

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 303**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)  
**A61K 31/722** (2006.01)  
**A61K 31/711** (2006.01)  
**A61K 9/51** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**C12N 5/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013** **E 13197549 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2022** **EP 2745849**

54 Título: **Composición de polideoxirribonucleótidos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**19.12.2012 IT TO20121107**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2022**

73 Titular/es:

**HUMANA MEDICAL S.R.L. (100.0%)**  
**Via Grimani, 7/a**  
**35041 Battaglia Terme (PD), IT**

72 Inventor/es:

**ORNAGHI, OSCAR MARCO;**  
**BINOTTO, RADAMES;**  
**BINOTTO, RENZO y**  
**VALLANA, VALERIO**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 929 303 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Composición de polideoxirribonucleótidos y usos de los mismos

**5 CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente descripción se refiere a una composición con base en polideoxirribonucleótidos (PDRN) capaz de estimular la proliferación celular.

**10 ANTECEDENTES TECNOLÓGICOS**

Las sustancias y composiciones capaces de estimular la proliferación celular son de gran interés en el campo de la medicina regenerativa.

15 Tales composiciones encuentran aplicación, por ejemplo, en el tratamiento de laceraciones debidas a eventos traumáticos o heridas quirúrgicas.

Se conocen varias clases de sustancias que pueden promover el crecimiento de células activas en la regeneración de tejidos, tales como ácido hialurónico, ácido poliláctico, ácidos nucleicos, fracciones de ácidos nucleicos, incluyendo polideoxirribonucleótidos (PDRN).

En particular, los PDRN se utilizan en cirugía plástica debido a su capacidad para estimular el metabolismo de los fibroblastos y la producción de componentes de la matriz dérmica.

25 Los PDRN también son capaces de promover la angiogénesis en el tratamiento de heridas y quemaduras, para acelerar la curación de las microlesiones cutáneas y la producción de citoquinas y factores de crecimiento.

También se conoce el uso de composiciones con base en ácido desoxirribonucleico (ADN) extraído, por ejemplo, de tejido de gónadas de esturión y salificado como sal disódica, para obtener PDRN-Na.

30 Además de encontrar aplicación en enfermedades causadas por una deficiencia funcional de los procedimientos inmunitarios, la PDRN-Na tiene una capacidad inmunomoduladora que permite controlar la inflamación, optimizando el tejido re-Muzzarelli, Riccardo A. A. (2008), "Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone", Carbohydrate Polymers, 76, 167-182 revisa el uso de quitinas y quitosanos en la regeneración de tejidos.

35 Aunque se conocen sustancias capaces de estimular la regeneración de los tejidos, es de gran interés identificar nuevas sustancias o composiciones que puedan mejorar la capacidad proliferativa celular y ser utilizadas en las muy diversas aplicaciones de la medicina regenerativa tales como, por ejemplo, en la cirugía plástica, en el tratamiento de las complicaciones postoperatorias, en el tratamiento de las quemaduras, de las llagas relacionadas con el pie diabético, de las úlceras de decúbito, de las heridas abiertas tratadas con radioterapia que tienen alterada la cicatrización, de las manifestaciones psoriásicas.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

45 El objeto de la presente descripción es proporcionar una composición capaz de mejorar aún más la estimulación de la proliferación celular mediante los efectos sinérgicos ejercidos por sus componentes.

De acuerdo con la invención, el objeto anterior se logra mediante la solución recordada específicamente en las reivindicaciones anexas, que constituyen una parte integrante de la presente descripción.

50 Una realización de la presente descripción se refiere a una composición que comprende polideoxirribonucleótidos (PDRN) y quitosano, siendo los PDRN empleados en forma de sales.

55 Los resultados presentados a continuación muestran que la presencia de quitosano en la composición que comprende PDRN salificado determina un aumento considerable de la proliferación celular en comparación con el uso de composiciones que comprenden PDRN, pero sin quitosano.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ALGUNAS REALIZACIONES**

60 En la siguiente descripción, se dan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones. Las realizaciones pueden practicarse sin uno o más de los detalles específicos, o con otros procedimientos, componentes, materiales, etc. En otros casos, no se muestran ni se describen en detalle estructuras, materiales u operaciones bien conocidas para evitar que se oculten aspectos de las realizaciones.

65 La referencia a lo largo de la presente descripción a "una realización" significa que un aspecto, estructura o característica descrita en relación con la realización particular está incluida en al menos una realización. Por lo tanto,

las expresiones "en una realización" que aparecen en diversos lugares a lo largo de la presente descripción no se refieren necesariamente a la misma realización. Además, los aspectos, estructuras o características pueden combinarse de cualquier forma adecuada en una o más realizaciones.

- 5 Los títulos que se dan aquí se proporcionan sólo con fines de conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de las realizaciones.

Aunque las realizaciones ejemplares descritas en detalle a continuación se refieren principalmente al uso de las composiciones descritas en el presente documento en relación con la proliferación de fibroblastos, se entenderá que el alcance de esta descripción no se limita en modo alguno a dicho uso previsto, ya que las composiciones descritas en el presente documento pueden utilizarse con cualquier tipo de célula tal como, por ejemplo, queratinocitos, células endoteliales, osteoblastos.

10 La presente descripción se refiere a una composición que comprende polideoxirribonucleótidos (PDRN) y quitosano, donde los PDRN se emplean en forma de sal, tal como sal de sodio, hierro, cromo, magnesio, manganeso y otras.

El quitosano es un derivado desacetilado de la quitina, comúnmente extraído del caparazón de los crustáceos y de la pared celular de los hongos.

20 El quitosano utilizado en la composición objeto de la presente descripción puede tener un peso molecular entre 250 y 1 MDa, preferentemente igual a 1 MDa.

La composición comprende PDRN en forma de sal en una cantidad que puede estar comprendida entre 20 y 2500 µg/ml, preferentemente igual a 80 µg/ml y quitosano en una cantidad que puede estar comprendida entre 1 y 10 % p/v, preferentemente igual a 3 % p/v.

Debido a la sinergia entre los efectos ejercidos por el PDRN y por el quitosano, la composición descrita en el presente documento proporciona un aumento considerable de la proliferación celular, como se muestra a continuación.

30 La composición puede obtenerse a través de un procedimiento que contempla los siguientes pasos:

- preparar una primera solución que contenga PDRN en forma de sal;
- preparar una segunda solución que contenga quitosano;
- mezclar la primera solución y la segunda solución para obtener la composición en forma líquida.
- 35 – opcionalmente, dejar reposar la composición durante un período comprendido entre 8 y 24 horas, preferentemente igual a 16 horas, para obtener una dispersión.

La primera solución comprende polideoxirribonucleótidos en una cantidad comprendida entre 15 y 50 mg/ml, preferentemente igual a 25 mg/ml.

40 La segunda solución comprende quitosano en una cantidad comprendida entre 1 y 10 % p/v, preferentemente igual a 6 % p/v.

45 La composición obtenida comprende PDRN en forma de sal en una cantidad comprendida entre 20 y 2500 µg/ml, preferentemente igual a 80 µg/ml y quitosano en una cantidad comprendida entre 1 y 10 % p/v, preferentemente igual a 3 % p/v.

La forma física que asume la composición descrita (solución líquida o dispersión) depende de las condiciones operativas adoptadas durante la preparación (tales como, por ejemplo, el pH, la temperatura, el intervalo de tiempo en que se deja reposar la composición, etc.).

La composición también puede hacerse, por ejemplo, en forma de crema, pomada, gel, suspensión o solución, siendo la solución adecuada para su administración por inyección o pulverización, o como producto liofilizado para su reconstitución antes de su uso con agua u otros vehículos adecuados.

55 Dicha composición puede contener excipientes y/o portadores adecuados para la vía de administración elegida, tales como conservantes, espesantes, antioxidantes, emolientes, humectantes, fragancias naturales o artificiales.

La composición objeto de la presente descripción puede utilizarse como composición farmacéutica siempre que se requiera un efecto proliferativo celular en medicina regenerativa, por ejemplo en cirugía plástica, y en el tratamiento de complicaciones postoperatorias para el tratamiento de heridas, el tratamiento de quemaduras de las llagas del pie diabético, de las úlceras de decúbito, de las heridas abiertas tratadas con radioterapia que tienen una cicatrización deteriorada, de las manifestaciones de la psoriasis, en el tratamiento de las llagas ulcerosas, para la disuasión de las heridas abiertas, para la estimulación de la granulación, para la estimulación del microambiente dérmico para la regeneración de los tejidos.

Además, la composición objeto de la presente descripción encontrará aplicación también a nivel cosmético, por ejemplo, para el tratamiento de cicatrices, queloides, estrías, celulitis, arrugas, y para la recuperación en general de las características óptimas del epitelio.

Varias realizaciones preferidas de la presente invención se describirán en detalle a continuación, refiriéndose al uso de PDRN en forma de sal de sodio (PDRN-Na).

Sin embargo, el alcance de esta descripción, no se limita de ninguna manera al uso de PDRN-Na, ya que las condiciones de funcionamiento mostradas en los Ejemplos que siguen pueden practicarse de la misma manera para preparar composiciones que comprenden PDRN en forma de otras sales tales como, por ejemplo, sales de sodio, hierro, cromo, magnesio, manganeso y otras.

#### **Ejemplo 1. Efecto de la composición de PDRN-Na y quitosano en la proliferación celular**

La PDRN en forma de sal de sodio (Na-PDRN, Veritas Ltd.; peso molecular entre 150 y 500 kDa, preferentemente igual a aproximadamente 350 kDa; hipercromicidad >37 %; ADN entre 86 % y 100 %, ARN <8 %; proteína <0,7 %, relación nitrógeno/fósforo entre 1,3 y 1,8) se disolvió en 50 mM de Tris, pH 7,5 para obtener una primera solución a una concentración de 25 mg/ml.

El quitosano (1 MDa) se disolvió en agua para obtener una segunda solución al 6 % p/v.

Se utilizaron fibroblastos humanos (HFF-1, ATCC® No: SCRC-1041™) para los experimentos descritos en el presente documento.

La monocapa de fibroblastos humanos se disoció mediante incubación con tripsina y las células así obtenidas se colocaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; ATCC Catalogo No. 30-2002) suplementado con suero fetal bovino (BSA), 10 % v/v, penicilina y estreptomycin, 1 % v/v a una concentración de 100.000 células/ml.

En una primera serie de experimentos, los fibroblastos (100.000 células/ml) se resuspendieron en medio de cultivo (volumen final de 1 ml) complementado con PDRN-Na (primera solución a una dilución 1:312,15 para obtener una concentración final de 80 µg/ml) y quitosano (segunda solución a una dilución para obtener una concentración final del 3 % p/v).

En una segunda serie de experimentos, los fibroblastos se resuspendieron en medio de cultivo (100.000 células en un volumen final de 1 ml) sin la adición de otros compuestos (experimento de control).

A continuación, se sembraron las células en placas de 96 pocillos (en un volumen final de 100 µl) y se evaluó la proliferación celular después de 48 horas mediante el ensayo MTT.

El número de células se calculó por extrapolación de una curva de calibración preparada en paralelo al ensayo.

Los datos reportados en la Tabla 1 muestran que la composición que contiene PDRN-Na combinada con quitosano determina un aumento significativo en el número de fibroblastos en comparación con el número de fibroblastos en medio de cultivo solamente (células de control, CTR).

**Tabla 1**

|                  | <b>CTR</b> | <b>PDRN-Na +quitosano</b> |
|------------------|------------|---------------------------|
|                  | 8,682.51   | 11,692.13                 |
|                  | 8,832.99   | 10,638.77                 |
|                  | 8,682.51   | 10,789.25                 |
| <b>MEDIA</b>     | 8,733.00   | 11,040.00                 |
| <b>ERROR EST</b> | 50.16      | 328.90                    |

Cada condición experimental se repitió por triplicado. Los datos mostrados representan la media y el error estándar del número de fibroblastos analizados y la significación se calculó con una prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ).

#### **Ejemplo 2. Efecto de las composiciones PDRN-Na y PDRN-Na + quitosano en la proliferación celular**

Las PDRN-Na se disolvieron en Tris 50 mM, pH 7,5 en una primera solución a una concentración de 25 mg/ml.

El quitosano (1 MDa) se preparó en una segunda solución al 6 % p/v en agua.

En una primera serie de experimentos, se añadió una alícuota de la segunda solución que contenía quitosano a 1 ml de medio de cultivo para obtener una concentración final de quitosano del 3 % p/v.

Tras la adición de quitosano, el medio de cultivo se dejó reposar durante 16 horas.

Se resuspendieron fibroblastos humanos (100.000 células/ml) en medio de cultivo suplementado con quitosano.

En una segunda serie de experimentos, se complementó 1 ml de medio de cultivo con:

- una alícuota de la primera solución que contiene PDRN-Na (para obtener una concentración final de 80 µg/ml) y
- una alícuota de la segunda solución que contiene quitosano (para obtener una concentración final del 3 % p/v).

Los fibroblastos humanos (100.000 células/ml) se resuspendieron en medio de cultivo suplementado con PDRN-Na y quitosano, como se ha descrito anteriormente, 16 horas después de su preparación.

En una tercera serie de experimentos, los fibroblastos humanos se resuspendieron en medio de cultivo (100.000 células en un volumen final de 1 ml) sin la adición de otros compuestos como experimentos de control.

Cada condición experimental se evaluó por triplicado.

Los datos reportados en la Tabla 2 muestran que la composición que contiene quitosano y PDRN-Na determina un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de la proliferación de fibroblastos en comparación con una composición de control y en comparación con una composición que sólo contiene quitosano.

**Tabla 2**

|                  | <b>CTR</b> | <b>quitosano</b> | <b>PDRN-Na +quitosano</b> |
|------------------|------------|------------------|---------------------------|
|                  | 12,143.60  | 28,124.90        | 89,386.55                 |
|                  | 9,923.97   | 25,461.35        | 144,877.20                |
|                  | 9,923.75   | 29,456.68        | 132,003.40                |
| <b>MEDIA</b>     | 10,664.00  | 27,681.00        | 122,089.00                |
| <b>ERROR EST</b> | 739.90     | 1,175.00         | 16,768.00                 |

### **Ejemplo 3. Efecto de las composiciones de PDRN-Na y PDRN-Na y quitosano depositadas sobre soportes plásticos.**

El efecto de la composición que comprende PDRN-Na y quitosano sobre la proliferación de fibroblastos humanos se evaluó tras su deposición en un soporte de plástico sobre el que se sembraron posteriormente las células (16 horas después).

Se preparó la siguiente solución:

- la primera solución de PDRN-Na disuelta en Tris 50 mM, pH 7,5 a una concentración de 25 mg/ml.
- la segunda solución de quitosano al 6% p/v en agua.

Las soluciones se mezclaron para obtener una composición que contenía PDRN-Na a una concentración final de 80 µg/ml y quitosano a una concentración final del 3 % p/v.

Se depositaron cien µl de la solución anterior (PDRN-Na y quitosano) en el fondo de los pocillos de una placa de plástico de 96 pocillos.

Se depositaron cien µl de una solución que contenía Na-PDRN sin quitosano en el fondo de otros pocillos.

En los pocillos de control se depositaron cien µl de una solución que carecía de los componentes anteriores (constituida esencialmente por medio de cultivo).

La solución depositada en cada pocillo se dejó reposar durante 16 horas a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar continuo.

Tras este intervalo de tiempo, se sembraron fibroblastos humanos (100.000 células/ml) en los pocillos y se incubaron durante 48 horas.

- 5 Como se informa en la Tabla 3, la composición de PDRN-Na y quitosano determina un aumento significativo del número de fibroblastos igual a 15 veces en comparación con el número de fibroblastos sembrados en los pocillos de control ( $p < 0,001$ ) e igual a unas 13 veces en comparación con el número de fibroblastos sembrados en los pocillos tratados sólo con PDRN-Na ( $p < 0,001$ ).

10

Tabla 3

|                  | CTR       | PDRN-Na   | PDRN-Na +quitosano |
|------------------|-----------|-----------|--------------------|
|                  | 7,270.01  | 9,666.08  | 103,511.90         |
|                  | 7,270.01  | 8,867.39  | 124,677.10         |
|                  | 10,464.77 | 10,464.77 | 139,852.20         |
| <b>MEDIA</b>     | 8,335.00  | 9,666.00  | 122,680.00         |
| <b>ERROR EST</b> | 1,065.00  | 461.10    | 10,538.00          |

**Ejemplo 3a. Efecto de las composiciones de PDRN-Na y PDRN-Na y quitosano depositadas sobre soportes plásticos.**

- 15 Las condiciones experimentales descritas en el Ejemplo 3 se reprodujeron bajo las mismas condiciones experimentales y los resultados se reportan en la Tabla 4.

En confirmación de lo observado y descrito para el Ejemplo 3, la composición de PDRN-Na y quitosano depositada sobre un soporte y dejada en reposo durante 16 horas determinó un aumento significativo de la proliferación celular en comparación con las células de control ( $p < 0,001$ ) y en comparación con una composición que contenía PDRN-Na pero carecía de quitosano, como se informa en la Tabla 4.

20

Tabla 4

|                  | CTR      | PDRN-Na   | PDRN-Na +quitosano |
|------------------|----------|-----------|--------------------|
|                  | 8,093.22 | 8,785.73  | 97,678.65          |
|                  | 5,723.25 | 11,552.21 | 95,412.16          |
|                  | 4,733.43 | 13,041.22 | 90,879.19          |
| <b>MEDIA</b>     | 6,183.00 | 11,126.00 | 94,657.00          |
| <b>ERROR EST</b> | 996.80   | 1,247.00  | 1,999.00           |

- 25 También en estas pruebas, el análisis experimental se repitió por triplicado. Los datos mostrados representan la media y el error estándar del número de fibroblastos analizados y la significación se calculó mediante una prueba ANOVA de una vía y la prueba post-hoc de Newman-Keuls (GraphPad Prism).

- 30 Naturalmente, aunque el principio de la invención permanece constante, los detalles estructurales y las realizaciones pueden variar ampliamente con respecto a lo que se ha descrito e ilustrado sólo a modo de ejemplo, sin apartarse del alcance de la presente invención tal como se especifica en las reivindicaciones anexas.

# REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende polideoxirribonucleótidos (PDRN) y quitosano, en la que dichos polideoxirribonucleótidos están presentes en forma de sal, y tienen:  
5
  - peso molecular entre 150 y 500 kDa;
  - hipercromía >37 %;
  - ADN entre 86 % y 100 %;
  - ARN <8 %;
  - 10- proteína <0,7 % y
  - relación nitrógeno/fósforo entre 1,3 y 1,8.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha sal se selecciona entre: sal de sodio, hierro, cromo, magnesio, manganeso.  
15
3. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos polideoxirribonucleótidos están presentes en una cantidad comprendida entre 20 y 2500 µg/ml, preferentemente igual a 80 µg/ml.  
20
4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho quitosano está presente en una cantidad comprendida entre 1 y 10 % p/v, preferentemente igual a 3% p/v.  
25
5. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichos polideoxirribonucleótidos tienen un peso molecular de aproximadamente 350 kDa.  
30
6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho quitosano tiene un peso molecular entre 250 kDa y 1 MDa, preferentemente igual a aproximadamente 1 MDa.  
35
7. Un procedimiento para la preparación de una composición que comprende polideoxirribonucleótidos (PDRN) y quitosano, que comprende:  
40
  - preparar una primera solución que contiene polideoxirribonucleótidos en forma de sal en una cantidad comprendida entre 15 y 50 mg/ml, preferentemente igual a 25 mg/ml;
  - preparar una segunda solución que contiene quitosano en una cantidad entre 1 y 10 % p/v, preferentemente igual al 6% p/v;
  - 45- mezclar la primera solución y la segunda solución para obtener una composición en forma líquida que comprenda PDRN en forma de sal en una cantidad comprendida entre 20 y 2500 µg/ml y quitosano en una cantidad comprendida entre 1 y 10% p/v.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el procedimiento comprende además el paso de dejar reposar la composición durante un período comprendido entre 8 y 24 horas, preferentemente igual a 16 horas, obteniendo una composición en forma de dispersión.  
50
9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de heridas, quemaduras, llagas de pie diabético, escaras, heridas abiertas tratadas con radioterapia, manifestaciones de psoriasis, llagas ulcerosas.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la disuasión de heridas.
11. Un producto cosmético que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.