De otra parte, es conocido que el óxido nítrico (NO) juega un papel importante en la cicatrización de heridas debido a sus propiedades sobre angiogénesis, inflamación, proliferación celular, deposición de matriz y remodelación (*Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing*, Luo J *et al.* *Acta Pharmacol. Sin.* 2005, 26:259-264). El óxido nítrico es un gas endógeno producido en las células por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) sobre la L-arginina que la convierte en citrulina con liberación de NO. En estudios realizados sobre ratas diabéticas inducidas se ha demostrado que el tratamiento con moléculas donadoras de óxido nítrico (*Nitric oxide enhances experimental wound healing in diabetes*, Witte MB *et al.* *Br. J. Surg.* 2002,89:1594-1601) o con aporte suplementario de sustrato L-arginina (*Supplemental L-arginine enhances wound healing in diabetic rats*, Shi HP *et al.* *Wound Repair Regen.* 2003,11:198-203) mejora la cicatrización de úlceras.

La patente US5482925 describe la preparación de complejos de óxido nítrico con compuestos que presentan aminas primarias o secundarias. Uno de los compuestos seleccionados es heparina, sin embargo el proceso descrito para la formación del complejo, presenta la limitación de que necesita realizar la reacción a temperaturas muy bajas (-78°C).

## ES 2 357 601 A1

La patente US5691423 describe la preparación de compuestos nitrados unidos a una matriz polimérica, en este caso polisacáridos. Los polisacáridos descritos en esta patente (dextrano, polietiléniminocelulosa, etc.) actúan como una matriz inerte que sirve sólo de soporte para la administración del compuesto nitrado. En la presente invención, la matriz sobre la que se unen son glicosaminoglicanos, polisacáridos cuya capacidad *per se* para regenerar úlceras crónicas ha sido previamente descrita. Con la presente invención se busca el efecto sinérgico entre el polisacárido y el óxido nítrico generado *in situ*, para la curación de úlceras.

La publicación internacional WO0218449 describe la preparación de nitroderivados de polisacáridos mediante un proceso realizado en medio acuoso con ácidos minerales y que requiere trabajar a temperaturas de hasta -70°C. Además se requiere que previamente a la reacción de nitroderivatización el producto sea desulfatado y posteriormente N-resulfatado.

Las publicaciones internacionales WO03072611, WO03072612 y WO03072613, describen la preparación de nitroderivados de derivados de heparina (heparinas de bajo peso molecular, heparinas de ultra bajo peso molecular, epoxiheparinas, etc.) a través de distintos procesos realizados en medio acuoso y a muy baja temperatura (-70°C).

Las patentes US4440926 y EP1375524, describen la formación de ésteres de heparina, mediante esterificación parcial o total de los grupos carboxílicos. Para ello, previamente se forma el heparinato de amonio cuaternario y posteriormente se hace reaccionar con un haluro de bencilo (que puede contener un grupo nitro directamente unido al anillo aromático) en medio orgánico (dimetilformamida, diclorometano, etc.). Estos compuestos a diferencia de los de la presente invención no pueden generar óxido nítrico (NO) en medio fisiológico.

También se ha descrito la preparación de derivados de heparina con MOM-Piperazi/NO, pero la síntesis de estos complejos es muy complicada (Conversion of a polysaccharide to nitric oxide-releasing form. dual mechanism anti-coagulant activity of diazeniumdiolated heparin, Saavedra JE *et al.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2000, 10:751-753).

### Breve descripción de la invención

Hasta la fecha, la utilización de glicosaminoglicanos en el tratamiento de úlceras crónicas se ha descrito a groso modo para pacientes que tienen afecciones circulatorias severas ya que estas heparinas de bajo peso molecular poseen actividad antitrombótica y anticoagulante, expresada como efecto anti-factor X activado (Xa) y efecto anti-factor IIa. Sin embargo, no se utilizan de forma general para pacientes diabéticos que padecen úlcera de pie diabético sin enfermedad oclusiva arterial periférica, por el riesgo de sangrado que supone el tratamiento a dosis superiores. Esto es debido al efecto anti factor Xa que tienen este tipo de compuestos que se traduce en efecto antitrombótico y que, según se cree, guarda una relación directa con el contenido dentro de la estructura heparinoide de un pentasacárido concreto presente en las estructuras sacarídicas que conforman las heparinas de bajo peso molecular y muy bajo peso molecular y a la relación efecto anti-factor Xa/anti-factor IIa. Esta relación viene determinada porque a mayor cantidad de pentasacárido en la estructura total, mayor actividad anti-factor Xa, siendo el pentasacárido sintético (fondaparinux) el inhibidor más selectivo del factor Xa y por tanto la molécula con mayor capacidad antitrombótica de forma selectiva.

En el estado de la técnica se aprecia claramente que los pacientes diabéticos tienen alterado el proceso de cicatrización de las úlceras provocadas por la propia enfermedad, pero los inventores de la presente invención también han demostrado que el efecto de los compuestos objeto de la presente invención, así como de las composiciones que los contienen, pueden funcionar para todo tipo de úlceras de crónicas como las de presión o las producidas por quemaduras y que dicha administración es efectiva mediante tres vías principales de administración: parenteral, oral y tópica.

Para el objeto de la presente invención se entiende por úlceras crónicas a las soluciones de continuidad con pérdida de sustancia en la piel. Dependiendo del origen de la úlcera se pueden clasificar como: úlceras por presión, úlcera diabética, úlcera isquémica (arterial o venosa), úlcera postquemadura, úlceras postradioterapia, etc.

Esta clasificación se ha realizado según la causa que origina úlcera, sin embargo el mecanismo fisiopatológico que convierte una herida/úlcera en crónica, es una alteración en el proceso isquémico que lleva a la necrosis cutánea y a una dificultad regenerativa de la misma por medios naturales (Kirman CN. Pressure ulcers, non surgical treatment and principles, Emedicine Jul 2008 ([www.emedicine.com/plastic](http://www.emedicine.com/plastic)) An G, Faeder J, Vodovotz Y. Transactional systems biology: introduction of an engineering approach to the pathophysiology of the burn patient. J Burn Care Res. 2008; 29(2):277-85. Nikolovska S, *et al.* The role of nitric oxide in the pathogenesis of venous ulcers. Acta Dermatovenerol Croat 2005; 13(4):242-6).

En este sentido, por ejemplo la isquemia se puede producir por presión externa sobre los capilares (úlceras por decúbito o por presión), por lesión calórica (quemadura), o por obstrucción vascular (diabetes, arteriosclerosis, etc.). Tras el proceso isquémico de la piel y órganos circundantes, se produce una reperusión de los tejidos dañados, que aumenta la lesión inicial llevando a un empeoramiento y agravamiento de las lesiones. El mecanismo exacto del proceso de isquemia- reperusión que agrava la lesión inicial y que lleva a la cronicidad de la lesión, que se produce tras la necrosis inicial no se conoce, pero se sospecha que la continua producción de mediadores inflamatorios (citoquinas, interleuquinas, etc.) agravan el proceso isquémico inicial empeorando las lesiones, y llevando a la cronicidad de la úlcera.

Por ello, se han investigado diferentes armas terapéuticas para modelar la producción de mediadores inflamatorios que faciliten la regeneración tisular, pero que no empeoren el daño celular. Un hecho a resaltar es que el proceso de cicatrización de una herida es el mismo en casi todos los tejidos, después de la exposición a cualquier proceso destructivo (Gurtner GC *et al.* Wound repair and regeneration. Nature 2008; 453:314-21); de esta manera recientemente se ha investigado con heparinas de bajo peso molecular en la prevención de las heridas por quemaduras (Ravikumar T *et al.* Low molecular weight heparin-induced pharmacological modulation of burn wound healing. Ann Burn fire Disast 2006; 19(3):1-10. Oremus M, *et al.* The uses of heparin to treat burn injury. Evid Rep Technol Assess (Full Rep). 2006; (148):1-58) pero hasta la fecha no existe ningún tratamiento sistémico que facilite la regeneración de una úlcera crónica (Fonder MA *et al.* Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. J Am Acad dermatol 2008; 58:185-206) y aún menos se conoce en el caso de los glicosaminoglicanos cual es la composición y/o porcentaje de monosacáridos responsables de esta actividad curativa y regeneradora que favorece la aparición de sistemas fisiológicos como el bloqueo de la producción de mediadores inflamatorios, la regeneración capilar, o los mecanismos de reperfundición y cicatrización de las úlceras.

Es decir, los compuestos objeto de la presente invención, así como de las composiciones que los contienen, funcionan para úlceras crónicas incluso para pacientes que no tengan diabetes y a los que les aparecen determinados tipo de úlceras crónicas que no cicatrizan fácilmente como pueden ser las úlceras de presión, entendiéndose úlceras de presión como aquellas que presentan áreas de daño en la piel y tejido subyacente causado por la presión prolongada sobre un plano duro, no necesariamente intensa, e independiente de la posición. En el estado de la técnica actual, aunque se emplea de forma indistinta, se desecha el término úlcera "por decúbito" porque las úlceras de presión no necesariamente tienen que estar vinculadas a la posición de decúbito sino al efecto causado por la presión prolongada sobre un plano duro, no necesariamente intensa, e independiente de la posición.

Es un problema común en el cuidado de los pacientes con enfermedades crónicas, sobre todo en ancianos con movilidad limitada, con importante morbi-mortalidad y elevada repercusión económica y social.

Por ello, para el objeto de la presente invención se entiende por "úlceras de presión" a las úlceras que presentan áreas de daño en la piel y tejido subyacente causado por la presión prolongada sobre un plano duro, no necesariamente intensa, e independiente de la posición. Para el objeto de la invención se consideran úlceras crónicas, aunque algunos especialistas las consideren agudas y recurrentes, ya que son dependientes siempre del tiempo durante el que se infringe la presión.

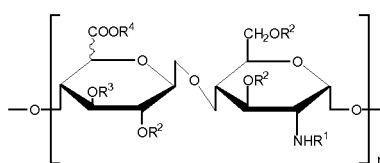
La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de derivados de glicosaminoglicanos en los que los grupos nitros se encuentran covalentemente unidos a la estructura sacarídica, en particular HNF, HBPM, HMBPM y oligosacáridos de heparina obtenidos tanto a partir de HNF, HBPM o HMBPM o por síntesis orgánica (Fondaparinux, idraparinux, etc.), para tratamiento de úlceras crónicas como las de pie diabético, úlceras de presión y úlceras provocadas por quemaduras. Estos compuestos son capaces en condiciones fisiológicas de liberar Óxido nítrico (NO) hasta valores que son terapéuticamente efectivos. En concreto, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de nitroderivados de heparinas que comprende la etapa de hacer reaccionar la heparina con un haluro de amonio cuaternario obteniendo una sal de amonio cuaternario de heparina, y a continuación hacer reaccionar la sal de amonio cuaternario de heparina:

a) o bien con una mezcla nitrante en un medio orgánico; o

b) con un compuesto halonitroalifático o halonitroaromático en un medio orgánico, para producir un nitroderivado de heparina que tiene grupos -ONO<sub>2</sub> unidos covalentemente a la estructura sacarídica.

La invención también se refiere al uso de los nitroderivados de heparinas obtenidos mediante este procedimiento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras crónicas, en particular de úlceras de pie diabético, úlceras de presión o úlceras provocadas por quemaduras.

La invención también se refiere a los compuestos nitroderivados de heparina obtenidos mediante el procedimiento anteriormente mencionado, que comprenden una unidad disacarídica repetitiva con la siguiente fórmula de Markush:



R<sub>1</sub>: SO<sub>3</sub>M, COCH<sub>3</sub> ó H  
 R<sub>2</sub>: SO<sub>3</sub>M, H ó NO<sub>2</sub>  
 R<sub>3</sub>: H ó NO<sub>2</sub>  
 R<sub>4</sub>: M ó (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONO<sub>2</sub>; m:1-20  
 M: Metal alcalino o alcalinotérreo  
 n: 1 - 66

## ES 2 357 601 A1

Con respecto al estado de la técnica (véase por ejemplo la publicación internacional WO 03/072612), los inventores consiguen la unión covalente de los grupos nitro a la estructura oligosacáridica en condiciones de reacción muchos menos drásticas que las allí descritas. En particular, en este documento se describe la nitración directa de heparinas con una mezcla nitrante, pero para ello es preciso utilizar temperaturas de reacción muy bajas, del orden de  $-70^{\circ}\text{C}$  (véanse los Ejemplos 1 y 2 del citado documento). En la presente invención, por el contrario, gracias a la formación previa de la sal de amonio cuaternario del compuesto polisacáridico, se consiguen temperaturas de reacción superiores a  $-15^{\circ}\text{C}$  y en una de las vías sintéticas descritas a temperatura ambiente, lo cual es claramente ventajoso frente a la técnica anterior. Esta etapa primera de formación de la sal de amonio cuaternario de heparina a partir de la heparina y un haluro de amonio cuaternario, previamente a la nitración de la sal de amonio cuaternario obtenida es, en consecuencia, lo que permite obtener las ventajas de la invención en términos de unas temperaturas de reacción más favorables, y además aporta un concepto inventivo general común a la invención.

### Descripción de las figuras

Figura 1: Evolución del área de las heridas ( $\text{cm}^2$  vs días).

La reducción de las heridas y por tanto la disminución del área de las mismas y el aumento del porcentaje de reducción es significativo ( $p < 0,05$ ) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera en los grupos 1-3, mientras que en el grupo 4 lo es a partir del día 3.

Figura 2: Evolución del porcentaje de cierre de heridas (% vs días).

Se observa que los grupos 1-3 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 90% a partir del día 18 mientras que el grupo 4 alcanzó el día 18 el 89%.

El grupo 2 muestra significativamente ( $p < 0,05$ ) una mayor reducción del área de la herida y un menor tiempo necesario para ello respecto al resto de los grupos.

Figura 3: Evolución del área de las heridas ( $\text{cm}^2$  vs días).

La reducción de las heridas y por tanto la disminución del área de las mismas y el aumento del porcentaje de reducción es significativo ( $p < 0,05$ ) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera para el grupo 3; a partir del día 10 tras la creación de la úlcera para los grupos 1,4 y 5; a partir del día 14 para el grupo 2.

Figura 4: Evolución del porcentaje de cierre de heridas (% vs días).

Se observa que los grupos 3 y 5 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 60% a partir del día 21 mientras que esta reducción no se observa a este tiempo en el resto de los grupos. El grupo 5 alcanzó el día 28 el 91% de reducción de la úlcera.

El grupo 3 y el grupo 5 muestran significativamente ( $p < 0,05$ ) un menor tiempo necesario para la reducción de la úlcera respecto al resto de los grupos.

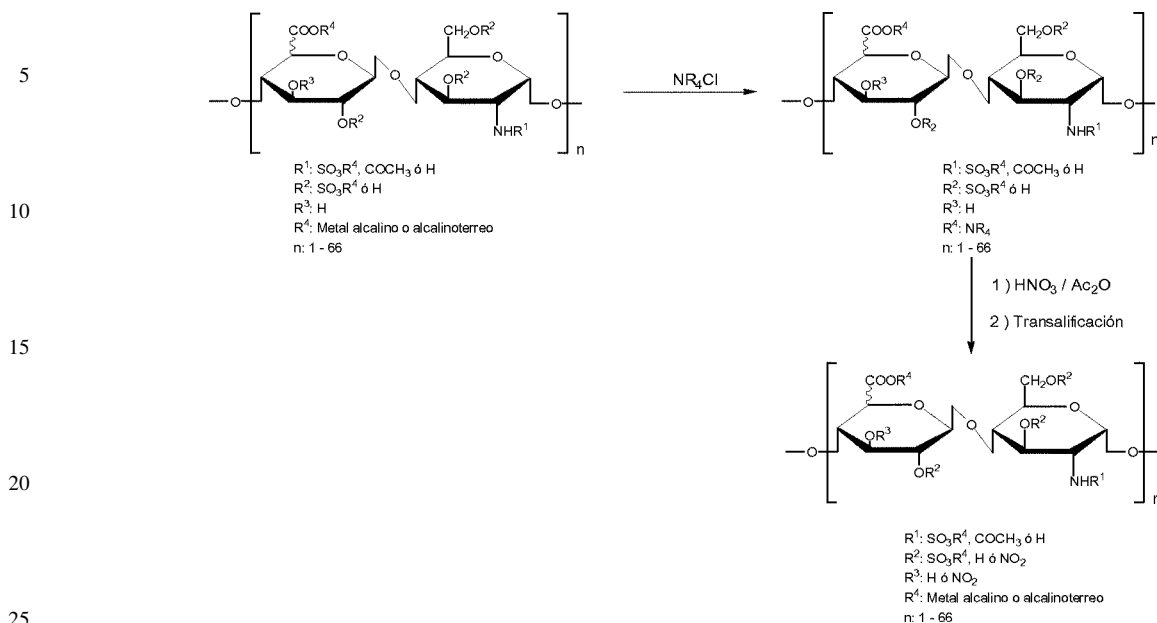
### Descripción detallada de la invención

Los nitroderivados de glicosaminoglicanos pueden ser preparados por diversas rutas.

Una primera posibilidad es por nitración directa con una mezcla nitrante sobre la sal de amonio cuaternario del glicosaminoglicano. La sal de amonio cuaternario puede ser de benzalconio, bencetonio, etc. La sal preferente es de benzalconio. Ejemplos de mezclas nitrantes, entre otras, son anhídrido acético-ácido nítrico, ácido sulfúrico-ácido nítrico, ácido fosfórico-ácido nítrico, etc. La mezcla preferente es anhídrido acético-ácido nítrico que genera nitrato de acetilo, que es el reactivo nitrante. La relación molar entre anhídrido acético y ácido nítrico puede variar en un rango entre 0,3 y 15 (preferentemente entre 0,5 y 2,5).

La reacción se realiza en un medio orgánico que puede ser diclorometano, cloroformo, formamida, etc., siendo de preferencia diclorometano y a una temperatura comprendida entre  $-15^{\circ}\text{C}$  y  $+5^{\circ}\text{C}$ , preferentemente entre  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ . La reacción se deja entre 0,1 y 24 horas, preferentemente entre 0,5 y 2 horas. El esquema de reacción se muestra a continuación, según el esquema de reacción 1:

Esquema de reacción 1

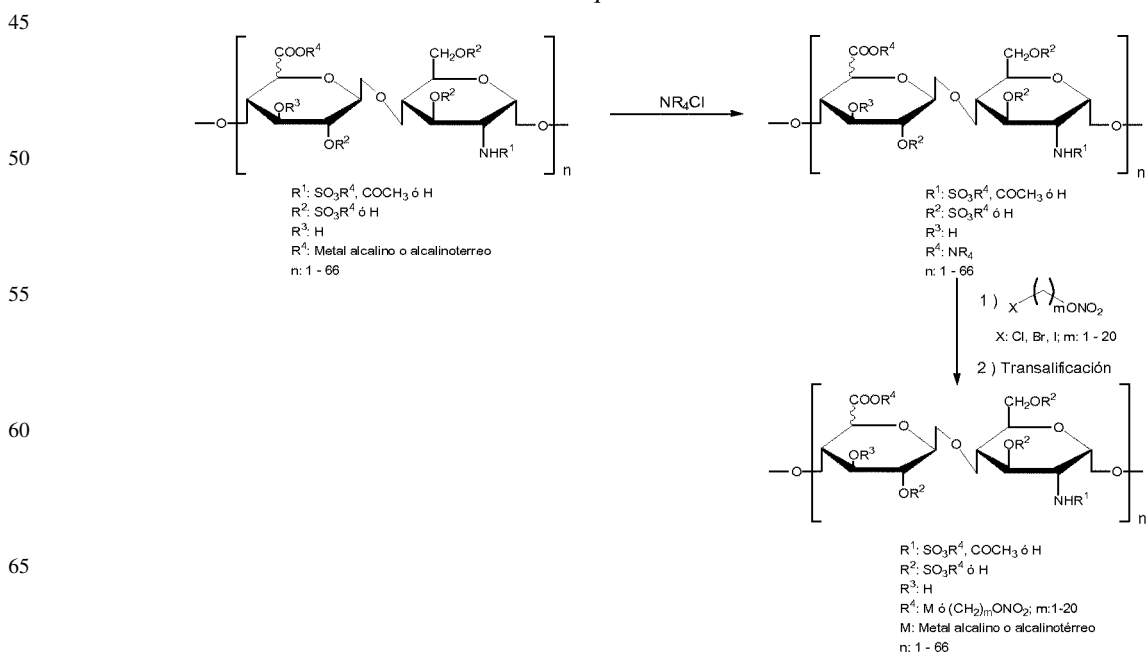


30 Para el objeto de la presente invención, el esquema de reacción 1 representado anteriormente, se muestra con fines ilustrativos no limitativos, como una de las alternativas de reacción contempladas en la reivindicación 1. En este esquema se observa que la región afectada del glicosaminoglicano es una unidad disacáridica general de una heparina, ya sea no fraccionada, fraccionada, de bajo peso molecular o de ultrabajo peso molecular.

35 Otra posibilidad para la síntesis de nitroderivados de glicosaminoglicanos por reacción con un halonitrocompuesto sobre la sal de amonio cuaternario previamente formada del glicosaminoglicano. La sal de amonio cuaternario puede ser de benzalconio, bencetonio, etc. La sal preferente es de benzalconio. El halonitrocompuesto puede ser un halonitroalcano o halonitroaromático. De preferente es un halonitroalcano con una cadena comprendida entre 1-20 carbonos, de preferente entre 2 y 6 carbonos. El medio de reacción es un disolvente orgánico que puede ser diclorometano, cloroformo, dimetilformamida, formamida, etc., siendo preferentemente diclorometano.

40 La relación molar entre el halonitrocompuesto y la sal de heparina está comprendida entre 1 y 10, siendo de preferente entre 3 y 8. La temperatura de reacción está comprendida entre 20°C y + 45°C, preferentemente entre 25°C y 40°C. La reacción se deja entre 1 y 72 h, preferentemente entre 16 y 24 horas. El esquema de reacción se muestra a continuación, según el esquema de reacción 2:

Esquema de reacción 2



## ES 2 357 601 A1

Para el objeto de la presente invención, el esquema de reacción 2 representado anteriormente, se muestra con fines ilustrativos no limitativos, como una de las alternativas de reacción contempladas en la reivindicación 1. En este esquema se observa que la región afectada del glicosaminoglicano es una unidad disacáridica general de una heparina, ya sea no fraccionada, fraccionada, de bajo peso molecular o de ultrabajo peso molecular.

Los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de úlceras crónicas, en concreto úlceras de pie diabético, y úlceras de presión y más en concreto en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras crónicas. La heparina se selecciona de entre heparinas no fraccionadas (HNF), derivados de heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y derivados de heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM).

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan a continuación sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica.

Se han realizado una serie de experimentos para demostrar que el uso de glicosaminoglicanos tales como heparinas de bajo peso molecular en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de úlcera de pie diabético a dosis de tratamiento para HBPM.

En estos experimentos se han utilizado varios compuestos, en particular los siguientes:

*Bemiparina*: es una heparina de bajo peso molecular de segunda generación, (peso molecular medio de 3.600 Daltons) y una relación anti-Xa/anti-IIa superior a 8.

*Heparina Sódica*: Heparina no Fraccionada. Entre otras presenta las siguientes características (Ph. Eur. 6th Edition): Actividad anticoagulante:  $\geq 150$  UI/mg.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la preparación de sal de benzalconio de heparina.

50 g de Heparina sódica se disuelven en 360 mL de Agua. Sobre esta solución se añaden durante 35' una solución de cloruro de benzalconio (110,6 g en 110 mL de agua). La solución se mantiene 60' en agitación y se deja reposar. El sobrenadante se retira y el precipitado se lava tres veces con agua, se liofiliza y se obtienen 128,18 g de la sal de heparinato de benzalconio.

#### Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la preparación de sal de amonio cuaternario de bemiparina.

50 g de Bemiparina se disuelven en 360 mL de Agua. Sobre esta solución se añaden durante 35' una solución de cloruro de benzalconio (110,6 g en 110 mL de agua). La solución se mantiene 60' en agitación y se deja reposar. El sobrenadante se retira y el precipitado se lava tres veces con agua, se liofiliza y se obtienen 123,74 g de la sal de benzalconio de bemiparina.

#### Ejemplo 3

En un matraz de 50 mL, se añaden 0,26 mL de anhídrido acético a 5 mL de diclorometano a  $-10^{\circ}\text{C}$ . Transcurridos 10 minutos con agitación y a  $-10^{\circ}\text{C}$ , se añaden 0,10 mL de ácido nítrico. La mezcla se agita y se mantiene a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, y después se agita y mantiene a  $0^{\circ}\text{C}$  durante otra hora.

A continuación se gotea en 5 minutos 1,98 g del producto obtenido en el ejemplo 1 disuelto previamente en 20 mL de diclorometano a  $0^{\circ}\text{C}$ . Se agita y se mantiene la reacción a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. El crudo obtenido se añade sobre 12 mL AcONa/MeOH 10% (p/V) y se deja 16 horas de reposo. Se separa el sólido por centrifugación y se lava con dos volúmenes de iPrOH. El sólido se redisuelve en 20 mL de agua purificada, se neutraliza con NaOH 1N, se disuelven 2 g NaCl, se añaden 3V iPrOH y se deja 24 horas en reposo.

El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío a  $35^{\circ}\text{C}$ . Se obtienen 0,89 g y presenta las siguientes características:

Peso molecular: 15.382 Da.

Actividad anti-FXa: 18,7 UI/mg; Actividad anti-FIIa: 25 UI/mg.



## ES 2 357 601 A1

FTIR:  $\bar{\nu}$  CHO=1735,6  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}$  ONO<sub>2</sub>=1275,7  $\text{cm}^{-1}$  (hombro),  $\bar{\nu}$  NO=1628,6  $\text{cm}^{-1}$  (hombro).

Análisis elemental: %C: 6,84; %H: 1,38; %N: 1,25; %S: 3,01. ONO<sub>2</sub>/unidad sacarídica: 0,44.

5

### Ejemplo 4

A una solución de 1 g del producto obtenido en el ejemplo 1 disuelto en 20 de diclorometano mantenida a 0°C, se le añade 0,57 mL de anhídrido acético y 0,22 mL de ácido nítrico y la reacción se mantiene durante 24 h a 0°C. Transcurrido ese tiempo, la solución se añade sobre 6 mL de solución de acetato sódico al 10% en metanol y se deja 16 horas de reposo. Se separa el sólido por centrifugación y se lava con dos volúmenes de MeOH. El sólido se redissuelve en 10 mL de agua purificada, se neutraliza con NaOH 1N, se añaden 2 g NaCl y 3V de MeOH y se deja 24 horas en reposo. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío a 35°C. Se obtienen 0,32 g de precipitado (Rto.: 82%).

15 El producto obtenido presenta las siguientes características:

Peso molecular medio de 7251 (9377) Daltons.

Actividad anti-factor Xa: 18 UI/mg.

20

FTIR:  $\bar{\nu}$  CHO=1741,4  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}$  ONO<sub>2</sub>=1276,7  $\text{cm}^{-1}$  (hombro),  $\bar{\nu}$  NO=1646,9  $\text{cm}^{-1}$ .

Análisis elemental: %C: 22,37; %H: 3,97; %N: 6,22; %S: 6,53. ONO<sub>2</sub>/unidad sacarídica: 0,93.

25

### Ejemplo 5

En un matraz de 50 mL, se añaden 0,57 mL de anhídrido acético a 15 mL de diclorometano con agitación y se enfría a -10°C. Transcurridos 10 minutos se añaden 0,22 mL de ácido nítrico. La mezcla se agita y se mantiene a -10°C durante 1 hora, y después se agita y mantiene a 0°C durante otra hora.

A continuación se gotea en 1 minuto 1 g del producto obtenido en el ejemplo 1, disuelto en 10 mL de diclorometano a 0°C. Se agita y mantiene la reacción a 0°C durante 30 minutos.

35 El crudo se añade sobre 6 mL de AcONa/MeOH 10% (p/V) y se deja 16 horas de reposo. Se separa el sólido por centrifugación, el sólido blanco obtenido se lava con dos volúmenes de iPrOH y se disuelve en 10 mL de agua purificada, se neutraliza con NaOH 1N, se añade 1 g NaCl, y 60 mL de iPrOH y se deja 24 horas de reposo. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío a 35°C. Se obtienen 0,58 g con las siguientes características:

40 Peso molecular medio: 3.858 Da.

Actividad anti-FXa: 10,7 UI/mg. Actividad anti-FIIa: 1,4 UI/mg.

FTIR:  $\bar{\nu}$  CHO =1744,3  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}$  ONO<sub>2</sub>=1274,7  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}$  NO=1643,1  $\text{cm}^{-1}$ .

45

Análisis elemental: %C: 6,47; %H: 1,22; %N: 2,10; %S: 2,88. ONO<sub>2</sub>/unidad sacarídica: 1,17.

### Ejemplo 6

50

En un matraz de 250 mL, se añaden 2,28 mL de anhídrido acético a 40 mL de diclorometano con agitación y a -10°C. Tras 10 minutos se añaden 0,88 mL de ácido nítrico. La mezcla se agita y se mantiene a -10°C durante 45 minutos, y después se agita y mantiene a 0°C durante 45 minutos.

55 A continuación se gotea en 2 minutos 4 g de heparinato de benzalconio disuelto en 80 mL de diclorometano a 0°C. Se agita y mantiene la reacción a 0°C durante 16 h. El crudo se añade a 24 mL de AcONa/MeOH 10% (p/V) y se deja 16 horas en reposo. Se separa el sólido blanco por centrifugación y se lava con dos volúmenes de iPrOH. El sólido se disuelve en 40 mL de agua purificada, se neutraliza con NaOH 1N, se añaden 4 g NaCl y 240 mL de iPrOH y se deja 24 horas de reposo. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío a 35°C. Se obtienen 1,79 g de producto, con las siguientes características:

60

Peso molecular medio 2.379 Da.

Actividad anti-FXa = 2,3 UI/mg; Actividad anti-FIIa < 0,2 UI/mg.

65

FTIR:  $\bar{\nu}$  CHO=1748,2  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}$  ONO<sub>2</sub>=1.279,5  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\bar{\nu}$  NO=1646,9  $\text{cm}^{-1}$ .

Análisis elemental: %C: 2,22; %H: 0,45; %N: 0,82; %S: 1,32. ONO<sub>2</sub>/unidad sacarídica: 1,90.

## ES 2 357 601 A1

### Ejemplo 7

1,25 g del producto obtenido en el Ejemplo 2 se disuelven en 12,5 mL de diclorometano. Se añaden 0,24 mL de trietilamina y posteriormente 0,27 g de 4-cloronitroxibutano y la reacción se mantiene 24 h a 35°C. Transcurrido ese tiempo se vuelve a repetir dos veces la adición de trietilamina y 4-cloronitroxibutano, manteniendo la reacción cada vez durante 24 h a 35°C. Finalmente la solución se añade sobre 7,5 mL de solución de acetato sódico al 10% en metanol y se deja reposar 16 horas. El precipitado se recoge por centrifugación y se redisuelve al 10% en agua, se neutraliza, se añaden 1,25 g de cloruro sódico y se precipita con 30 mL de metanol. El precipitado se recoge por filtración y se seca a vacío a 35°C. Se obtienen 0,42 g de precipitado (Rendimiento 83,15%). El producto obtenido presenta las siguientes características:

Peso molecular medio de 2587 Daltons.

Actividad anti-factor Xa: 88 UI/mg.

### Ejemplo 8

#### *Estudio En Ratón Diabético Por Vía Parenteral*

La investigación se ha llevado a cabo con 70 ratones machos, cepa BKS.Cg-m+/+Lepr db/j, con un peso medio de 48 gr. Todos los animales fueron sometidos a una exhaustiva evaluación clínica previa para excluir en todos los animales algún tipo de signo patológico como descarga nasal, diarreas, etc. Dicha evaluación incluyó la auscultación de frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, calidad del pulso, color de las mucosas, tiempo de relleno capilar y temperatura rectal.

Transcurridos diez días de aclimatación, en el animalario del centro, fueron identificados mediante un sistema de código de colores y así fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos de estudio.

#### *Ulceración de ratones diabéticos de la cepa BKS.Cg-m+/+Lepr db/jy medida del grado de cicatrización*

Para este ejemplo se escogieron 4 grupos:

Grupo 1: Control:	15 ratones
Grupo 2: Ejemplo 7	15 ratones
Grupo 3: Ejemplo 4	15 ratones
Grupo 4: Bemiparina	10 ratones

La selección de las ratones incluidas en cada grupo se realizó al azar.

El primer día del ensayo se anestesiaron los animales con anestesia inhalatoria con isofluorano al 2% en oxígeno al 100% con un flujo de gas fresco de 2 L/min. Se rasuró el lomo del animal, se limpió la zona con desinfectante y se marcó la situación de la herida, mediante plantilla para igualar su posición en todos los animales. La herida se realizó mediante una incisión circular de 0,6 cm de diámetro mediante un punch (o bisturí circular) de biopsia cutánea, extirpándose la piel de la zona media dorsal. Posteriormente se colocó una lámina de silicona de 1,2 mm de grosor con una apertura central circular de 12 mm de diámetro interno la cual se adhirió a la piel con cianoacrilato y se fijó con 4 puntos de nylon 6/0 para minimizar y evitar la retracción de la piel. La zona de la herida se tapó con un apósito semipermeable. Se administró por vía i.p. 0,5 mL/animal de suero fisiológico después de la intervención.

Durante los 7 días posteriores a la intervención se administró analgesia (Paracetamol, 1 mg/mL) en el agua de bebida.

Al día siguiente y durante un total de 18 días, los animales se medicaron con los tratamientos asignados a la dosis de 10 mg/Kg siendo el volumen de administración 0,5 mL/ratón por vía subcutánea en el lomo del animal, evitando la zona de la herida. En función de los valores de áreas obtenidos se valoró la continuación o el cese del tratamiento. En nuestro caso consideramos apropiado sacrificar a los animales a los 18 días del estudio.

Se realizó el seguimiento de los animales durante un período de 18 días valorándose macroscópicamente la evolución de las heridas 2 veces por semana. La valoración se realizó mediante fotografía digital de la herida y análisis posterior de la imagen. Se registró también el peso corporal de los animales dos veces por semana.

## ES 2 357 601 A1

Se calculó el porcentaje de reducción de la herida según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ reducción herida} = \frac{(\text{Abasal} - \text{A tiempo})}{(\text{Abasal})} \times 100$$

Se utilizó como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención.

Tras la última medida se sacrificaron los animales. La zona de la piel donde se produjo la herida se conservó hasta su procesamiento: una mitad en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina) y la otra mitad se congeló en nitrógeno líquido para la determinación de citoquinas conservando las muestras posteriormente en congelador ( $-80 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Este procedimiento se realizó también con 3 animales de cada grupo el tercer día después de la realización de la herida. Todas las muestras conservadas en formol fueron enviadas para su posterior análisis histológico.

### Evaluación de los resultados

Los resultados obtenidos se han comparado y analizado utilizando el programa estadístico SPSS 15.0 statistical package for Windows, SPSS Inc, Chicago, Illinois. Empleando un test de ANOVA para medidas repetidas seguido de un test de Tukey. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Se compararon todos los tratamientos entre ellos y a los diferentes tiempos de medida.

TABLA 1

*Evolución del área durante el estudio (Ver figura 1)*

Tiempo (días)	Área (cm <sup>2</sup> )			
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
0	0,32 ± 0,04	0,31±0,04	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,01
1	0,32 ± 0,05	0,30±0,04	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,01
3	0,31 ± 0,04	0,29±0,04	0,24 ± 0,03†	0,24 ± 0,02†
8	0,21 ± 0,03*	0,21±0,04*	0,21 ± 0,03*	0,17 ± 0,01*†
10	0,18 ± 0,04*	0,14±0,04*†	0,15 ± 0,03*	0,14 ± 0,02*†
14	0,12 ± 0,04*	0,08±0,05*†	0,08 ± 0,04*	0,11 ± 0,01*
17	0,04 ± 0,02*	0,01±0,01*†	0,02 ± 0,02*	0,05±0,01*
18	0,01±0,01*	0,01 ± 0,01*	0,01 ± 0,02*	0,03 ± 0,01*

\* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

## ES 2 357 601 A1

TABLA 2

*Evolución de la reducción de las úlceras (Ver figura 2)*

% de reducción de la úlcera				
Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2†	Grupo 3	Grupo 4
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
1	-0,63 ± 7,63	4,14 ± 9,95	2,65 ± 6,38	6,78 ± 0,74
3	3,01 ± 6,87	7,60 ± 9,17†	7,47 ± 6,45†	9,78 ± 4,42† *
8	32,80 ± 7,26*	33,62 ± 11,02*	16,56 ± 8,21*†	36,94 ± 2,81*
10	42,16 ± 10,72*	56,81 ± 10,77*	41,74 ± 9,83*	48,57 ± 6,42*
14	61,46 ± 12,6*2	73,74 ± 13,77*†	67,65 ± 14,74*	56,35 ± 4,95*
17	88,56 ± 6,34*	95,22 ± 3,41*†	90,82 ± 7,96*	79,70 ± 4,84*
18	95,95 ± 4,02*	97,88 ± 3,06*†	94,23 ± 6,78*	88,90 ± 3,72*†

\*Diferencias significativas con respecto al valor basal.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

### 5.3.- Evaluación histopatológica

En la piel de los animales de este experimento, se ha valorado la presencia de células inflamatorias, el tejido de granulación, constituido principalmente por fibroblastos y matriz extracelular, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la reepitelización de la úlcera creada.

A cada corte se le dio una puntuación histológica en el rango grado I a grado V, donde I significa herida sin curar y V herida completamente epitelizada. La puntuación se basa en el grado de invasión celular, la formación de tejido de granulación, vascularización y epitelización. Además, a cada muestra se le ha asignado un valor del 1 al 15 correspondiente a la valoración realizada por Greenhalgh y col. en función del grosor del tejido de granulación, angiogénesis, el infiltrado celular y la reepitelización.

Grado	Puntuación	Descripción
I	1-3	Acumulación celular de ninguna a mínima, ausencia de tejido de granulación o desarrollo epitelial.
II	4-6	Tejido de granulación fino e inmaduro dominado por células inflamatorias pero con pocos fibroblastos, capilares o deposición de colágeno; migración epitelial mínima.
III	7-9	Tejido de granulación moderadamente grueso. Puede variar de estar dominado por células inflamatorias a mayor presencia de fibroblastos y deposición de colágenos, neovascularización extensiva, migración epitelial mínima a moderada.
IV	10-12	Tejido de granulación grueso y vascular dominado por fibroblastos y deposición extensiva de colágeno, el epitelio cubre la herida parcial o totalmente.
V	13-15	Área correspondiente a la herida totalmente epitelizado, sin presentar, más o menos, rastros de la herida.

## ES 2 357 601 A1

Las puntuaciones histopatológicas obtenidas para los distintos grupos se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 3

*Porcentajes del Grado obtenido dentro de cada Grupo*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Grupo	Grado	Nº de animales	Porcentaje (%)
1	I	0	0
	II	7	58
	III	3	25
	IV	2	17
	V	0	0
2	I	3	33
	II	2	22
	III	2	22
	IV	2	22
	V	0	0
3	I	1	9
	II	1	9
	III	1	9
	IV	8	73
	V	0	0
4	I	1	25
	II	1	25
	III	0	0
	IV	2	50
	V	0	0

50

En ninguna de las muestras analizadas se ha observado una recuperación completa del epitelio y una maduración del tejido fibroso con retracción cicatricial por lo que no se ha alcanzado el grado V.

55

La mayoría de los animales del grupo 1 presentan un grado II de lesión, con un tejido de granulación fino e inmaduro. En tres casos, la lesión alcanzó el grado III y en dos el grado IV.

60

El grupo 2 fue el que presentó el mayor número de animales con un grado I de recuperación, ya que además de los tres sacrificados antes, también lo presentaron otros tres. El resto de las muestras se distribuyeron igual en los grados II, III y IV, con dos animales en cada grupo.

65

Por el contrario, el grupo 3 fue el que presentó el mayor número de animales con el grado de recuperación más elevado, el grado IV. El grado I estuvo constituido por los animales sacrificados más tempranamente más otro animal (animal 46 que se retira del estudio estadístico de los resultados. Sólo dos muestras fueron de grado II y otra de grado III.

Por último, el grupo 4 presentó una distribución más regular de las muestras en los tres grados. Sólo un animal más, además de los tres sacrificados antes presentó una menor recuperación de la lesión con un grado I. Dos muestras presentaron un grado de recuperación mayor (grado IV) y una un grado III.

## ES 2 357 601 A1

TABLA 4

*Resultados del estudio histológico. Medias de los grupos*

	Células inflamatorias	Tejido granulación	Cociente TG/Cl	Neovascularización	Reepitelización	Puntuación Greenhalgh
GRUPO 1	1,66±0,78	2,16±1,11	1,30	1,67±0,65	2,58±0,90	7,08±2,68
GRUPO 2	1,67±1,00	1,67±0,87	1,00	0,77±0,67†	1,33±0,87†	6,22±3,07
GRUPO 3	1,45±0,69	2,64±0,67	1,82†	1,27±0,65	2,45±1,29	9,82±3,09†
GRUPO 4	1,00±0,00	2,50±1,29	2,50†	2,00±1,15	2,50±1,29	7,00±4,76

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

Las medias encontradas en los grupos tratados, muestran que el infiltrado inflamatorio fue leve- moderado en todos ellos, de manera que los valores se situaron entre 1,00 del grupo 4 y 1,45 del grupo 3. En cuando al tejido de granulación, las medias de los grupos 3 y 4 fueron superiores a los demás, sobre todo a las del grupo 2.

El significado de estos hallazgos es un estadio más avanzado de recuperación en los grupos 3 y 4, ya que el infiltrado inflamatorio está siendo sustituido por fibroblastos cada vez más maduros y matriz extracelular elaborada por estos, que van a formar parte de la cicatriz. Al contrario, los grupos 1 y 2 presentaron una cantidad de células inflamatorias mayor y similar a la de fibroblastos, que aquí son más inmaduros y con menor cantidad de matriz extracelular (el cociente tejido de granulación/células inflamatorias es 1,00 frente al 2,5 del grupo 4 o a 1,82 del grupo 3).

La neovascularización alcanzó los valores más elevados en el grupo 4, donde la media fue de 2,00 (moderada). También la vascularización es un fenómeno temprano en el proceso inflamatorio, aunque perdura más en el tiempo que la presencia de células inflamatorias y contribuye al proceso cicatricial.

Por último, la recuperación del epitelio fue entre moderada y severa en todos los grupos como lo demuestra que los valores medios se sitúen entre 2 y 2,5. La excepción la constituyó el grupo 2 donde se observó un mayor retraso en el cierre de la úlcera, con una recuperación entre leve y moderada (media 1,33).

La puntuación de Greenhalgh, tiene en cuenta sobre todo el tamaño de la reacción celular y la composición de ésta. Mayores grados significan una mayor maduración de la lesión hasta la recuperación completa. En el grupo 3 se ha observado una reepitelización muy avanzada en varias muestras y la formación de un tejido conjuntivo grueso y maduro debajo de este epitelio neoformado, sobre todo en los animales con grado IV.

En conclusión, el grupo 3 es el que presenta el mayor estadio de recuperación, con un valor medio de 9,82 según la gradación de Greenhalgh, seguido de los grupos 1,4 y 2. Sin embargo, es el grupo 2 el que presenta mayor número de muestras con un infiltrado celular poco grueso o constituido mayoritariamente por células inflamatorias y menor recuperación del epitelio.

Los resultados obtenidos, tanto de la evolución de la herida por medición de su área como del estado histológico de la piel el último día del estudio, muestran que la reducción de las heridas es significativa ( $p < 0,05$ ) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera en los grupos 1-3, mientras que en el grupo 4 lo es a partir del día 3, sin embargo, los grupos 1-3 alcanzan valores de reducción de las heridas superiores al 90% a partir del día 18 mientras que el grupo 4 no.

El grupo 2 muestra una mayor reducción del área de la herida y un menor tiempo necesario para ello respecto al resto de los grupos, sin embargo, este grupo fue el que presentó el mayor número de animales con un grado I de recuperación histológica y presentó mayor número de muestras con un infiltrado celular poco grueso o constituido mayoritariamente por células inflamatorias con menor recuperación del epitelio.

Por el contrario, el grupo 3 fue el que presentó el mayor número de animales con el grado de recuperación más elevado, el grado IV, observándose una reepitelización muy avanzada en varias muestras y la formación de un tejido conjuntivo grueso y maduro debajo de este epitelio neoformado.

Ejemplo 9

*Estudio En Ratones Diabéticos Por Vía Parenteral*

5 *Sujetos de estudio*

La investigación se ha llevado a cabo con 50 ratones machos, cepa *BKS.Cg-m+/+Lepr db/j*, con un peso medio de 46,67±2,76 gramos. Todos los animales fueron sometidos a una exhaustiva evaluación clínica previa para excluir los animales con algún tipo de signo patológico como descarga nasal, diarreas, etc. Dicha evaluación incluyó la auscultación de frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, calidad del pulso, color de las mucosas, tiempo de relleno capilar y temperatura rectal.

Transcurridos diez días de aclimatación, en el animalario del centro, fueron identificados mediante un sistema de código de colores y así fueron distribuidos aleatoriamente en cinco grupos de estudio.

15

*Diseño del estudio y descripción de las intervenciones*

El primer día del ensayo se anestesiaron los animales con anestesia inhalatoria con isoflurano al 2% en oxígeno al 100% con un flujo de gas fresco de 2 L/min. Se rasuró el lomo del animal, se limpió la zona con desinfectante y se marcó la situación de la herida, mediante plantilla para igualar su posición en todos los animales. La herida se realizó mediante una incisión circular de 0,6 cm de diámetro mediante un punch de biopsia cutánea, extirpándose la piel de la zona media dorsal. Posteriormente se colocó una lámina de silicona de 1,2 mm de grosor con una apertura central circular de 12 mm de diámetro interno la cual se adhirió a la piel con cianoacrilato y se fijó con 4 puntos de nylon 6/0 para minimizar y evitar la retracción de la piel. La zona de la herida se tapó con un apósito semipermeable. Se administró por vía i.p. 0,5 mL/animal de suero fisiológico después de la intervención.

Durante los 7 días posteriores a la intervención se administró analgesia (Paracetamol, 1 mg/mL) en el agua de bebida.

30

Al día siguiente y durante un total de 38 días, los animales se medicaron con los tratamientos asignados a la dosis de 10 mg/Kg siendo el volumen de administración 0,5 mL/ratón por vía subcutánea en el lomo del animal, evitando la zona de la herida. En función de los valores de áreas obtenidos se valoró la continuación o el cese del tratamiento. En nuestro caso consideramos apropiado sacrificar a los animales a los 38 días del estudio.

35

Se realizó el seguimiento de los animales durante un período de 38 días valorándose macroscópicamente la evolución de las heridas 2 veces por semana. La valoración se realizó mediante fotografía digital de la herida y análisis posterior de la imagen. Se registró también el peso corporal de los animales dos veces por semana.

40 Se utilizó como área basal la medida realizada inmediatamente después de la intervención.

Tras la última medida se sacrificaron los animales. La zona de la piel dónde se produjo la herida se conservó hasta su procesamiento: una mitad en formol para realizar una evaluación histopatológica (tinción hematoxilina-eosina) y la otra mitad se congeló en nitrógeno líquido para la determinación de citoquinas conservando las muestras posteriormente en congelador (-80 ± 5°C). Todas las muestras conservada en formol fueron enviadas para su posterior análisis.

Para este ejemplo se escogieron 5 grupos:

50

Grupo 1: Control:	10 ratones
Grupo 2: Ejemplo 3	10 ratones
Grupo 3: Ejemplo 4	10 ratones
Grupo 4: Ejemplo 5	10 ratones
Grupo 5: Ejemplo 6	10 ratones

55

60

65 La selección de los ratones incluidas en cada grupo se realizó al azar.

## ES 2 357 601 A1

### *Evaluación de los resultados*

Los resultados obtenidos se han comparado y analizado utilizando el programa estadístico SPSS 15.0 statistical package for Windows, SPSS Inc, Chicago, Illinois. Empleando un test de ANOVA para medidas repetidas seguido de un test de Tukey. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Se compararon todos los tratamientos entre ellos y a los diferentes tiempos de medida.

TABLA 5

*Evolución del área durante el estudio (Ver figura 3)*

	Área (cm <sup>2</sup> )				
Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	0,28±0,02	0,29±0,01	0,28±0,01	0,27±0,03	0,29±0,03
1	0,26±0,02	0,27±0,01	0,26±0,02	0,25±0,03	0,28±0,03
3	0,26±0,02	0,26±0,02	0,25±0,03	0,24±0,03	0,26±0,03
8	0,23±0,02	0,25±0,02	0,21±0,03	0,22±0,03	0,23±0,02
10	0,18±0,04*	0,22±0,02*	0,18±0,04*	0,19±0,04*	0,17±0,06*
14	0,16±0,04*	0,19±0,05*	0,15±0,06*	0,18±0,03*	0,14±0,07*
17	0,15±0,06*	0,19±0,06*	0,14±0,07*	0,18±0,03*	0,14±0,07*
21	0,13±0,07*	0,17±0,08*	0,10±0,07*†	0,14±0,05*	0,10±0,06*†
24	0,12±0,08*	0,15±0,08*	0,07±0,08*†	0,11±0,05*	0,08±0,06*†
28	0,06±0,07*	0,09±0,07*	0,04±0,06*†	0,05±0,06*	0,02±0,02*†
31	0,03±0,05*	0,04±0,05*	0,01±0,01*†	0,04±0,06*	0,00±0,01*†
35	0,01±0,02*	0,01±0,02*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*
38	0,00±0,01*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*	0,00±0,00*



# ES 2 357 601 A1

TABLA 6

*Evolución de la reducción de las úlceras (Ver figura 4)*

5

10

15

20

25

30

35

	% de reducción de la úlcera				
Tiempo (días)	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1	7,16±4,27	5,70±3,32	6,78±3,26	6,42±3,93	4,45±5,28
3	8,35±4,05	9,36±4,31	11,70±6,75	9,53±3,34	9,87±6,91
8	17,59±7,55	13,18±6,20	24,75±10,07*†	15,87±5,95	19,10±8,86
10	34,50±12,94*	22,73±7,06	35,69±12,76*	28,38±11,96*	39,20±22,03*
14	42,00±15,16*	32,62±17,81*	46,23±22,75*	33,84±12,27*	49,27±25,96*
17	46,53±21,95*	32,87±21,81*	49,42±23,66*	33,59±11,35*	50,43±25,45*
21	53,82±26,75*	41,88±27,59*	64,59±25,74*†	45,92±20,80*	62,66±24,01*†
24	57,62±28,24*	48,26±27,89*	76,12±26,11*†	59,55±20,03*	71,61±21,72*†
28	78,12±24,26*	68,61±25,01*	84,74±20,30*†	78,52±22,46*	91,77±8,76*†
31	88,49±16,18*	85,08±18,18*	96,58±5,46*†	86,11±22,09*	98,45±2,08*†
35	95,03±7,09*	96,28±6,36*	99,13±1,54*	99,45±0,97*	99,91±0,28*
38	97,91±6,09*	99,51±1,47*	100,00±0,00*	100,00±0,00*	100,00±0,00*

40

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales muertos y el animal 31.

\* Diferencias significativas con respecto al valor basal.

45

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

## *Evaluación histopatológica*

50

En la piel de los animales de este experimento, se ha valorado la presencia de células inflamatorias, el tejido de granulación, constituido principalmente por fibroblastos y matriz extracelular, la formación de nuevos vasos sanguíneos y la reepitelización de la úlcera creada. Además, a cada muestra se le ha asignado un valor del 1 al 15 correspondiente a la valoración realizada por Greenhalgh y col. en función del grosor del tejido de granulación, angiogénesis, el infiltrado celular y la reepitelización.

55

En los grupos se han encontrado animales con distintos grados de lesión, su número y porcentaje queda reflejado en la tabla 7.

60

65

## ES 2 357 601 A1

TABLA 7

*Porcentajes del grado obtenido dentro de cada Grupo*

Grupo	Grado	Nº de animales	Porcentaje (%)
1	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
	IV	1	10
	V	9	90
2	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
	IV	2	22
	V	7	78
3	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
	IV	4	44
	V	5	56
4	I	0	0
	II	0	0
	III	0	0
	IV	4	44
	V	5	56
5	I	0	0
	II	0	0
	III	1	10
	IV	3	30
	V	6	60

### 40 Grado I

Según este criterio, un grado I de lesión corresponde con la ausencia de respuesta inflamatoria o de tejido de granulación sin recuperación del epitelio de la epidermis. En ninguno de los grupos estudiados se ha observado este grado.

### Grado II

Tampoco se han encontrado muestras con un grado II, que sería aquel en el que el tejido de granulación es fino e inmaduro y dominado por células inflamatorias con pocos fibroblastos y matriz extracelular y con escasa recuperación del epitelio de la epidermis.

### 55 Grado III

En cambio, si aparece un animal con un grado III en el grupo 5 (muestra 41R). El tejido de granulación es moderadamente grueso y con un componente elevado de células inflamatorias, sobre todo en la dermis, en forma de pequeños granulomas formados principalmente por neutrófilos con presencia de macrófagos y células gigantes multinucleadas. También se observaron fibroblastos y matriz extracelular, pero en menor cantidad. Aparece una recuperación moderada de la úlcera, con reepitelización de ésta y formación de pústulas con neutrófilos sobre la epidermis. La presencia de un aumento en el número de vasos es moderada.

### 65 Grado IV

En grado IV es observado en 14 animales pertenecientes a los cinco grupos del estudio, aunque sobre todo en los grupos 3 y 4.

## ES 2 357 601 A1

Este grado se caracteriza por un tejido de granulación grueso y vascular y está formado predominantemente por gran cantidad de fibroblastos tanto jóvenes, con grandes núcleos y citoplasmas alargados como más maduros con núcleos pequeños y citoplasmas más amplios. Así mismo, aparecen extensos depósitos de matriz extracelular. En estas muestras, en la dermis no se observan anexos cutáneos como folículos pilosos o glándulas sebáceas dado este proceso de fibrosis.

La presencia de células inflamatorias se mantiene en todas las muestras, aunque su valor es entre leve y moderado y aparece en forma de pústulas constituidas por neutrófilos. En un caso del grupo 1 es más severo dado el mayor tamaño de las pústulas. El infiltrado de la dermis lo componen sobre todo macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.

La presencia de neovasos en las muestras de este grado es mayoritariamente leve, siendo moderada en dos casos (grupos 1 y 4) y no se observa en otros tres de los grupos 3,4 y 5, ya que la mayor parte del tejido de granulación está constituido por los fibroblastos y la matriz extracelular.

El epitelio en este grado se ha recuperado de forma parcial o casi totalmente, quedando sólo algunos restos de la ulceración en un animal del grupo 1, uno del grupo 3 y dos del grupo 4.

En estas muestras, la inflamación se sitúa sobre todo en las capas córneas de la epidermis en forma de pústulas, mientras que en la dermis, la presencia de mayor cantidad de tejido fibroso que de componente inflamatorio significa un proceso de cronificación, con una reparación de la lesión que se evidencia en la reepitelización de la úlcera. El número de vasos también se reduce a medida que evoluciona el proceso de fibrosis de la herida.

### Grado V

La mayoría de las muestras de este estudio se incluyeron en el grado V. En este grado, el área de la herida estaba totalmente epitelizada excepto en el animal R7 del grupo 1 y tan sólo en algunos casos se observa la presencia de escasas células inflamatorias, un ligero aumento del tejido conjuntivo de la dermis (moderado en dos casos del grupo 1 y uno del grupo 3) o una hiperplasia de la epidermis. En muchas ocasiones se han recuperado también los anexos cutáneos.

El aumento en el número de vasos, o no se observa o es mínimo en todos los animales de este grado.

La maduración de los fibroblastos, la desaparición de las células inflamatorias y la reducción de los vasos junto con la reparación completa de la epidermis sería el paso final de la recuperación.

### Descripción por grupos:

En casi todos los animales de todos los grupos, el epitelio se encuentra totalmente recuperado y las lesiones que se observan son de grado leve o moderado, siendo fundamentalmente, un aumento del tejido fibroso situado debajo de la epidermis con una presencia más o menos numerosa de células inflamatorias. La epidermis está aumentada de grosor y existe una disminución en el número de anexos cutáneos, tanto folículos pilosos como glándulas sebáceas asociadas a ellos.

El grupo 1 es el que presenta una mayor recuperación de la ulceración ya que 9 de los 10 animales se encuentran en el grupo V de la clasificación de Greenhalgh. En todas las muestras excepto en la R3, el epitelio está completo, la presencia de células inflamatorias es escasa y tan sólo se observa un aumento del grosor del tejido conjuntivo y también un ligero aumento del número de vasos en la dermis. Sólo la muestra R3 se aleja un poco de esta imagen, con una mayor presencia de células inflamatorias que dan lugar a la formación de pústulas sobre la capa cornea de la epidermis y una pérdida del epitelio que no recubre totalmente la úlcera.

En el grupo 2 todos los animales presentan una recuperación completa del epitelio en la zona de la lesión. Sin embargo, la presencia de las células inflamatorias es mayor que en el grupo anterior, así como el tejido conjuntivo y la matriz extracelular. La neovascularización es ligera y está sólo presente en algunas de las muestras estudiadas.

En el grupo 3 también el epitelio está recuperado en la mayoría de los animales, pero es donde se observa una mayor presencia de células inflamatorias en las muestras y también mayor cantidad de tejido de granulación en la dermis. La neovascularización sigue siendo leve. El número de animales incluidos en el grupo IV y V de la clasificación de Greenhalgh es similar (4/5).

Del mismo modo, en el grupo 4, las muestras observadas presentan un grado de lesión similar a las del grupo 3, con cuatro animales incluidos en el grupo IV y cinco en el grupo V de la clasificación de Greenhalgh. También hay presencia entre leve y moderada de células inflamatorias y siempre leve de tejido de granulación maduro.

En el grupo 5, excepto en la muestra R41 en la que se observa una severa inflamación en la dermis en forma de pequeños granulomas, en el resto, la recuperación es muy evidente, de manera que en seis de las muestras, la piel está prácticamente normal.

## ES 2 357 601 A1

En el animal R41, la inflamación parece estar más asociada a una infección secundaria que a la presencia de células de recuperación de la ulceración por la disposición de éstas y la presencia de células gigantes multinucleadas.

En conclusión, el grupo más recuperado es el 1, junto con el 2 y el 5 (si excluimos el animal 41) y el que presenta la menor recuperación es el grupo 3, aunque en todos ellos, es muy evidente la reducción de la lesión y la reepitelización de la úlcera.

TABLA 8

*Resultados del estudio histológico*

	Células inflamatorias	Tejido granulación	Cociente TG/CI	Neovascularización	Reepitelización	Puntuación Greenhalgh
GRUPO 1	0,90±0,87	1,30±0,48	1,44	1,00±0,47	3,80±0,42	14,30±1,06
GRUPO 2	0,89±0,78	1,00±0,71	1,12	0,55±0,53	4,00±0,00	13,44±1,67
GRUPO 3	1,11±0,60	0,89±0,93	0,80†	0,33±0,50	3,89±0,33	13,00±1,58
GRUPO 4	1,00±0,87	0,89±0,33	0,89†	0,44±0,73	3,78±0,44	12,89±1,83
GRUPO 5	0,70±1,06†	1,00±0,47	1,43	0,50±0,71	3,80±0,63	12,90±2,68

Nota: El cálculo de las medias corresponden a los animales que han llegado al final del tratamiento, excluyendo los animales muertos y el animal 31.

† Diferencias significativas con respecto a los grupos.

Las medias encontradas en los grupos tratados, muestran que el infiltrado inflamatorio fue leve en todos ellos, de manera que los valores se situaron entre 0,70 del grupo 1 y 1,11 del grupo 3. El significado de estos hallazgos es un estadio muy avanzado de recuperación en todos los grupos aunque menor en los grupos 3 y 4 que presentaron un cociente tejido de granulación/células inflamatorias de 0,80-0,89 frente al 1,43 del grupo 5.

La neovascularización encontrada fue leve en todos los grupos ya que la vascularización es un fenómeno temprano en el proceso inflamatorio que contribuye al proceso cicatricial. Por último, la recuperación del epitelio fue entre severa y muy severa en todos los grupos como lo demuestra que los valores medios se sitúen entre 3,8 y 4,0. Se observó por tanto un cierre elevado de la úlcera.

La puntuación de Greenhalgh, tiene en cuenta sobre todo el tamaño de la reacción celular y la composición de ésta. Mayores grados significan una mayor maduración de la lesión hasta la recuperación completa.

En los grupos 1, 2 y 5 predomina el tejido de granulación sobre el componente inflamatorio y son los grupos que presentan el mayor valor en la puntuación de Greenhalgh. La reepitelización es similar en los tres grupos aunque en el 2 todas las muestras presentan la recuperación completa del epitelio.

En todos los grupos se ha observado una reepitelización muy avanzada y la formación de un tejido conjuntivo grueso y maduro debajo de este epitelio neoformado.

En conclusión, los grupos más recuperados son el 1, 2 y el 5 (si excluimos el animal 41) y el que presenta la menor recuperación es el grupo 3, aunque en todos ellos, es muy evidente la reducción de la lesión y la reepitelización de la úlcera.

Los resultados obtenidos, de la evolución de la herida por medición de su área, muestran que la reducción de las heridas es significativo ( $p < 0,05$ ) a partir del día 8 tras la creación de la úlcera en el grupo 3, a partir del día 10 para los grupos 1,4 y 5 y a partir del día 14 para el grupo 2. El grupo 5 alcanza valores de reducción de las heridas superiores al 90% a partir del día 28, el grupo 3 a partir del día 31 mientras que el resto de los grupos grupo no consigue esta reducción hasta el día 35 tras la creación de la úlcera.

El grupo 3 y el grupo 5 muestran en menor tiempo una mayor reducción del área de la herida que el resto de los grupos. Sin embargo, el grupo 3 fue el grupo donde se observa una mayor presencia de células inflamatorias en las muestras y también mayor cantidad de tejido de granulación en la dermis con menor recuperación del epitelio.

## ES 2 357 601 A1

Los grupos 2 y 5 fueron los que presentaron un mayor grado de recuperación histológica, aunque en todos los grupos es muy evidente la reducción de la lesión y la reepitelización de la úlcera.

5 En conjunto el grupo 5 es el que muestra mejores resultados de reducción de la herida y de recuperación histológica del epitelio.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 357 601 A1

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de nitroderivados de heparinas que comprende la etapa de hacer reaccionar primero la heparina con un haluro de amonio cuaternario, obteniendo una sal de amonio cuaternario de heparina, y a continuación hacer reaccionar la sal de amonio cuaternario de heparina obtenida:

a) o bien con una mezcla nitrante en un medio orgánico; o

b) con un compuesto halonitroalifático o halonitroaromático en un medio orgánico,

para producir un nitroderivado de heparina que tiene grupos  $-\text{ONO}_2$  unidos covalentemente a la estructura sacáridica.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el haluro de amonio cuaternario es un haluro de benzalconio o de bencetonio.

3. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2 en el que la mezcla nitrante de la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en anhídrido acético-ácido nítrico, ácido sulfúrico-ácido nítrico, y ácido fosfórico-ácido nítrico.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la mezcla nitrante de la etapa a) es anhídrido acético-ácido nítrico.

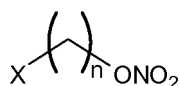
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la relación molar entre el anhídrido acético y el ácido nítrico varía entre 0,3 y 15.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la relación molar entre el anhídrido acético y el ácido nítrico varía entre 0,5 y 2,5.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el medio orgánico de la etapa a) se selecciona entre diclorometano y formamida.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la temperatura de reacción está comprendida entre  $-15^\circ\text{C}$  y  $+5^\circ\text{C}$ .

9. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2 anteriores, en el que el compuesto halonitroalifático o halonitroaromático de la etapa b) tiene la fórmula:



donde X es un halógeno y n es un número entero comprendido entre 1 y 20.

10. Procedimiento según la reivindicación 9 anterior, en el que n está comprendido entre 2 y 6.

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9-10 anteriores en el que el medio orgánico de la etapa b) se selecciona del grupo que consiste en diclorometano, cloroformo, dimetilformamida y formamida.

12. Procedimiento según la reivindicación 11 anterior en el que el medio orgánico es diclorometano.

13. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9-12 anteriores en el que la relación molar entre el compuesto halonitroalifático o halonitroaromático y la heparina está entre 1 y 10.

14. Procedimiento según la reivindicación 13 anterior, en el que la relación molar entre el compuesto halonitroalifático o halonitroaromático y la heparina está entre 3 y 8.

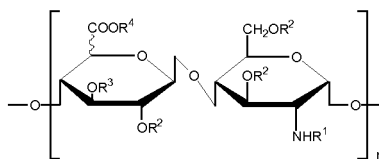
15. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9-14 anteriores en el que la temperatura de reacción está comprendida entre  $+20^\circ\text{C}$  y  $+45^\circ\text{C}$ .

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 anteriores en el que la heparina se selecciona del grupo que consiste en heparinas no fraccionadas (HNF), heparinas de bajo peso molecular (HBPM) y heparinas de muy bajo peso molecular (HMBPM).

## ES 2 357 601 A1

17. Compuesto nitroderivado de heparina obtenido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 **caracterizado** porque comprende una unidad disacáridica repetitiva con la siguiente fórmula de Markush:

5



15

donde  $R^1$  es  $\text{SO}_3\text{M}$ ,  $\text{COCH}_3$  o  $\text{H}$ ,  $R^2$  es  $\text{SO}_3\text{M}$ ,  $\text{H}$  o  $\text{NO}_2$ ,  $R^3$  es  $\text{H}$  o  $\text{NO}_2$  y  $R^4$  es  $\text{M}$  o  $(\text{CH}_2)_m\text{ONO}_2$ , siendo  $\text{M}$  un metal alcalino o alcalino-térreo,  $m$  un número entero comprendido entre 1 y 20, y  $n$  un número entero comprendido entre 1 y 66.

20

18. Uso de un nitroderivado de heparina obtenido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-16 anteriores en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras crónicas.

25

19. Uso según la reivindicación 18 anterior en el que las úlceras crónicas son úlceras de pie diabético, úlceras por presión o úlceras provocadas por quemaduras.

30

35

40

45

50

55

60

65

70

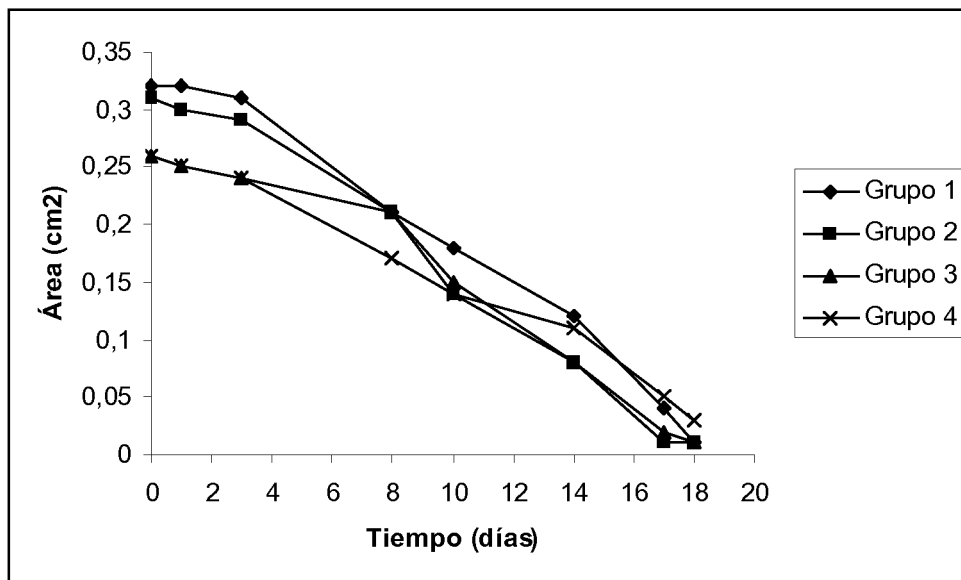


FIGURA 1

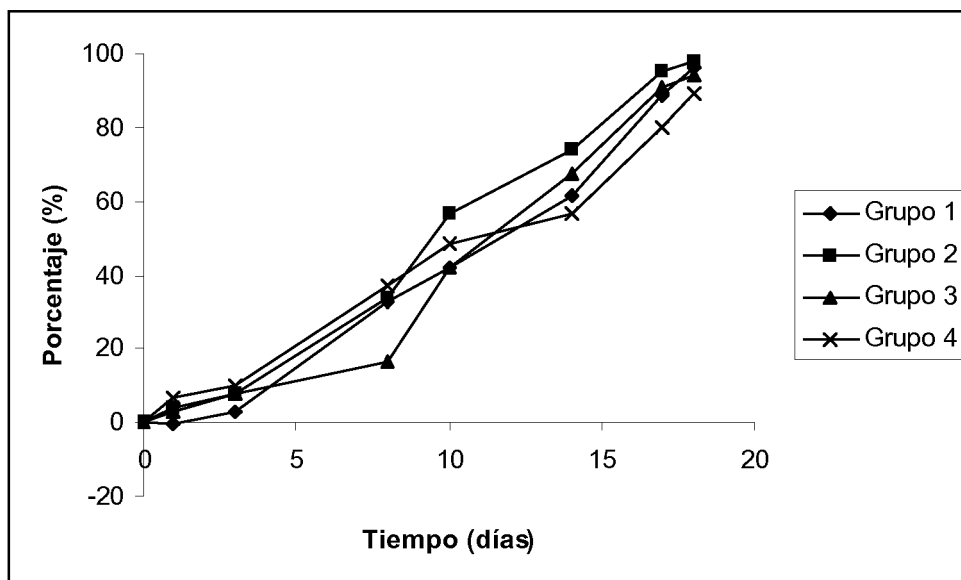


FIGURA 2



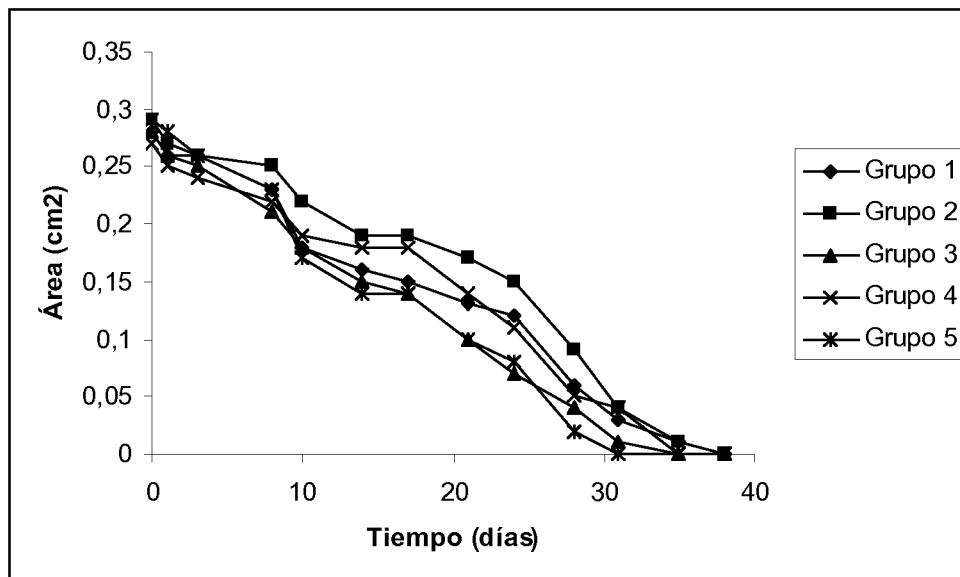


FIGURA 3

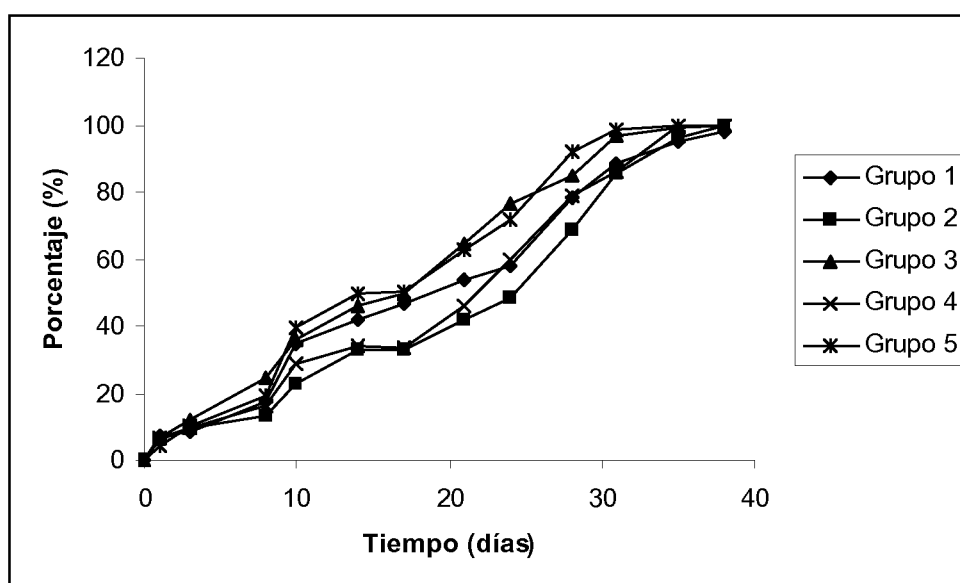


FIGURA 4



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130087

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.01.2011

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2003072612 A1 (NICOX S.A.) 04.09.2003, página 3, párrafo 5 y fórmula I; página 4, párrafo 1; página 5, párrafo 4 – página 6, párrafo 2; reivindicaciones 1,5.	17-19
X	WO 2003072611 A1 (NICOX S.A.) 04.09.2003, reivindicaciones.	17-19
A	EP 1375524 A1 (CHEMI, S.p.A.) 02.01.2004, párrafos [0011]-[0014].	1-19
A	WO 2010/000904 A1 (LABORATORIOS ROVI, S.A.) 07.01.2010, página 1, líneas 6-10; página 2, fórmula 1.	1-19
A	KALANI, M. et al. "Effect of Dalteparin on Healing of Chronic Foot Ulcers in Diabetic Patients With Peripheral Arterial Occlusive Disease". Diabetes Care 2003, Volumen 26, Número 9, páginas 2575-2580. Ver página 2575, objetivo y resultados.	1-19

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
28.03.2011

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C08B37/10** (2006.01)

**A61K31/727** (2006.01)

**A61P17/02** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C08B, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES,EPODOC,WPI,REGISTRY,CAPLUS,BIOSIS,MEDLINE,EMBASE,NPL,XPESP,PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.03.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 17-19	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 17-19	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

### 1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2003072612 A1	04.09.2003
D02	WO 2003072611 A1	04.09.2003
D03	EP 1375524 A1	02.01.2004

### 2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un procedimiento para la preparación de nitroderivados de heparinas que comprende la reacción de la heparina con un haluro de amonio cuaternario y la posterior nitración de la sal de amonio cuaternario de heparina obtenida; el compuesto nitroderivado de heparina así preparado; y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de úlceras crónicas.

#### **Novedad** (Artículo 6.1 de la Ley de Patentes):

El documento D01 divulga **heparinas** de bajo peso molecular (entre 3000 y 6000 D) que contienen grupos nitro (-ONO<sub>2</sub>) unidos covalentemente a la estructura sacárida (ver página 3, párrafo 5 y fórmula I; reivindicación 1), bien directamente o a través de un radical divalente que actúa como espaciador entre el sacárido y el grupo nitro, como puede ser un radical alifático C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> (ver página 5, párrafo 4). Las posiciones preferidas para la introducción de los radicales que portan el grupo nitro son el CH<sub>2</sub>OH en posición 6 de la hexosamina desulfatada (R<sub>2</sub> en la fórmula de la invención), el CHOH en posición 3 de la hexosamina y del ácido urónico (R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>, respectivamente, en el compuesto de la invención), el grupo carboxilo del ácido urónico (R<sub>4</sub> en la fórmula de la invención), CHOH en posición 2 del ácido urónico desulfatado (R<sub>2</sub> en la invención) y el NH<sub>2</sub> de la hexosamina desulfatada (R<sub>1</sub> en el compuesto de la invención) (ver reivindicación 5).

Estos compuestos se obtienen por nitración directa mediante una mezcla nitrante, como puede ser ácido sulfúrico-ácido nítrico, ácido fosfórico-ácido nítrico o anhídrido acético-ácido nítrico en proporciones entre 1:1,4 y 1:1,6 (ver página 5, párrafo 6-página 6, párrafo 2), y son útiles para el tratamiento de patologías asociadas con disfunciones del sistema cardiovascular y hemostático, tales como disfunciones endoteliales de carácter inflamatorio asociadas a la diabetes (página 4, párrafo 1).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **17-19** no es nuevo según lo divulgado en el documento D01.

De igual modo, el documento D02 divulga nitroderivados de heparina, en este caso de **oligosacáridos** (heparinas de pesos moleculares comprendidos entre 1200 y 3000 D), obtenidos mediante el mismo procedimiento y con la misma aplicación farmacológica (ver reivindicaciones).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones **17-19** no presenta novedad a la luz de lo divulgado en el documento D02.

El documento D03 divulga un procedimiento para la preparación de ésteres de heparina en los que los grupos carboxílicos están esterificados total o parcialmente, por medio de la sustitución parcial o total de los átomos de hidrógeno o de los cationes que forman las sales de dichos grupos carboxílicos por un radical R-CH<sub>2</sub>, donde R (equivalente a R<sub>4</sub> en el compuesto de la invención) es un grupo alifático sustituido por un grupo nitro (ver párrafo [0011]). Estos compuestos, sin embargo, se diferencian de los compuestos de la invención (en los que R<sub>4</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONO<sub>2</sub>) en que el sustituyente nitrogenado de los compuestos divulgados en D02 es NO<sub>2</sub> en lugar de ONO<sub>2</sub>.

Por tanto, no se ha encontrado en el estado de la técnica divulgación o sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia la invención recogida en las reivindicaciones 1-16, que se refieren a un procedimiento de obtención de compuestos nitroderivados de heparina que transcurre a través de una sal de amonio cuaternario de heparina.

En consecuencia, se considera que el objeto de las reivindicaciones **1-16** reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva recogidos en los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.