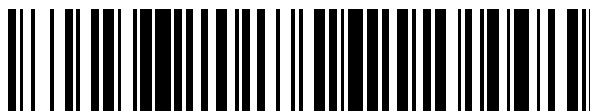


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 476**

51 Int. Cl.:

C07H 5/10 (2006.01)

A61K 8/60 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12724633 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2714705**

54 Título: **Sacarosas octasulfatos de magnesio, su preparación y sus aplicaciones farmacéuticas y cosméticas**

30 Prioridad:

31.05.2011 FR 1154752

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

20.07.2015

73 Titular/es:

**PIERRE FABRE DERMO-COSMÉTIQUE (100.0%)
45, place Abel-Gance
92100 Boulogne-Billancourt, FR**

72 Inventor/es:

**JEULIN, SÉVERINE;
HERNANDEZ-PIGEON, HÉLÈNE y
AGUILAR, LUC**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 541 476 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

Sacarosas octasulfatos de magnesio, su preparación y sus aplicaciones farmacéuticas y cosméticas.

5 La presente invención se refiere a unas sacarosas octasulfatos de magnesio, a su procedimiento de preparación y a su utilización en el campo farmacéutico y/o cosmético.

10 Los oligosacáridos son unos glúcidos cuya hidrólisis produce únicamente unos azúcares simples (osas). Están constituidos por la unión de por lo menos dos moléculas de azúcares simples. Entre los oligosacáridos, se encuentran la sacarosa formada por condensación de dos osas: una molécula de glucosa y una molécula de fructosa.

15 Los oligosacáridos sulfatados son conocidos en la bibliografía y poseen múltiples actividades biológicas, cosméticas y/o terapéuticas.

Por ejemplo, la solicitud WO 2006/017752 describe un método de tratamiento de las inflamaciones de las vías aéreas que utiliza unos oligosacáridos sulfatados como sustancias activas. Entre éstos se encuentra, en particular, un oligosacárido procedente de la condensación de la glucosa y de la fructosa y totalmente sulfatado.

20 El documento US nº 5.767.104 describe unos oligosacáridos sulfatados, principalmente la sacarosa octasulfato de aluminio, en el tratamiento de la alopecia.

25 Por otra parte, la sacarosa octasulfato se utiliza como principio activo en el tratamiento de las úlceras gástricas por sus propiedades reparadoras/cicatrizantes. El documento FR 2 646 604 describe unas formulaciones de sacarosa octasulfato de aluminio, o sucralfato, con propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes, destinadas al tratamiento de heridas u otras inflamaciones ulcerosas. El documento WO 1997/00476 describe un método de tratamiento de las lesiones y/o inflamaciones del aparato digestivo por administración de una sal de sacarosa sulfatada, más particularmente la sacarosa octasulfato de potasio o de sodio.

30 El documento FR 1 390 007 describe la utilización por vía tópica de formulaciones que contienen sucralfato en asociación con sulfato de cobre y de zinc como regeneradores de tejidos, cicatrizantes y calmantes.

35 Por último, el documento EP 0 230 023 así como el documento FR 2 916 355 describen la utilización de oligosacáridos polisulfatados, más particularmente de la sacarosa octasulfato de potasio, como agente que cura las heridas.

Otras utilizaciones de compuestos de este tipo se describen también en los documentos US nº 5.908.836, US nº 4.581.221 y EP 0 640 346.

40 Los problemas de cicatrización se encuentran en un gran número de patologías, de accidentes o aparecen tras operaciones quirúrgicas. Existe por lo tanto, permanentemente, una necesidad de composiciones alternativas que permitan mejorar la cicatrización y/o acelerarla.

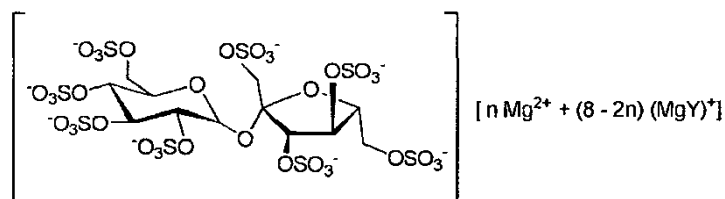
45 En la presente invención, los inventores han obtenido nuevos compuestos que tienen unas propiedades reparadoras, antimicrobianas y antirradicalarias sorprendentes. En efecto, de manera sorprendente, se ha demostrado que estos compuestos inducen la migración de los queratinocitos, la síntesis de ácido hialurónico, la diferenciación de los queratinocitos y la síntesis de péptidos antimicrobianos, al contrario de otras sacarosas octasulfatos metálicas. Así, estos compuestos permiten la reparación de la piel, la curación de heridas y favorecen la cicatrización, y de manera muy eficaz. Por otro lado, los inventores han demostrado que estos compuestos también se podían utilizar en cosmética para mantener el bienestar y la belleza de la piel.

55 La figura 1 representa la cantidad relativa de los ARNm de loricrina producidos por unos queratinocitos tratados durante 72h con sacarosa octasulfato de magnesio a 30 µM (SOS-Mg), sacarosa octasulfato de sodio a 30 µM (SOS-Na) o sacarosa octasulfato de magnesio a 30 µM (SOS-Mg) con respecto al control negativo.

La figura 2 representa la cantidad relativa de los ARNm de Padi1 producidos por unos queratinocitos tratados durante 72h con sacarosa octasulfato de magnesio a 30 µM (SOS-Mg), sacarosa octasulfato de sodio a 30 µM (SOS-Na) o sacarosa octasulfato de magnesio a 30 µM (SOS-Mg) con respecto al control negativo.

60 La figura 3 representa la cantidad relativa de los ARNm de hBD2 producidos por unos queratinocitos tratados durante 72h con sacarosa octasulfato de magnesio a 30 µM (SOS-Mg), sacarosa octasulfato de sodio a 30 µM (SOS-Na) o sacarosa octasulfato de magnesio a 30 µM (SOS-Mg) con respecto al control negativo.

65 La presente invención se refiere en particular a unos compuestos de fórmula general I siguiente,



Fórmula I

en la que:

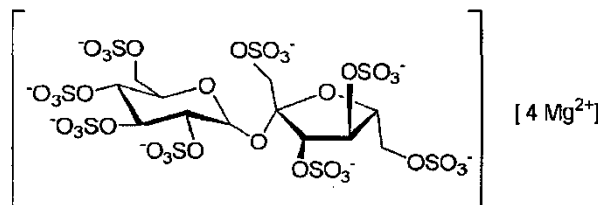
5

$$0 \leq n \leq 4$$

n es un número entero

Y representa OH, Cl, Br, I, NO₃, C₆H₅O₇, CH₃CO₂, CF₃CO₂ o -OCH₃.

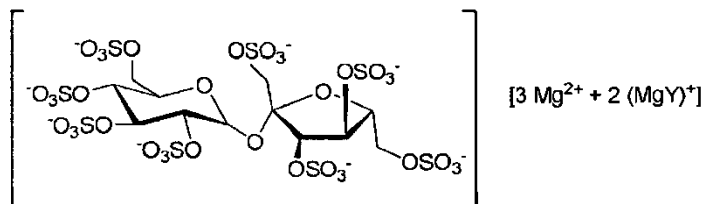
10 En un modo de realización de la invención, el compuesto de fórmula I según la invención es tal que n=4. Este compuesto está representado por la fórmula II siguiente.



Fórmula II

15

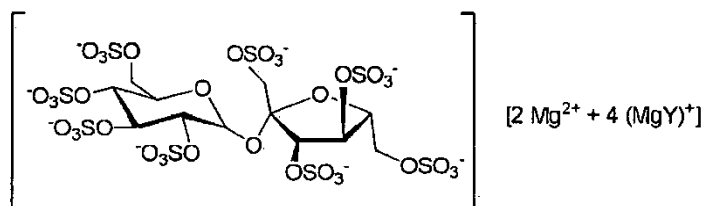
En otro modo de realización de la invención, el compuesto de fórmula I según la invención es tal que n=3. Este compuesto se representa mediante la fórmula III siguiente.



Fórmula III

20

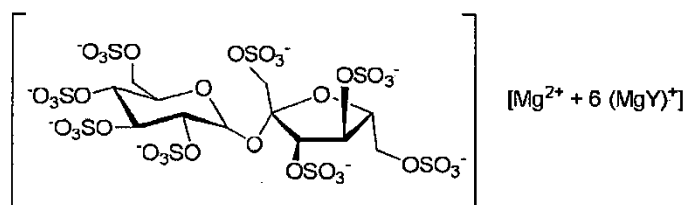
En otro modo de realización de la invención, el compuesto de fórmula I según la invención es tal que n=2. Este compuesto se representa mediante la fórmula IV siguiente.



Fórmula IV

25

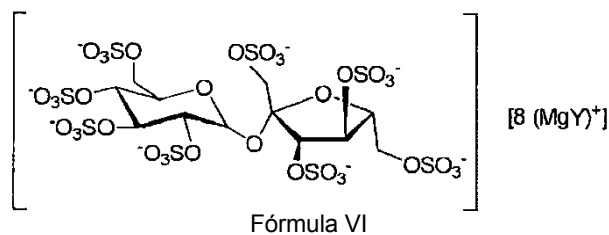
En otro modo de realización de la invención, el compuesto de fórmula I según la invención es tal que n=1. Este compuesto se representa mediante la fórmula V siguiente.



Fórmula V

30

En otro modo de realización de la invención, el compuesto de fórmula I según la invención es tal que $n=0$. Este compuesto se representa mediante la fórmula VI siguiente.



En este modo de realización de la invención, el compuesto de fórmula VI corresponde a un compuesto de fórmula I en el que n es igual a 0.

En todas las fórmulas III a VI anteriores, Y representa OH , Cl , Br , I , NO_3 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, CH_3CO_2 , CF_3CO_2 o $-\text{OCH}_3$.

Preferentemente, el compuesto de fórmula I según la invención es tal que $n=4$.

En un modo de realización, el compuesto según la invención está en forma hidratada.

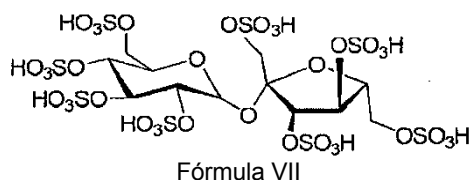
La presente invención se refiere además a un procedimiento de preparación de los compuestos según la invención.

En particular, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de los compuestos de fórmula I según la invención, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- 20
- a. puesta en contacto de la forma ácida de la sacarosa octasulfato en solución, preferentemente en solución acuosa tal como el agua, con una sal de magnesio para formar la sacarosa octasulfato de magnesio, y
 - 25 b. recuperación de la sacarosa octasulfato de magnesio así formada.

El procedimiento según la invención comprende por lo tanto una primera etapa a. en la que la forma ácida de la sacarosa octasulfato en solución se pone en contacto con una sal de magnesio.

Por sacarosa octasulfato en forma ácida, se entiende la sacarosa octasulfato de fórmula VII siguiente:



Mediante la expresión "puesta en contacto" según la invención, se entiende la puesta en presencia de la sacarosa octasulfato en forma ácida y de una sal de magnesio en unas condiciones que permiten su complejación. Preferentemente, la sal de magnesio está disuelta en la solución de sacarosa octasulfato en forma ácida. Las cantidades relativas de sacarosa octasulfato en forma ácida y de la sal de magnesio en la solución se seleccionan de manera que se obtenga el compuesto de fórmula I deseado.

El tiempo de contacto entre la sacarosa octasulfato en forma ácida y la sal de magnesio se podrá determinar mediante unos ensayos habituales y dependerá en particular de la naturaleza de la sal de magnesio utilizada. Cuando la sal utilizada es el hidróxido de magnesio, el tiempo de contacto estará preferentemente comprendido entre 8 y 15 horas.

La puesta en contacto se realizará preferentemente bajo agitación, por ejemplo con la ayuda de un agitador magnético.

La "sal de magnesio" según la invención se selecciona preferentemente de entre las sales minerales de magnesio tales como, por ejemplo $\text{Mg}(\text{OH})_2$, MgCl_2 , MgBr_2 , MgI_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ o $\text{Mg}(\text{BF}_4)_2$, o una sal orgánica de magnesio, seleccionada de entre $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Mg}(\text{CF}_3\text{CO}_2)_2$, $\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$ o $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{O})_2$. Preferentemente, la sal de magnesio según la invención es el hidróxido de magnesio $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

La mezcla obtenida después de la etapa a. podrá eventualmente ser filtrada, en particular para suprimir eventuales sales de magnesio restantes.

El procedimiento según la invención comprende una segunda etapa b. en la que se recupera la sacarosa octasulfato de magnesio obtenida en la etapa a.

5 Por recuperación según la invención, se entiende preferentemente la obtención de un sólido de sacarosa octasulfato de magnesio, eventualmente un cristal.

10 Los métodos que permiten recuperar un sólido de este tipo son bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo la recuperación según la invención se podrá realizar por extracción/precipitación mediante la adición de un disolvente a la mezcla obtenida en la etapa a. Alternativamente, es posible recuperar el sólido directamente por liofilización de una solución acuosa obtenida en la etapa a. En un modo de realización preferido, el disolvente se añade a la solución acuosa obtenida en la etapa a. y se mezcla con ésta. Después, se decanta el conjunto. La fase menos densa que contiene el cristal se recupera después. Esta fase se lavará preferentemente con agua y después se liofilizará con el fin de obtener la sacarosa octasulfato de calcio en forma sólida.

15 En un modo de realización, el pH de la solución obtenida en la etapa a. se ajusta a pH básico, por ejemplo a pH 8.

20 Con el fin de aumentar el rendimiento de la precipitación y la pureza del compuesto obtenido, la fase densa obtenida después de la decantación se podrá disolver en agua y después precipitar de nuevo en el disolvente. Esta puesta en solución y re-extracción en el disolvente se podrán realizar tantas veces como sea necesario para obtener la pureza y el rendimiento deseado en sacarosa octasulfato de magnesio. Dicho procedimiento de recuperación de la sacarosa octasulfato de calcio está descrito en particular en los ejemplos.

25 El disolvente será preferentemente un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos tales como por ejemplo la acetona, el etanol, el acetato de etilo, la metilisobutilcetona o la metiletilcetona, preferentemente la acetona o el etanol.

Las etapas a. y b. se realizan preferentemente en la oscuridad.

30 La forma ácida de la sacarosa octasulfato en solución utilizada en la etapa a. del procedimiento según la invención se podrá obtener de cualquier manera conocida por el experto en la materia. Preferentemente, la sacarosa octasulfato en forma sólida se obtendrá a partir de una sal de sacarosa octasulfato.

35 En un modo de realización preferido, la sacarosa octasulfato en forma ácida se obtiene a partir de una sal de sacarosa octasulfato realizando las etapas siguientes:

a1. disolución en una solución, preferentemente acuosa tal como el agua, de una sal de sacarosa octasulfato,

40 a2. desalificación de la solución de sal de sacarosa octasulfato así obtenida para formar la forma ácida de la sacarosa octasulfato en solución.

45 La "sal de sacarosa octasulfato" según la invención se puede seleccionar de entre todas las sales de sacarosa octasulfato existentes, tal como por ejemplo las sales de metales alcalinos (tal como por ejemplo el potasio, el sodio, el litio, etc.). Preferentemente, la sal de sacarosa octasulfato es la sacarosa octasulfato de potasio o también la sacarosa octasulfato de sodio.

La etapa a1. permite la obtención de una solución de sal de sacarosa octasulfato.

50 Por "disolución" de la sal de sacarosa octasulfato se entiende la puesta en solución de dicho compuesto. El experto en la materia puede estimar fácilmente el volumen de solución, preferentemente acuosa tal como el agua, a añadir para solubilizar totalmente la cantidad de sal de sacarosa octasulfato deseada y para obtener una solución a la concentración requerida (por ejemplo entre 0,01 M y 1 M). La disolución se realiza preferentemente por agitación de la sal en una solución acuosa, tal como el agua, por ejemplo gracias a un agitador magnético.

55 El procedimiento según la invención puede comprender también una etapa a2. en la que se desalifica la sal disuelta obtenida en la etapa a1.

60 Por "desalificación" se entiende la disociación en la sal de sacarosa octasulfato de la forma ácida de la sacarosa octasulfato y del catión. Esta etapa de desalificación está seguida por la recuperación de la forma ácida de la sacarosa octasulfato. Esta etapa se puede realizar mediante todas las técnicas conocidas por el experto en la materia, en particular por paso sobre una columna intercambiadora de iones.

65 El paso sobre una columna intercambiadora de iones de la solución que contiene la sacarosa octasulfato ácida se puede efectuar varias veces con el fin de eliminar el conjunto de los cationes que le están originalmente asociados.

La columna intercambiadora de iones contiene preferentemente una resina intercambiadora de cationes. En un

modo de realización de la invención, la resina intercambiadora de cationes es una resina de tipo ácido sulfónico (por ejemplo la Amberlite™).

5 En un modo de realización preferido, el procedimiento según la invención comprenderá o consistirá en las etapas siguientes:

a1. disolución en una solución de una sal de sacarosa octasulfato,

10 a2. desalificación de la solución de sal de sacarosa octasulfato así obtenida para formar la forma ácida de la sacarosa octasulfato en solución,

a. puesta en contacto de la forma ácida de la sacarosa octasulfato en solución con una sal de magnesio para formar la sacarosa octasulfato de magnesio, y

15 b. precipitación de la sacarosa octasulfato de magnesio así formada.

En otro modo de realización, la sacarosa octasulfato de magnesio se obtiene directamente a partir del sucralfato. El sucralfato se sulfata en primer lugar, por ejemplo en la piridina, y después se pone en presencia de una base fuerte, tal como la (Mg(OH)₂) por ejemplo.

20 La presente invención se refiere, además, a unas composiciones que comprenden uno o varios compuestos según la invención, y por lo menos un excipiente farmacéutica o cosmetológicamente aceptable.

25 La invención tiene también por objeto un dispositivo médico que comprende uno o varios compuestos según la invención, y un excipiente farmacéutica o cosmetológicamente aceptable.

Preferentemente, la composición según la invención o el dispositivo médico según la invención contendrán solamente un solo tipo de compuesto d fórmula I, preferentemente el compuesto de fórmula II.

30 El "excipiente" según la invención podrá, por ejemplo, estar solo o en asociación con uno o varios tensioactivos, uno o varios disolventes, uno o varios polímeros hidrosolubles, uno o varios espesantes o gelificantes, uno o varios conservantes, uno o varios antibacterianos, uno o varios antisépticos, uno o varios agentes cicatrizantes, uno o varios agentes antioxidantes, uno o varios agentes emolientes y/o hidratantes, uno o varios pigmentos, uno o varios perfumes y/o uno o varios colorantes, unos agentes de ajuste del pH tales como las sales, unos ácidos, unas bases.

35 Por "farmacéutica y/o cosmetológicamente aceptable" según la invención, se refiere a unas entidades moleculares y a unas composiciones que no producen ningún efecto adverso, alérgico u otra reacción indeseable cuando se administran a un animal o a un ser humano.

40 La composición exacta y la forma de la composición según la invención podrán ser determinadas por el experto en la materia en función de la utilización y la vía de administración previstas para la composición.

45 La composición según la invención se formulará preferentemente de manera que pueda ser administrada por vía tópica u oral.

Por "administración por vía tópica" según la invención, se entienden en particular las aplicaciones cutáneas, las aplicaciones bucales (mucosa bucal), las aplicaciones genitales (mucosas anal, vaginal).

50 Por "administración por vía oral" según la invención, se entienden en particular las administraciones por ingestión (de las cuales gástricas).

55 Cuando la composición se formula de manera que pueda ser administrada por vía tópica, estará preferentemente en una forma que permita una aplicación facilitada tal como un polvo, una leche, una crema, un bálsamo, un aceite, una loción, un gel, una espuma, un gel espumante, una pomada, un spray, una pasta, un parche, etc. Alternativamente, cuando se consideran las vías de administración anal o vaginal, la composición según la invención podrá estar entonces en forma de supositorio, óvulo o cápsula.

60 Cuando la composición se formula de manera que pueda ser administrada en forma oral, estará preferentemente en forma de una goma, de una pastilla, de un comprimido, de un azúcar cocido, de un gel para beber, de un polvo para disolver, de una venda gástrica, etc.

65 Las dosificaciones de los compuestos según la invención en las composiciones se determinarán en particular en función de la cantidad de sustancia activa necesaria para obtener la respuesta terapéutica y/o cosmética deseada, en función del modo de administración considerado y de la duración del tratamiento deseado.

En un modo de realización, la composición según la invención presenta un contenido en sacarosa octasulfato de

magnesio según la fórmula general I comprendida entre 0,1 y 30% en peso. Preferentemente, la composición según la invención, por ejemplo para una aplicación tópica, comprenderá entre 0,5 y 7%, aún más preferentemente entre 0,5 y 5% en peso de sacarosa octasulfato de calcio.

5 La composición según la invención podrá comprender además por lo menos otro principio activo, preferentemente otro cicatrizante, un antidolor, un agente antirradicalario, un antiséptico y/o un antiinflamatorio.

La presente invención se refiere, además, a unos compuestos según la invención o a unas composiciones según la invención para su utilización como medicamentos.

10 La presente invención se refiere, además, a la utilización de un compuesto o de una composición según la invención para la fabricación de un medicamento.

15 La presente invención se refiere, además, a un método de tratamiento que comprende la administración a un paciente que lo necesite, de una dosis eficaz de compuestos o composiciones según la invención.

20 Preferentemente, los compuestos o composiciones según la invención se utilizan para el tratamiento de la piel, de las mucosas o de los órganos, aún más preferentemente para favorecer la cicatrización de la piel, de las mucosas o de los órganos y/o para protegerlos de infecciones microbianas y/o para luchar contra unas infecciones microbianas y/o para luchar contra la inflamación.

Por "cicatrización" según la invención, se entienden en particular los fenómenos de regeneración y de consolidación de los tejidos o de los órganos con el fin de rellenar una lesión.

25 Por "favorecer la cicatrización" se entiende en particular que la cicatrización se realiza más rápida y/o más eficazmente (ausencia o disminución de las cicatrices, etc.) en presencia del compuesto o de una composición según la invención.

30 Preferentemente, la utilización según la invención se referirá a la cicatrización de las heridas agudas o crónicas y de las quemaduras.

35 La expresión "herida aguda o crónica" según la invención comprende en particular los arañazos, las raspaduras, los rasguños, los cortes, los aftas, las diversas heridas de la esfera bucal, el acné cicatricial, las ampollas, las queilitis, el eczema, los eritemas glúteo, las dermatoporosis, las úlceras, por ejemplo gástrica o de la pierna, las escaras, las heridas del diabético (en particular de los pies), las irritaciones diversas, las dermatitis o las cicatrices tras la cirugía o tras acción de dermatología estética (láser, depilación, exfoliación, inyección).

40 El término "quemadura" según la invención, comprende las quemaduras de cualquier origen, de las cuales las quemaduras térmicas, mecánicas, químicas o debido a radiaciones. Las quemaduras según la invención pueden ser en particular las radiodermitis, las quemaduras consecutivas a quemaduras de Sol o debidas al calor, las cicatrices crioterapia, las cicatrices tras la cirugía o tras acción de dermatología estética (láser, depilación, exfoliación).

45 Por "infección microbiana" se entienden todas las infecciones cutáneas o de las mucosas, ya se deban a bacterias, levaduras, hongos o virus. Las composiciones según la invención se pueden utilizar con un objetivo preventivo para evitar la aparición de una infección microbiana o con objetivo terapéutico para luchar contra una infección microbiana ya existente.

50 Por "inflamación" se entiende una reacción de la defensa inmunitaria del cuerpo a una agresión caracterizada en particular por una rojez, una hinchazón, una sensación de calor y de dolor. La presente invención se refiere particularmente al tratamiento de los estados inflamatorios de la piel.

55 La cantidad de sacarosa octasulfato a administrar a un paciente dependerá de la patología a tratar y del modo de administración. Por ejemplo, cuando se considera una aplicación gástrica, la sacarosa octasulfato de calcio se podrá administrar a una dosis de 1 a 10 g/día, la sacarosa octasulfato de calcio se podrá administrar a una dosis de 1 a 10 g/día, preferentemente de 2 a 6 g/día.

La presente invención se refiere, además, a la utilización de un compuesto o de una composición cosmética según la invención para mejorar el aspecto de la piel.

60 Por "mejorar el aspecto de la piel" según la invención, se entiende la mejora estética o de bienestar de un estado de la piel y/o de las mucosas.

65 La degradación estética del estado de la piel o de su bienestar se puede deber por ejemplo a la edad, a las condiciones exteriores o a las variaciones de peso. Por ejemplo, la composición cosmética según la invención podrá permitir restaurar la función de barrera de la piel, la hidratación de la piel, el aumento de su elasticidad y/o de su tonicidad y también la reducción de las estrías, de la celulitis o de las arrugas, así como la desaparición de las

manchas cutáneas.

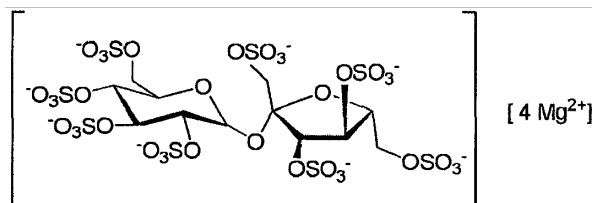
Alternativamente, el compuesto o la composición según la invención se podrán utilizar con el fin de prevenir el envejecimiento cutáneo.

5

Los ejemplos siguientes se proporcionan a título ilustrativo y no limitan el alcance de la invención.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Preparación del compuesto de fórmula II



15 Se coloca una solución de sacarosa octasulfato de potasio (1,50 g; 1,16 mmol, 1,00 eq., 99%) en agua (40 ml) en un matraz de 100 ml. La solución se pasa a través de una columna (Φ 40x500 mm) que contiene 250 g de resina intercambiadora de iones de Amberlite IR 120 H con un caudal de 1 ml/min a 0°C. La fracción ácida (120 ml; pH \leq 1,5) se recoge y se neutraliza inmediatamente por adición de hidróxido de magnesio a pH = 10,23. La mezcla resultante se deja bajo agitación durante una noche (aprox. 12 h) a temperatura ambiente y a pH = 9,84.

20 Después, la mezcla se filtra y se añaden 700 ml de acetona al filtrado. La mezcla resultante se deja en reposo durante una noche. El sobrenadante se decanta y el sirope restante se disuelve en 15 ml de agua desmineralizada, y se añaden 200 ml de acetona a la solución. La mezcla resultante se deja en reposo durante 3 horas y se decanta el sobrenadante. Esta operación se repite 3 veces. Después, el sirope se disuelve en 30 ml de agua, y se liofiliza la mezcla. Se obtiene un sólido blanco de sacarosa octasulfato de magnesio (0,50 g; 40%).

25

Todas estas etapas se realizaron en la oscuridad envolviendo el medio de reacción con papel de aluminio.

Caracterización del compuesto de fórmula II obtenido:

30 El espectro RMN del compuesto de fórmula II obtenido es el siguiente: RMN ^1H (D_2O , 300 MHz, ppm): δ : 4,13-4,42 (m, 9 H); 4,52 (m, 1 H); 4,63 (m, 2 H); 5,04 (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H); 5,73 (d, $J = 3,3$ Hz, 1 H).

35 Por otra parte, se efectúa una dosificación de la sacarosa octasulfato y del magnesio contenido en el compuesto II obtenido (SOS-Mg). Se realiza la misma dosificación en unas muestras de control que tienen una concentración en Mg o en sacarosa octasulfato conocida: el MgCl_2 y la sacarosa octasulfato de potasio (SOS-K). La dosificación se realiza de la siguiente manera:

Solución estándar y preparación de las muestras:

40 - 5,2 mg de MgCl_2 (pureza: 97%) pesados con precisión en un frasco con indicador de nivel de 10 ml y disueltos completamente en una solución acuosa al 0,05% en TFA, siendo la concentración final de 0,504 mg/ml.

45 - 12,1 mg de SOS-K (contenido en agua: 8,82%) pesados con precisión en un frasco con indicador de nivel de 10 ml y disueltos completamente en una solución acuosa al 0,05% en TFA, siendo la concentración final de 1,21 mg/ml.

50 - 16,1 mg de SOS-Mg pesados con precisión en un frasco con indicador de nivel de 10 ml y disueltos completamente en una solución acuosa al 0,05% en TFA, siendo la concentración final de 1,61 mg/ml. Se diluye una muestra de 8,0 ml con una solución acuosa al 0,05% en TFA en un frasco con indicador de nivel de 10 ml, para el análisis de la sacarosa octasulfato en SOS-Mg.

Análisis por HPLC:

55 Las muestras SOS-Ca, SOS-K y CaCl_2 así obtenidas son caracterizadas por HPLC gracias al material y a las condiciones siguientes: columna: Atlantis T3 (4,6*100 mm; 3,0 μm), temperatura de la columna: 30°C, caudal: 0,6 ml/min, volumen de inyección: 5 μl para el análisis de Mg en SOS-Mg, 20 μl para el análisis de SOS en SOS-Mg detección: ELSD (temperatura "tubo de transferencia" = 50°C; caudal gaseoso = 2,0 l/min, fase móvil A: 0,05% TFA/agua, fase móvil B: 0,05%/acetónitrilo (gradiente: T0 A: 100%, T2 A: 100%, T5 A: 5%, B: 95%).

Los resultados obtenidos en cuanto al contenido en magnesio y en sacarosa octasulfato se representan en las tablas 1 y 2 siguientes:

5 Tabla 1: Estimación de la concentración en Mg de la muestra SOS-Mg a partir del estándar MgCl₂.

	Concentración (mg/ml)	Concentración en Mg (mg/ml)	Área del pico/contenido en Mg
MgCl ₂	0,504	0,1274	1116301
SOS-Mg	1,61	-	1164648

El cálculo de la concentración en Mg en la muestra de SOS-Mg permite obtener un valor de 3,3960 mmol/g.

10 Tabla 2: Estimación de la concentración en sacarosa octasulfato de la muestra SOS-Mg a partir del estándar SOS-K.

	Concentración en SOS (mg/ml)	Área del pico/contenido en SOS
SOS-K	0,1274	5322294
SOS-Mg	-	6637820

El cálculo de la concentración en SOS en la muestra de SOS-Mg permite obtener un valor de 0,8304 mmol/g.

15 Como se puede constatar, la relación magnesio/sacarosa octasulfato en el compuesto de fórmula II SOS-Mg obtenido es de 3,3961/0,8304, es decir de 4,09, lo cual corresponde bien a la relación esperada.

Ejemplo 2: Efecto de la sacarosa octasulfato de Mg sobre la migración de las células

20 La migración de las células epiteliales es una etapa importante del desarrollo y de los procesos de reparación de los tejidos, tales como la embriogénesis y la cicatrización.

Los mecanismos de iniciación, de coordinación y de parada de los movimientos de las células no están completamente elucidados, sin embargo, el papel primordial de la migración celular está bien establecido.

25 En la cicatrización cutánea y en las afecciones inflamatorias crónicas dermatológicas, los queratinocitos son "activados" para iniciar el proceso de migración. Las células ven entonces su fenotipo influenciado por las interacciones con la matriz extracelular por un lado y por las interacciones células-células por otro lado. Los queratinocitos del asiento basal de los contornos de una herida, migran sobre la herida y la recubren.

30 En efecto, los queratinocitos se activan en contacto con la fibronectina, con el colágeno dérmico intersticial (tipo 1), con el colágeno IV y con la laminina 5 de la lámina basal. Están también regulados por ciertos factores de crecimiento polipeptídicos como el TGFβ, el TGFα y el EGF. Además, unas citoquinas (IL1, TNFα) y quimioquinas (RANTES e IL-8) contribuyen también a aumentar la velocidad de re-epitelización de una herida, tras la activación queratinocitaria.

35 Con el fin de evaluar el impacto de la sacarosa octasulfato de magnesio sobre la migración celular de líneas de queratinocitos HaCAT, se han realizado unos estudios con la ayuda del Kit de migración celular Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies). Este estudio se llevó a cabo en paralelo con la sacarosa octasulfato de potasio, la sacarosa octasulfato de sodio para comparación.

- Material biológico

45 La línea de queratinocitos utilizada es la línea de queratinocitos humanos HaCaT, espontáneamente inmortalizados. Esta línea se cita frecuentemente como modelo de referencia en la bibliografía.

- Protocolo de migración celular

50 El protocolo utilizado para el estudio de la migración celular se basa en la utilización de un kit de 96 pocillos, Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies - TEBU), que permite la miniaturización y la cuantificación de este proceso celular.

55 El principio de este ensayo consiste en estudiar la migración celular hacia el centro del pocillo de la placa de 96 pocillos. Consiste en colocar un parador en unos pocillos, con el fin de crear una zona de detección de 2 mm de diámetro. Después retirar los paradores una vez que las células se han adherido bien a la superficie alrededor de éstos, y así, permitir que las células migren hacia la zona de detección. Las placas sin los paradores y con los principios activos se ponen a incubar a 37°C durante 24 horas en DMEM 0% SVF. Se analiza a continuación la cantidad de células situadas en la zona en la que estaba el parador, con el fin de evaluar la migración de las células.

Un protector permite visualizar y contabilizar únicamente las células situadas en esta zona. Para cada condición, se realiza la media de 4 a 8 pocillos.

- 5 Los productos ensayados en este estudio son la SOS-Mg obtenida en el ejemplo 1 a 10 µM, SOS-K a 10 µM (sacarosa octasulfato de potasio), SOS-Na a 10 µM (sacarosa octasulfato de sodio) y EGF como control positivo. Se realiza un control negativo en el que no se añade ningún compuesto al medio de cultivo (control 0% SVF).

Resultados

- 10 Se ensayó el efecto de las 3 sacarosas sobre la migración de las células HaCat.

Los resultados se cuantifican gracias a la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{IF tratado}}{\text{IF control 0\% SVF}} \times 100$$

- 15 - en IF (Intensidad de Fluorescencia, proporcional a la cantidad de las células que han migrado)
 - en porcentaje de actividad con respecto al control 0% SVF.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.

- 20 Tabla 3: Efecto de las 3 sacarosas sobre la migración de los queratinocitos.

	Control	EGF	SOS-Mg	SOS-Na	SOS-K
	0% SVF	33ng	10µM	10µM	10µM
MOY IF	5044 ± 1074	16138 ± 1548	7084 ± 662	4988 ± 965	5001 ± 835
% de actividad / control	100	320***	140*	99	99

* p<0,05 y *** p<0,001 con respecto al control 0% SVF.

- 25 De esta tabla se puede deducir que:

- El EGF a 33 ng/ml, control positivo de los presentes experimentos, induce la migración (y la proliferación) de los queratinocitos de manera muy importante y significativa.
 - 30 - A 10 µM, la sacarosa octasulfato de potasio y la sacarosa octasulfato de sodio no inducen la migración de los queratinocitos.
 - A 10 µM, la sacarosa octasulfato de magnesio (SOS-Mg) induce de manera estadísticamente significativa la migración de los queratinocitos. Esta migración es 1,4 veces más importante que la inducida por la SOS-Na y la SOS-K.
- 35

Ejemplo 3: Efecto de la sacarosa octasulfato de Mg sobre la diferenciación de las células.

40 La epidermis desempeña un papel protector importante, procurando una barrera química y mecánica para el cuerpo. Asegura el mantenimiento de la estanqueidad, a saber la función de barrera cutánea. Los corneocitos, queratinocitos de la capa córnea, asociados a una matriz lipídica, aseguran en gran parte esta función. Sin embargo, las capas más profundas intervienen en la colocación de los actores de esta función. La capacidad de diferenciación de los queratinocitos de la epidermis garantizará la colocación de una barrera de tipo permeabilidad selectiva funcional. El programa de diferenciación de los queratinocitos se regula de manera espaciotemporal, evolucionando desde las capas más profundas de la epidermis, capa basal la menos diferenciada, hacia la capa córnea, última fase de diferenciación de los queratinocitos en corneocitos. Desde un punto de vista celular y molecular, se pueden observar principalmente, la formación de los filamentos de queratina, la transformación de los queratinocitos en corneocitos o "cornificación" y la colocación de un cemento lipídico intercelular organizado en estructuras lamelares, que aseguran la estanqueidad y la función de barrera cutánea.

50 Desde un punto de vista proteico, la diferenciación epidérmica está mayoritariamente centrada sobre la evolución de proteínas de estructura que son las queratinas y que contribuyen a la integridad arquitectural de la epidermis. Su expresión varía en función del grado de maduración de los queratinocitos. La queratina 1 básica y la queratina 10 ácida, son unos marcadores precoces de la diferenciación queratinocitaria, presentes a partir de la capa basal de la epidermis. La expresión de otros marcadores de este proceso biológico, más tardía, puede ser seguida tal como la de las proteínas del revestimiento córneo, como la corneodesmosina (CDSN), las "small prolin rich protein 1" (SPRR1A y SPRR1B), la involucrina (IVL), así como algunas enzimas principales en el origen del puenteo de las proteínas de estructura entre sí y con unos lípidos queratinocitios, las transglutaminasas, tales como la transglutaminasa 1 (TGM1) o 3.

La formación de la matriz fibrosa presente en los corneocitos se inicia a nivel de la transición entre queratinocitos granulados y los corneocitos. La loricrina (LOR) es una proteína de estructura que contiene unos restos glutamina y lisina que permiten la fijación con otras proteínas del revestimiento córneo. Las moléculas básicas de filagrina (FLG) producidas a partir de su precursor la profilagrina (almacenada en los gránulos de queratohialina) se asocian a los filamentos de citoqueratina, permitiendo así su agregación. La filagrina se puede ser desaminada a continuación por las enzimas Peptidil Arginina Deiminasa (PAD) y en particular PAD1 y PAD3. La filagrina desaminada, ácida, se desata entonces de los filamentos intermediarios antes de ser completamente degradada, generando los aminoácidos que constituyen el factor natural de hidratación (FNH).

Paralelamente, la síntesis y el transporte de lípidos queratinocitarios son el origen del cemento lipídico intercorneocitario indispensable para la barrera cutánea, cuya formación representa la fase última de la diferenciación epidérmica terminal. Esta matriz lipídica extracelular proporciona la principal barrera a los movimientos transcutáneos de agua y de electrolitos. Así, un cierto número de enzimas y de transportadores lipídicos ven aumentada su expresión queratinocitaria con la diferenciación. Este cemento resulta de un equilibrio entre tres especies lipídicas, el colesterol, los ácidos grasos libres y las ceramidas. Estos lípidos se derivan de glucosilceramidas, esfingomielina, colesterol y fosfolípidos sintetizados en las capas espinosas y granuladas. Están transportados a través de los cuerpos lamelares, pequeñas vesículas secretoras que funcionan en la capa granulosa y vierten su contenido en la unión *stratum granulosum/stratum corneum*. Además de estos precursores lipídicos, los cuerpos lamelares contienen numerosas enzimas que incluyen unas hidrolasas lipídicas como la esfingomielinasa ácida (aSmasa), la beta-glucocerebrosidasa (GBA) o las fosfolipasas A2 (sPLA2) así como unas lipasas ácidas y neutras. Co-suministradas con los precursores lipídicos en los espacios celulares, estas enzimas convierten respectivamente la esfingomielina en ceramida, la beta-glucocerebrosidasa en ceramida y los fosfolípidos en ácidos grasos libres y glicerol. La glucosilceramida sintasa (UGCG) interviene también en la barrera lipídica de la piel permitiendo la síntesis de glucosilceramida. Su transcripción está aumentada durante el proceso de diferenciación.

La función de barrera de la piel incluye también una defensa contra los microorganismos. El epitelio desempeña un papel activo en las defensas innatas del hospedante. Los sistemas antimicrobianos cutáneos se basan entre otros en la presencia de ciertos lípidos de superficie (ácidos oleico y palmitoleico del sebo y de ciertas proteínas constitutivas que se expresan cada vez más en función del estado de diferenciación de los queratinocitos (ARNasa 7, proteinasa inhibidor 3). La ARNasa 7 y la proteinasa inhibidor 3 (PI3 o elafín) poseen unas actividades antimicrobianas. ARNasa 7 es un miembro de la familia de las ARNasa A y posee una actividad antimicrobiana de amplio espectro. Es capaz así de actuar contra unas bacterias Gram+ o Gram-.

Además, la acidificación de la superficie epidérmica desempeña un papel importante en la defensa antimicrobiana cutánea. La piel actúa así no sólo como una barrera física, sino también como una barrera química. Existe también una componente adaptativa de la inmunidad innata que se basa en la secreción inducible de péptidos antimicrobianos. Poseen unas actividades antimicrobianas directas contra unas bacterias variadas, virus y hongos con la capacidad de inhibir su crecimiento. Además, de por su acción quimiotáctica, estos péptidos antimicrobianos constituyen el enlace entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Desempeñan un papel importante como mediadores de la inflamación teniendo unos efectos sobre las células epiteliales e inflamatorias, influyendo la proliferación celular, la cicatrización, la producción de citoquinas, quimioquinas y la quimiotaxia. Los péptidos antimicrobianos se sintetizan generalmente en las capas superiores de la capa espinosa y de la capa granulosa, pero son activos en la capa córnea en la que se liberan. Su modo de acción consiste en romper la membrana plásmica de los microbios infecciosos o en penetrar el microorganismo con el fin de interferir con el metabolismo intracelular. Los péptidos antimicrobianos más estudiados en la piel son las β -defensinas y las catelicidinas.

Las β -defensinas humanas constituyen la clase principal de los péptidos antimicrobianos encontrados en los epitelios humanos y cuatro de ellas se han identificado en la piel, hBD 1-4. Aunque pertenecen a la misma familia, están reguladas por vías diferentes.

La β -defensina 2 humana (hBF-2 o DEFB4), un péptido de 4 kDa que se une a la heparina es uno de los principales péptidos antimicrobianos cutáneos. Sólo bacterioestático frente a *S. aureus*, hBD-2 posee una actividad antimicrobiana esencialmente dirigida contra las bacterias con Gram negativo.

La β -defensina 3 (hBD-3 o DEFB103A), un péptido antimicrobiano de 5 kDa presenta una actividad antimicrobiana de amplio espectro que incluye *Staphylococcus aureus*.

Se ha evaluado el efecto de la sacarosa octasulfato de magnesio y de las sacarosas octasulfato de potasio y de sodio sobre la regulación de dianas moleculares implicadas en los procesos de diferenciación queratinocitaria. Para ello, se han puesto unos queratinocitos humanos normales (NHK) en presencia de diferentes productos a ensayar y se ha medido la expresión de diferentes ARN que codifican unas proteínas implicadas en la colocación de las estructuras proteicas del revestimiento córneo, pero también en la síntesis lipídica o la expresión de péptidos antimicrobianos.

- Material biológico

La línea de queratinocitos utilizada es la línea de queratinocitos humanos primarios o NHK preparada a partir de colgajos cutáneos procedentes de desechos operatorios de cirugía estética (disminución mamaria). Las células se cultivan en medio KSFM (Invitrogen) con bajo contenido en magnesio (0,1 mM) complementado por 25 µg/ml de BPE (Bovin Pituitary Extract) y 1,5 ng/ml de EGF (Epithelium Growth Factor).

- Protocolo experimental

Los productos ensayados son la SOS-Mg a 10 µM, la SOS-Na a 10 µM, la SOS-K a 10 µM. En paralelo, los experimentos se realizan con la adición de CaCl₂ a 1,2 mM como control positivo. Se realiza un control negativo en el que no se añade ningún producto al medio de cultivo.

Los productos a ensayar se incuban con los queratinocitos durante 72 horas. Las células se recuperan después y se realiza un análisis de la expresión de genes dianas implicados en la diferenciación epidérmica mediante la tecnología Quantigène que permite cuantificar la expresión de los ARNm de interés.

Los valores obtenidos por el Quantigène se normalizan con respecto a la media geométrica de los 2 genes de referencia POL2RA y HPRT. La cantidad relativa se calcula con respecto al control. La regulación de la expresión del gen de interés se tiene en cuenta a partir de una QR (cantidad relativa) ≥ 1,9 (inducción) o de una QR ≤ 0,5 (inhibición).

Resultados

El efecto de las 3 sacarosas a diferentes concentraciones se ha ensayado sobre la diferenciación de los queratinocitos.

Se ha llevado a cabo un primer estudio sobre la expresión de 14 genes implicados en la diferenciación celular. Los resultados se resumen en la tabla 4. Los valores obtenidos están precisados para los genes cuya expresión se ha modificado mediante la adición de SOS-Mg, SOS-K o SOS-Na a 10 µM.

Tabla 4: Cantidades relativas (QR) de la expresión de ARNm en función del producto incubado con las células con respecto al control negativo.

	Concentración	DEFB103A	CDSN	RNASE7	UGCG
CaCl ₂	1,2 nM	18,7	1,3	4,5	3,1
SOS-Mg	10 µM	3,0	1,9	2,9	2,0
SOS-K	10 µM	2,3	1,5	2,4	1,8
SOS-Na	10 µM	0,9	0,7	1,6	1,1

Como se puede constatar en esta tabla:

- El calcio, control positivo de los presentes experimentos, ha inducido la expresión de 3 ARNm (DEFB103A, RNASE7 y UGCG).

La SOS-Mg a 10 µM ha inducido la expresión de 4 ARNm (DEFB103A, RNASE7, CDSN y UGCG). La actividad de la SOS-Mg sobre la expresión de la corneodesmosina (CDSN) indica que la SOS-Mg participa en la restauración de la barrera proteica. Su actividad sobre la expresión de UGCG indica su participación en la restauración de la barrera lipídica. Por otro lado, la inducción de la RNASE7 y de DEFB103A demuestra las propiedades antimicrobianas del compuesto SOS-Mg.

- La SOS-Na no ha inducido la expresión de ningún ARNm.
- La SOS-K a 10 µM ha inducido la expresión de DEFB103A, RNASE7, UGCG y de CDSN de manera menos importante que la SOS-Mg.

Se ha realizado un segundo estudio en las mismas condiciones, pero midiendo la expresión de un número más grande de genes (64 dianas implicadas en la diferenciación celular) por PCR en tiempo real.

Este estudio demuestra que la SOS-Mg a 30 µM ha inducido la expresión de 7 ARNm (FLG, IVL, SPRR1A, SPRR1B, LOR, Padi1 y hBD2). Estas inducciones demuestran el papel de la SOS-Mg en la inducción de la diferenciación de los queratinocitos y por lo tanto de la cicatrización (IVL, SPRR1A, SPRR1B y LOR), en la hidratación (Padi1) así como sus propiedades antimicrobianas (hBD2).

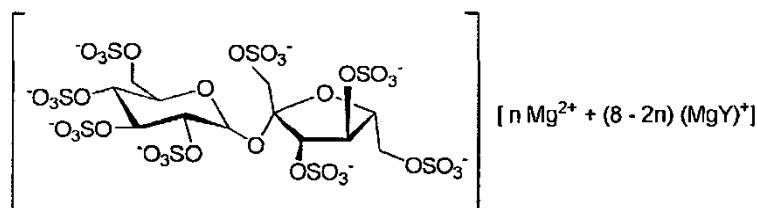
Con el fin de comparar los efectos de la SOS-Mg, la SOS-Na y la SOS-K en tres funciones importantes para la

cicatrización: diferenciación celular, hidratación y propiedades antimicrobianas, se han comparado la inducción de 3 genes, *loricrina*, *Padil* y *hBD2 (DEFB4)*, por la SOS-Mg, la SOS-Na y la SOS-K. Los resultados están representados en las figuras 1 a 3.

- 5 Se puede constatar que la loricrina, Padil y hBD2 (DEFB4) han sido inducidos de manera más importante por la SOS-Mg que la SOS-Na y la SOS-K. La SOS-Mg induce así la diferenciación de los queratinocitos y favorece la formación de una función de barrera física y antimicrobiana así como la hidratación cutánea.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general I



5

Fórmula I

en la que:

- 10 $0 \leq n \leq 4$
 n es un número entero
 Y representa OH, Cl, Br, I, NO₃, BF₄, C₆H₅O₇, CH₃CO₂, CF₃CO₂ o -OCH₃,

15 para su utilización para favorecer la cicatrización y/o para la prevención o el tratamiento de las infecciones microbianas.

2. Compuesto para su utilización según la reivindicación 1, caracterizado por que n=4.

20 3. Compuesto para su utilización según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que se trata de la cicatrización de las quemaduras y heridas agudas o crónicas.

25 4. Compuesto para su utilización según la reivindicación 3, caracterizado por que las quemaduras y heridas agudas o crónicas se deben a una quemadura por calor o una quemadura por exposición al Sol, una radiodermatitis, una irritación de origen diverso, una dermatitis, un arañazo, una raspadura, un rasguño, un corte, una úlcera, por ejemplo de pierna o gástrica, una escara, una herida del diabético, un afta, una herida de la esfera bucal de origen diverso, el acné cicatricial, una cicatriz de crioterapia, una cicatriz pos-cirugía o pos-acto de dermatología estética, una ampolla, una queilitis, eczema, un eritema glúteo o una dermatoporosis.

30 5. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto tal como el definido en la reivindicación 1 o 2, y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su utilización para favorecer la cicatrización y/o para la prevención o el tratamiento de las infecciones microbianas.

35 6. Composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 5, que contiene por lo menos otro principio activo.

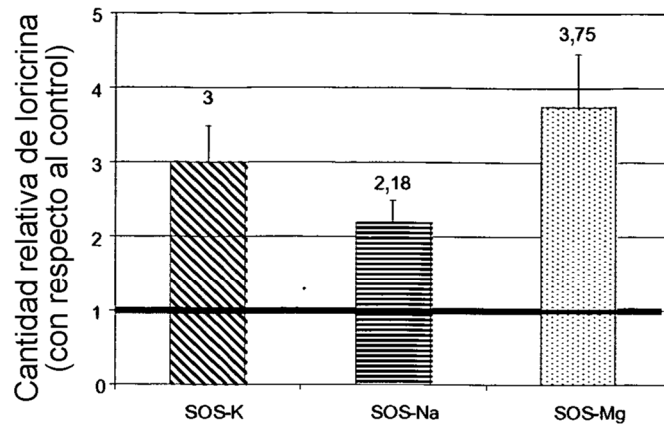


Figura 1

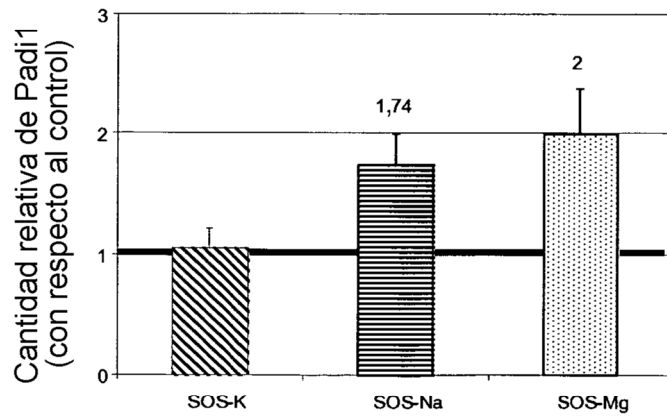


Figura 2

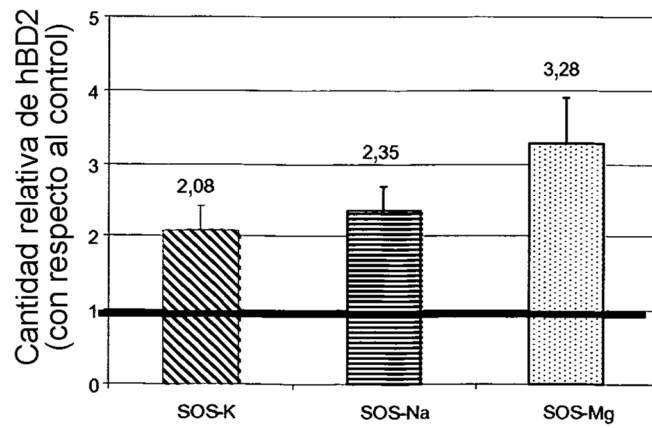


Figura 3