



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 877**

51 Int. Cl.:
A61K 31/70 (2006.01)
A61F 2/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01975298 .9**
96 Fecha de presentación : **20.09.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1328279**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2003**

54 Título: **Composiciones que contienen lignina y procedimiento de fabricación y utilización de las mismas.**

30 Prioridad: **20.09.2000 US 665837**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2009

73 Titular/es: **Aquamed Technologies, Inc.**
Suite G, 1787 Tribute Road
Sacramento, California 95815, US

72 Inventor/es: **Alimi, Hojabr**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

Composiciones que contienen lignina y procedimiento de fabricación y utilización de las mismas.

5 Campo técnico

Esta invención está relacionada con composiciones que contienen ligninas o derivados de ligninas y, más particularmente, a revestimientos para dispositivos médicos y a la utilización de lignina en la fabricación de un medicamento para inhibir la restenosis y la trombosis.

10 Antecedentes

Las ligninas derivan de un recurso abundante y renovable: árboles, plantas y cultivos agrícolas. Actualmente se produce lignina comercial como un coproducto de la industrial del papel, separada de los árboles mediante un proceso de reducción a pasta de papel químico.

La industria comenzó a utilizar ligninas por primera vez en los años 1880 cuando se utilizaban lignosulfonatos en el curtido del cuero y en los baños de tinte. Desde entonces, se han encontrado aplicaciones para la lignina en productos alimentarios, sirviendo como emulsionantes en los piensos para animales y como materia prima en la producción de vainillina. Los usos de la lignina se han extendido y actualmente se utiliza de forma general como aglutinante, dispersante, emulsionante o secuestrante (para la formación de complejos).

Aunque las ligninas son conocidas en la técnica no han sido muy utilizadas en el terreno biomédico. En la presente se proporcionan por primera vez actividades bioactivas de las ligninas y métodos para producir y utilizar composiciones que contienen ligninas con actividades bioactivas, particularmente para ser utilizadas, por ejemplo, en la inhibición de la proliferación celular.

Descripción de la invención

En una realización, la invención se refiere a la utilización de la lignina en la fabricación de un medicamento para inhibir la restenosis.

En otra realización, la invención se refiere a la utilización de la lignina en la fabricación de un medicamento para inhibir la trombosis.

En otra realización, la invención se refiere a un dispositivo médico revestido en el que el revestimiento contiene lignina.

En otra realización, la invención se refiere a un método para producir un dispositivo médico, comprendiendo dicho método la etapa de revestimiento del dispositivo médico, donde el revestimiento contiene lignina.

En las realizaciones anteriores, la lignina preferida es lignosulfonato.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra células de músculo liso humano, más específicamente células de músculo liso humano normales como control;

la Fig. 2 muestra células de músculo liso humano normales con un 2,5% de lignosulfonato, en las que no se indica ningún crecimiento;

la Fig. 3 muestra células de carcinoma de fibroblastos largos humanos, más particularmente células de carcinoma de fibroblastos largos como control con un 40% de células en monocapa y un 60% de células tumorales;

la Fig. 4 muestra células de carcinoma de fibroblastos largos tratadas con lignosulfonato, habiendo un 20% de células tumorales y un 40% de células en monocapa;

la Fig. 5 muestra los resultados de un ANOVA utilizado para evaluar la significación estadística de los datos brutos recogidos en un estudio *in vivo* acerca de los efectos de L3 sobre el desarrollo de células tumorales;

la Fig. 6 es un diagrama de dispersión que muestra las medidas del crecimiento tumoral realizadas en ratones que recibieron inyecciones de una solución al 7,5% de L3 en el estudio *in vivo* acerca de los efectos de L3 sobre el desarrollo de células tumorales; y

la Fig. 7 es un diagrama de dispersión que muestra las medidas del crecimiento tumoral de ratones control en el estudio *in vivo* referido en la breve descripción de las Figs. 5 y 6.

Modo mejor de llevar a cabo la invención

Como se describirá adicionalmente más adelante, se ha descubierto en la presente que las ligninas y derivados de las mismas presentan varias bioactividades útiles en el terreno biomédico. Por consiguiente, se proporcionan en la presente composiciones que tienen lignina o un derivado de la misma y métodos para producir y utilizar las mismas.

Las composiciones provistas incluyen revestimientos para dispositivos médicos, dispositivos médicos con revestimientos según se describe en la presente.

Las ligninas incluyen lignosulfonatos, denominados también sulfonatos de lignina y ligninas al sulfito, así como ligninas Kraft denominadas también ligninas al sulfato. Los lignosulfonatos son productos de la reducción a pasta de papel con sulfito y son hidrofílicos. Las ligninas Kraft se obtienen a partir del proceso de reducción a pasta de papel Kraft y son hidrofóbicas. Otras tecnologías de deslignificación utilizan un solvente orgánico o bien se utiliza un tratamiento con vapor a alta presión para eliminar las ligninas de las plantas, como es conocido en la técnica. En una realización, se utilizan lignosulfonatos. En otra realización, se utilizan ligninas Kraft.

La lignina comercial es producida actualmente como un coproducto de la industria papelera, separada de los árboles mediante un proceso químico de reducción a pasta de papel. En general, los árboles son convertidos en troncos y corteza, todo lo cual es llevado a silos de astillas y posteriormente es sometido a procesos de reducción a pasta de papel, neutralización y evaporación, y finalmente es llevado a una planta de procesamiento de lignina en la cual se producen los productos de lignina. Las ligninas son producidas por una variedad de compañías tales como Lenox Polymers Ltd., con base en Port Huron, Michigan, EE.UU., Tembec, Inc. en Teemiscaming, Quebec, Lignotech y Georgia Pacific.

En una realización, el lignosulfonato es preparado mediante un método de precipitación con etanol convencional a partir de una lejía residual concentrada comercialmente (alrededor de un 50% de concentración de sólidos) tal como Copartin™. Brevemente, el Copartin™ puede ser diluido, por ejemplo, con un exceso de agua de 5 veces y la solución añadida gota a gota a un exceso de etanol de 10 veces (por ejemplo). El precipitado es recogido por centrifugación y posteriormente liofilizado para su uso posterior. En una realización, los azúcares son eliminados mediante, por ejemplo, hidrólisis con ácido sulfúrico. Este método es utilizado generalmente para el análisis de la composición de azúcares. En general, 25 mg de lignosulfonato son disueltos en 0,5 ml de una solución de H₂SO₄ al 72% (p/p) y digeridos a 30°C durante una hora. Después de la adición a la mezcla de 19,5 ml de agua, la misma puede ser autoclavada y dializada utilizando técnicas estándar para obtener lignosulfonato libre de azúcares.

En una realización, las ligninas son obtenidas de recursos naturales. Las ligninas naturales pueden ser modificadas para que incluyan o contengan metales, halógenos, sales, preferiblemente divalentes, o amonio. Las ligninas que contienen hierro son una realización preferida y tienen una actividad incrementada. Los halógenos incluyen cloro, bromo, flúor, etc., aunque se prefiere el cloro. Las ligninas cloradas pueden ser utilizadas en ciertas realizaciones en las cuales la toxicidad no es un factor, tal como cuando están dirigidas a células enfermas. En las realizaciones preferidas las ligninas tienen una toxicidad mínima.

En otra realización, las ligninas son sintéticas. Por ejemplo, las ligninas sintéticas son polímeros de deshidrogenación del ácido p-cumárico, el ácido ferúlico y el ácido cafeico.

Generalmente, las ligninas, naturales o sintéticas, tienen una actividad incrementada cuando son tratadas con un agente reductor tal como NaBH₄. Si se desea, la actividad puede ser disminuida mediante tratamiento con un agente oxidante tal como nitrato de amonio cérico. Cuando una lignina, natural o sintética, es manipulada para que tenga constituyentes tales como calcio, hierro, etc., que no son parte de la lignina extraída o sintetizada, se dice que la lignina es un agente basado en lignina o un derivado de la misma. Los derivados de lignina utilizados en la presente son derivados funcionales en cuanto a que conservan las bioactividades de la lignina según se describe en la presente y tienen preferiblemente una calidad mejorada o, por alguna razón, deseable sobre la lignina en la cual está basado el derivado de lignina. Por ejemplo, un cierto grupo R de una lignina puede ser sustituido con el fin de incrementar o ajustar la especificidad, la actividad, el pH óptimo, la estabilidad, etc.

Las ligninas o los derivados de las mismas según se utilizan en la presente tienen generalmente 1000-20.000 daltons (D), y tienen preferiblemente de 8.000 a 15.000 D aproximadamente, más preferiblemente de 9.000 a 12.000 D aproximadamente, y más preferiblemente 10.000 D aproximadamente. En general, las ligninas con mayor peso molecular se correlacionan con un producto más puro, lo cual se prefiere.

En las realizaciones preferidas, las ligninas o los derivados de las mismas tienen una o más bioactividades. En una realización preferida, las ligninas utilizadas en la presente tienen actividad anti-proliferación celular. El término "actividad anti-proliferación celular", según se utiliza en la presente, se emplea indistintamente con el término "actividad inhibidora de la proliferación celular". La actividad anti-proliferación celular tiene varias aplicaciones. En la utilización junto con dispositivos médicos utilizados *in vivo*, la actividad anti-proliferación celular inhibe o impide reacciones de respuesta tisular a los dispositivos médicos insertados y/o implantados, reacciones que tienen como resultado la formación de tejido que puede dar lugar a trastornos tales como restenosis, formación de cicatrices, rechazo del implante, etc.

En otra realización, las ligninas y los derivados de las mismas tienen “actividad anti-trombogénica”, término que, según es utilizado en la presente, es intercambiable con “inhibición de la actividad formadora de trombos”. En otra realización más, las ligninas y derivados de las mismas tienen “actividad anti-restenosis”.

La actividad inhibidora o “anti-” de las ligninas, según se utiliza en la presente, inhibe preferiblemente la actividad biológica particular en un nivel detectable, y más preferiblemente en al menos un 30%, más preferiblemente en un 40%, más preferiblemente en un 50%, más preferiblemente en un 70%, más preferiblemente en un 90% y muy preferiblemente en al menos un 95%. En una realización de la presente, la inhibición es del 100%. En un aspecto, la inhibición es definida como cualquier disminución detectable de una actividad biológica particular, tal como la proliferación celular, la restenosis o la formación de trombos, en comparación con un control que no contiene la composición que comprende lignina.

En un aspecto de la invención, se proporciona un revestimiento, donde el revestimiento contiene lignina o un derivado funcional de la misma. En una realización preferida, se proporciona un dispositivo médico, donde el dispositivo médico tiene sobre sí un revestimiento que contiene lignina o un derivado funcional de la misma. Los dispositivos médicos proporcionados son preferiblemente para ser utilizados *in vivo*. Los dispositivos médicos pueden ser para uso limitado *in vivo*, tales como instrumental para operaciones o dispositivos médicos tales como catéteres, laparoscopios, etc., o dispositivos para implantes temporales o permanentes. En las realizaciones preferidas, el dispositivo es seleccionado del grupo que consta de suturas, tornillos para huesos, uñas, placas, tubos, láminas, películas, endoprótesis vasculares (“stents”), válvulas y vasos artificiales, globos intraaórticos y prótesis. En otra realización, se define un dispositivo médico como cualquier material que puede tener contacto con los tejidos. En otra realización, el dispositivo médico puede ser utilizado para la selección de células antes de la inyección. Además, el dispositivo puede estar revestido con, contener, estar compuesto de, o ser producido a partir de, lignina o un derivado de la misma.

El revestimiento puede ser aplicado al dispositivo médico mediante unión covalente o iónica a la superficie del dispositivo médico. Preferiblemente, el revestimiento está unido covalentemente a parte de, o a toda, la superficie del dispositivo médico. La lignina puede ser aplicada como revestimiento directamente o indirectamente. Preferiblemente, la lignina es aplicada indirectamente mezclando primeramente dicha lignina con un revestimiento secundario y aplicando posteriormente el revestimiento secundario que contiene lignina sobre dicho dispositivo médico. El revestimiento secundario permite preferiblemente la liberación lenta de las ligninas y puede ser cualquier revestimiento secundario estándar tal como los utilizados para aplicar heparina a los dispositivos médicos, comprendiendo generalmente esferas revestidas. Normalmente, el porcentaje en un revestimiento de lignina es del 10% al 65% aproximadamente, más preferiblemente del 20% al 60% aproximadamente, más preferiblemente del 30% al 50% aproximadamente y más preferiblemente, el revestimiento es del 30% de lignina aproximadamente.

Los revestimientos contienen preferiblemente lignina como agente activo y carecen de otros agentes activos. En otra realización, los revestimientos pueden contener uno o más agentes activos además de la lignina. Por ejemplo, pueden añadirse otros agente antitrombóticos tales como heparina. El revestimiento puede ser aplicado mediante inmersión, pulverización, pintado, pulverización electrostática o deposición en fase de vapor, y es preferiblemente secado a temperatura ambiente a un 40-60% de humedad. El dispositivo revestido es en general esterilizado posteriormente. Los dispositivos médicos con los revestimientos sobre ellos pueden ser posteriormente utilizados para su uso deseado así como por la bioactividad de la lignina. Por tanto, se proporciona también la reducción de la respuesta tisular a dispositivos médicos tales como implantes. Por ejemplo, en una realización, se proporciona la inhibición de la restenosis asociada con la respuesta tisular causada normalmente por un dispositivo médico, mediante la utilización de un dispositivo médico que tiene un revestimiento que contiene lignina. En otra realización, se proporciona la inhibición de la trombosis asociada con la respuesta tisular causada normalmente por un dispositivo médico, mediante la utilización de un dispositivo médico que tiene un revestimiento que contiene lignina.

Estados de enfermedad que pueden ser tratados mediante los medicamentos proporcionados en la presente incluyen restenosis y trombosis. En general, los dispositivos médicos descritos en la presente son utilizados para tratar dichas enfermedades.

El individuo, o paciente, es generalmente un sujeto humano, aunque como será apreciado por los expertos en la técnica el paciente puede ser también un animal. Por tanto, otros animales, incluyendo mamíferos tales como roedores (incluyendo ratones, ratas, hámsters y cobayas), gatos, perros, conejos, animales de granja incluyendo vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos, etc., y primates (incluyendo monos, chimpancés, orangutanes y gorilas) están incluidos dentro de la definición de paciente. En una realización preferida, el individuo requiere la inhibición de la formación de trombos.

Los medicamentos para ser utilizados según son proporcionados en la presente pueden ser administrados al huésped en un vehículo fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable. Los agentes y composiciones pueden ser administrados por una variedad de vías, oralmente, sistémicamente, tópicamente, parenteralmente, por ejemplo subcutáneamente, intraperitonealmente, intravascularmente, etc. Dependiendo de la manera de introducción, los compuestos pueden ser formulados en una variedad de formas. La concentración del compuesto terapéuticamente activo en la formulación puede variar del 0,1-100% en peso aproximadamente. En general, se utiliza una cantidad terapéutica para la necesidad, por ejemplo para conseguir la actividad anti-trombogénica.

Los medicamentos son preparados para su almacenamiento mezclando el ingrediente activo con el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 residuos aproximadamente); proteínas tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio y/o surfactantes no iónicos tales como Tween, Pluronic o PEG.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

Las Ligninas Inhiben el Crecimiento Celular In Vitro

Se añadió lignosulfonato a células musculares humanas *in vitro*. Se añadió una concentración de lignosulfonato del 2,5% a las células que fueron posteriormente incubadas durante una hora a 37°C. Las células fueron luego recogidas y cultivadas durante 20 horas. El crecimiento celular fue determinado observando si las células se adherían a la placa y continuaban creciendo y dividiéndose. Los resultados indicaban que el crecimiento de las células musculares humanas era inhibido completamente *in vitro* cuando eran expuestas a lignosulfonato. Células cancerosas mostraban resultados similares. Ver las Figs. 1-4. Los controles se mantuvieron para asegurar la integridad de la grasa.

Como también está indicado en las Figs. 1-4, no se observó ningún signo de toxicidad. La toxicidad fue evaluada por la ISO 10993 y la USP 24. Células fibroblastos de ratón L929 fueron crecidas en cultivo. Una vez que se consiguió una monocapa del 80%-100%, las células fueron sometidas a una exposición de 24 y 48 horas con un 2,5%, un 5% y un 10% de lignosulfonato. Los cultivos no mostraban signos de toxicidad según lo indicado por USP e ISO. Una vez más, los controles fueron mantenidos para asegurar la integridad de la grasa.

Ejemplo comparativo 2

35 *Las Ligninas Tienen Actividad Anti-Microbiana*

Se añadió lignosulfonato a una variedad de microorganismos. Los microorganismos fueron sembrados en estría directamente en un medio (TSA) que contenía un 2,5% y un 5% de lignosulfonato. Se diseñaron controles negativos y controles positivos para asegurar la integridad del método de ensayo. Los resultados indican que se inhibió el crecimiento de *Streptomyces epidermis*, *Aspergillus niger* y *Penicillium spp*. El lignosulfonato parecía no producir ningún cambio observable en *Escherichia coli*. La inhibición se define como un retraso del crecimiento o la ausencia completa de crecimiento del microorganismo en la placa de TSA que contenía lignosulfonato.

45 Ejemplo comparativo 3

Las Ligninas Inhiben el Desarrollo de Células Tumorales In Vivo

Se recibieron diecisiete ratones con una edad de ocho semanas. Los ratones fueron mantenidos y observados durante dos semanas aproximadamente. Simultáneamente, células de melanoma específicas para ratones C57 fueron mantenidas y propagadas en cultivos celulares apropiados. Se utilizaron dos frascos de 25 cm para obtener una concentración apropiada de células de melanoma para inyección. Se extrajo del incubador un frasco que contenía monocapas de células de 24 horas. La monocapa fue lavada con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato y extraída. Se añadieron al frasco 3 ml de tripsina y el mismo se colocó en el incubador durante 15 minutos $\pm$ 1 minuto para permitir que las células se despegaran. Se añadieron al frasco 5 ml de DMEM y se pipetearon por las paredes del frasco para extraer todas las células. El volumen total se llevó a 10 ml con DMEM. El volumen completo fue transferido a un tubo de centrifuga de 50 ml. El volumen del segundo frasco fue transferido al mismo tubo. Las células fueron centrifugadas durante 10 minutos a 125xg. El sobrenadante antiguo fue retirado y se añadieron 10 ml de DMEM nuevo. Se realizó un recuento celular y las células se centrifugaron de nuevo. Se retiró el sobrenadante y las células fueron suspendidas en solución salina tamponada con fosfato estéril y colocadas sobre hielo para su transporte.

Los ratones fueron colocados en un recipiente que contenía bolas de algodón empapadas en éter. Después de la sedación (20 segundos aproximadamente) se retiraron los ratones y se inyectaron con 0,050 ml de la suspensión celular. Las inyecciones eran intradérmicas en el flanco derecho. Se observó que la aguja perforaba la piel hacia el exterior en dos de las inyecciones; por consiguiente, se retiró la aguja y se movió el lugar de inyección a otra posición. Dos ratones no fueron inyectados y se agujerearon sus orejas con único orificio en el lado derecho. Fueron mantenidos como controles negativos.

El tratamiento con L3 comenzó después de confirmar el crecimiento tumoral. Una vez que se confirmaron los tumores, los ratones fueron separados en tres grupos de cinco. Un grupo de cinco fue mantenido como control positivo y no se perforaron orificios en las orejas. A otro grupo de cinco se le practicó un orificio en la oreja derecha y recibió tratamiento con L3 al 5%. Al grupo final de cinco ratones se le practicó un orificio en cada oreja y recibió tratamiento con L3 al 7,5%. El tratamiento fue administrado cada cuatro días. L3 se preparó y esterilizó inmediatamente antes de las inyecciones. Se producía un nuevo lote para cada tratamiento. Se administraron en el sitio tumoral 0,020 ml de L3 utilizando una jeringa Hamilton estéril. El tamaño del tumor fue medido utilizando una regla de disección. Los animales se colocaron boca abajo con las patas estiradas. Los tumores fueron medidos a lo largo de la porción de la dimensión más ancha y el diámetro del tumor fue registrado en centímetros. La salud global fue documentada antes de cada tratamiento. Los animales del grupo control positivo fueron también medidos y observados. Todas las observaciones fueron documentadas en el cuaderno de notas del técnico de laboratorio y se mantuvieron dentro de la carpeta del ensayo.

Después de la finalización del tratamiento, los ratones fueron eutanasiados. Se tomaron muestras para histología de un ratón de cada grupo de ensayo y de cada grupo control. Se realizó necropsia en todos los animales y se documentaron las observaciones.

Resultados

Se confirmó que los ratones tenían una captación de tumores del 93,33% antes del tratamiento. Se observó un único ratón sin tumor y fue designado nulo, pero este mismo animal mostró la presencia de un tumor dos días más tarde y fue colocado en el grupo control positivo.

Los ratones del grupo control positivo comenzaron a morir dos días antes de la finalización del estudio. Los tumores eran extremadamente grandes y en la necropsia se observó una infección sistémica. Los hígados eran amarillos, el tamaño del bazo era el doble que el del control negativo y los páncreas estaban negros. Dos animales habían perdido pelo en el cuello y en el lomo y en la cara inferior de los apéndices.

Cuatro de los ratones del grupo de ensayo del 5% murieron antes de la finalización del estudio. Debido a la pérdida de animales del grupo del 5% a lo largo del estudio, únicamente el grupo de ensayo del 7,5% fue evaluado estadísticamente. Los resultados siguientes son observaciones macroscópicas obtenidas a lo largo del estudio. El animal #4 murió como resultado de una reubicación. Aunque tenía desarrollo tumoral, el mismo era pequeño y no se había establecido internamente ninguna infección. El animal #4 murió antes del primer tratamiento. El animal #5 tenía una herida abierta en el punto de crecimiento tumoral como resultado de la perforación de la piel durante la administración. El sitio tumoral tenía una hendidura que presentaba un sangrado constante. El fluido de tratamiento se escapaba por la herida. La causa probable de la muerte fue una infección debida a una respuesta inmune disminuida. El animal #2 escapó de su jaula y fue encontrado muerto tres días después. La causa aparente de la muerte fue deshidratación e inanición. No se encontró un agrandamiento discernible del tumor y no había signos de infección. El animal #1 fue estrangulado con la tapa de la jaula cuando se sacó otro animal para su tratamiento. Su tumor era extremadamente pequeño (comparable a un grano de arena) y sus órganos parecían normales. El animal #3 fue eutanasiado al final del estudio. Estaba presente un segundo tumor y los órganos tenían un ligero signo de infección.

En el grupo de ensayo del 7,5%, un animal murió antes de la finalización del estudio. El animal #5 tenía una herida abierta en el punto de administración de las células cancerosas. El lugar del tumor tenía una hendidura que sangraba constantemente. El fluido de tratamiento se escapaba por la herida. La causa probable de la muerte fue una infección debida a una respuesta inmune disminuida. Los cuatro animales restantes tenían tumores que variaban en tamaño y varios niveles de infección interna.

La descripción del plan de tratamiento de los ratones incluidos en el estudio está mostrada en la Tabla I siguiente.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 329 877 T3

TABLA I

Descripción y Plan de Tratamiento

Cronología del Estudio In Vivo Acerca de los Efectos de L3 Sobre el Desarrollo de Células Tumorales

Fecha	Acción	Comentarios
27/6/2001	Inyección de células tumorales	5,0x10 ⁵ células/0,05 ml
29/6/2001	Reubicación	Sutter Medical, Sacramento
9/7/2001	1 ^{er} Tratamiento	14/15 ratones tenían tumores confirmados
11/7/2001	El ratón #4 - 5% murió	Estresado por el cambio
13/7/2001	2 ^o Tratamiento	Dos ratones tenían heridas abiertas
13/7/2001	El ratón #5 - 5% murió	Debido a una herida abierta e infección
16/7/2001	El ratón #2 - 5% escapó	N/A
17/7/2001	3 ^{er} Tratamiento	N/A
19/7/2001	El ratón #2 - 5% fue encontrado	Encontrado muerto, falta de alimento y agua
19/7/2001	El ratón #5 - 7,5% murió	Debido a una herida abierta e infección
20/7/2001	4 ^a Inyección	N/A
20/7/2001	El ratón #1 - 5% murió	Estrangulado con la tapa de la jaula, no pudo inyectarse
20/7/2001 pm	El positivo #3 murió	Ruptura del tumor, infección sistémica
23/7/2001 am	El positivo #1 murió	Ruptura del tumor, infección sistémica
23/7/2001	Necropsia	Tumores y órganos recogidos para histología

ES 2 329 877 T3

Análisis

En la Tabla II siguiente se presentan los datos brutos del estudio.

TABLA II

Datos Brutos: Grupo Control Frente al Grupo de Ensayo del 7,5%

Animal	Control	Ensayo	
P-1	1, 4	7, 5-2	1, 2
P-1	2, 6	7, 5-2	1, 4
P-1	3	7, 5-2	1, 9
P-1	3, 1	7, 5-2	2
P-2	0, 6	7, 5-3	0, 4
P-2	1, 9	7, 5-3	0, 7
P-2	2, 6	7, 5-3	1, 2
P-2	2, 8	7, 5-3	1, 6
P-3	0, 8		
P-3	1, 8		
P-3	2, 7		
P-3	2, 4		
P-4	1, 1		
P-4	2, 4		
P-4	3		
P-4	3, 1		
P-5	0, 5		
P-5	1, 7		
P-5	2		
P-5	2, 1		

Se llevó a cabo la evaluación del grupo de ensayo del 7,5%. Igual que en la Tabla de Crecimiento Tumoral, Tabla III siguiente, los animales número 1 y 4 no fueron analizados debido a la incapacidad para detectar la varianza. El animal #5 fue excluido del análisis porque no completó el estudio.

TABLA III

*Datos y Observaciones**Crecimiento Tumoral*

Tratamiento	2°	3°	4°	Final	% de Incremento
Animal	Tamaño del tumor en cm				
P-1	1,4	2,6	3,0	3,1	121
P-2	0,6	1,9	2,6	2,8	367
P-3	0,8	1,8	2,7	2,4	200
P-4	1,1	2,4	3,0	3,1	181
P-5	0,5	1,7	2,0	2,1	320
5-1	SG	NC	NC	D	0
5-2	0,7	D	D	D	0
5-3	1,2	1,4	1,9	2,1	75
5-4	D	D	D	D	0
5-5	0,8	D	D	D	0
7,5-1	SG	NC	NC	SG	0
7,5-2	1,2	1,4	1,9	2,0	67
7,5-3	0,4	0,7	1,2	1,6	300
7,5-4	SG	0,5	0,5	0,5	50
7,5-5	1,1	1,2	D	D	9

Clave para la Tabla III: SG = tamaño de un grano de arena, no puede ser visualizado o medido; D = animal eliminado del estudio debido a muerte o escape; NC = sin cambios en el tamaño del tumor.

Se utilizó un ANOVA, representado en la Fig. 5, para evaluar la significación estadística de los datos. De la evaluación puede concluirse que L3 inhibe el desarrollo del tumor. Esta conclusión está basada en un valor de p de 0,023362 y un valor asumido de $p=0,05$.

Los animales numerados 1 y 4 del grupo de ensayo del 7,5% presentaban un crecimiento mínimo cuando se compararon con los resultados del control. El incremento medio del tamaño del tumor en el grupo control fue del 238%. Esto se compara con un incremento del tamaño tumoral medio del 104% en el grupo de ensayo del 7,5%.

Después de la revisión de los diagramas de dispersión de los datos brutos, Figs. 6-7, es obvio que el crecimiento tumoral del grupo control continuaba aumentando, mientras que el grupo de ensayo mostraba un crecimiento limitado. El grupo control presentaba una pendiente positiva y el grupo de ensayo presentaba una pendiente negativa. Del análisis puede concluirse que la concentración de L3 del 7,5% produce una reducción de la proliferación celular cuando se compara con los animales control.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de lignina en la fabricación de un medicamento para inhibir la restenosis.
- 5 2. La utilización de la reivindicación 1, en la que la lignina es lignosulfonato.
3. La utilización de la reivindicación 2, en la que el lignosulfonato es preparado por precipitación con etanol de una lejía residual concentrada.
- 10 4. La utilización de la reivindicación 2, en la que el lignosulfonato es obtenido de recursos naturales.
5. La utilización de la reivindicación 1, en la que la lignina es una lignina sintética.
- 15 6. La utilización de la reivindicación 5, en la que la lignina sintética es un polímero de deshidrogenación del ácido p-cumárico, del ácido ferúlico y del ácido cafeico.
7. La utilización de la reivindicación 5 ó 6, en la que la lignina es tratada con un agente reductor.
- 20 8. La utilización de la reivindicación 7, en la que el agente reductor es NaBH_4 .
9. La utilización de la reivindicación 5 ó 6, en la que la lignina es tratada con un agente oxidante.
10. La utilización de la reivindicación 9, en la que el agente oxidante es nitrato de amonio cérico.
- 25 11. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la lignina es modificada para que contenga hierro.
12. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la lignina tiene un peso molecular entre 1.000 y 20.000 daltons, entre 8.000 y 15.000 daltons o entre 9.000 y 12.000 daltons.
- 30 13. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la lignina es formulada para su administración con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 14. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la lignina es formulada con un vehículo farmacéuticamente aceptable y un ligando que está dirigido a células enfermas.
15. Utilización de lignina en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la formación de trombosis.
- 40 16. La utilización de la reivindicación 15, en la que la lignina tiene las características de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13.
17. Un dispositivo médico revestido, en el que el revestimiento contiene lignina.
- 45 18. El dispositivo de la reivindicación 17, donde el dispositivo es seleccionado del grupo que consta de suturas, tornillos para huesos, uñas, placas, tubos, láminas, películas, endoprótesis vasculares ("stents"), válvulas y vasos artificiales, globos intraaórticos y prótesis.
19. El dispositivo de la reivindicación 17 ó 18, en el que la lignina es lignosulfonato.
- 50 20. El dispositivo de la reivindicación 19, en el que el lignosulfonato es preparado por precipitación con etanol de una lejía residual concentrada.
21. El dispositivo de la reivindicación 19, en el que el lignosulfonato es obtenido de recursos naturales.
- 55 22. El dispositivo de la reivindicación 17 ó 18, en el que la lignina es lignina sintética.
23. El dispositivo de la reivindicación 22, en el que la lignina sintética es un polímero de deshidrogenación del ácido p-cumárico, del ácido ferúlico y del ácido cafeico.
- 60 24. El dispositivo de la reivindicación 22 ó 23, en el que la lignina es tratada con un agente reductor.
25. El dispositivo de la reivindicación 23, en el que el agente reductor es NaBH_4 .
- 65 26. El dispositivo de la reivindicación 22 ó 23, en el que la lignina es tratada con un agente oxidante.
27. El dispositivo de la reivindicación 26, en el que el agente oxidante es nitrato de amonio cérico.

ES 2 329 877 T3

28. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, en el que la lignina es modificada para que contenga hierro.

5 29. El dispositivo de la reivindicación 28, en el que la lignina tiene un peso molecular entre 1.000 y 20.000 daltons, entre 8.000 y 15.000 daltons o entre 9.000 y 12.000 daltons.

30. Un método para producir un dispositivo médico, comprendiendo dicho método la etapa de revestimiento del dispositivo médico, donde el revestimiento contiene lignina.

10 31. El método de la reivindicación 30, en el que la lignina es lignosulfonato.

32. El método de la reivindicación 30 y 31, en el que el dispositivo es para ser utilizado *in vivo*.

15 33. El método de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, en el que el dispositivo es seleccionado del grupo que consta de suturas, tornillos para huesos, uñas, placas, tubos, láminas, películas, endoprótesis vasculares ("stents"), válvulas y vasos artificiales, globos intraaórticos y prótesis.

20 34. El método de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 33, en el que el revestimiento es aplicado mediante inmersión, pulverización, pintado, pulverización electrostática o deposición en fase de vapor.

35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 30 a 34, que comprende además la etapa de mezclado del revestimiento con un revestimiento secundario antes de revestir el dispositivo médico.

25 36. El método de la reivindicación 35, en el que el revestimiento secundario permite la liberación lenta del revestimiento cuando se utiliza el dispositivo médico *in vivo*.

37. El método de la reivindicación 35, en el que el revestimiento secundario comprende esferas revestidas.

30 38. El método de la reivindicación 35, en el que la mezcla del revestimiento y el revestimiento secundario incluye lignina en una cantidad entre el 10% y el 65% en peso, o entre el 20% y el 60% en peso o entre el 30% y el 50% en peso o un 30% en peso aproximadamente.

35

40

45

50

55

60

65

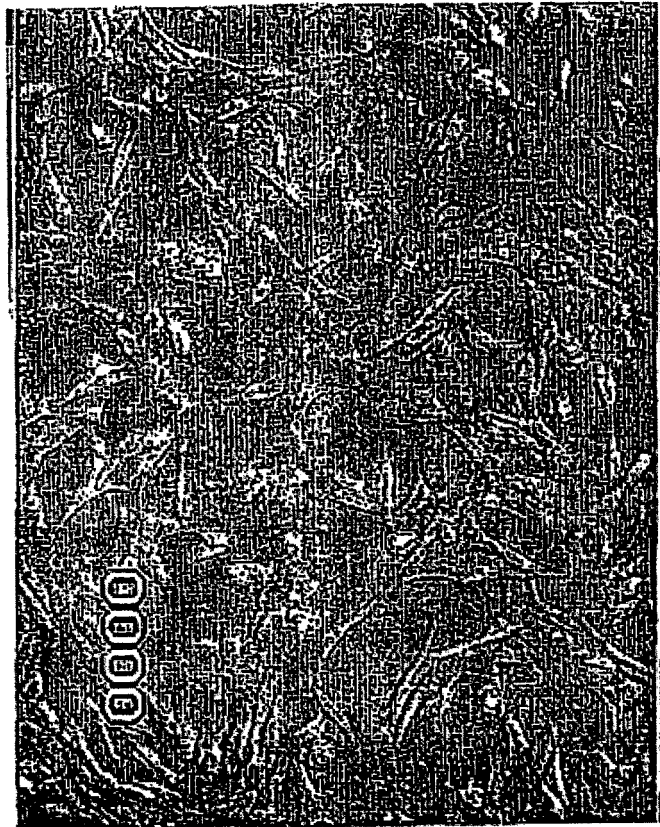


Fig._1

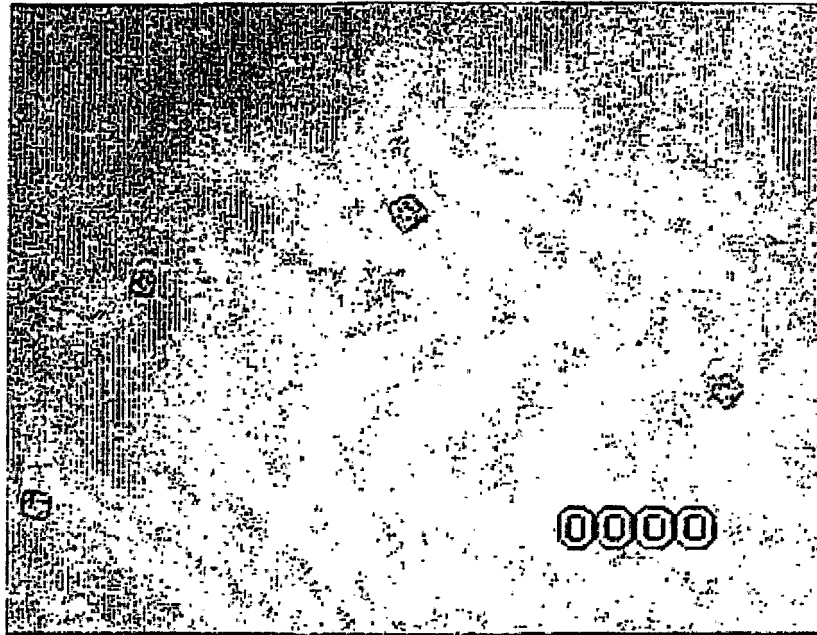


Fig._2

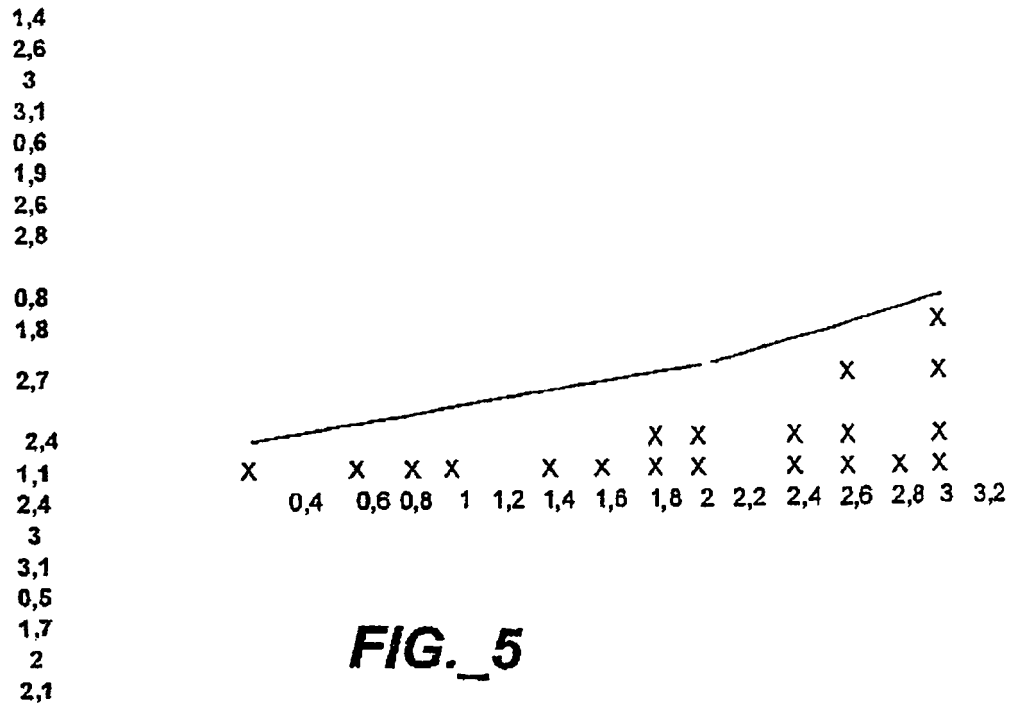


Fig. _3

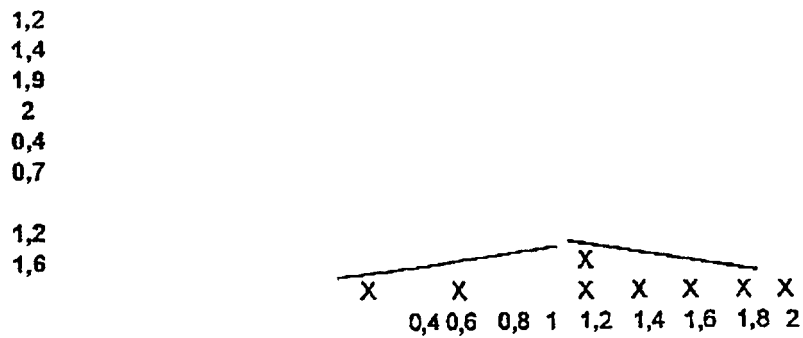


Fig._4

Crecimiento Tumoral en el Grupo Control



Medidas del Tumor en el Grupo de Ensayo del 7,5%



Anova: Factor Individual						
RESUMEN						
Grupos	Contaje	Suma	Media	Varianza		
Control	20	41,6	2,08	0,706947		
Ensayo	8	10,4	1,3	0,305714		
ANOVA						
Fuente de Variación	SS	df	MS	F	Valor de P	F crit
Entre Grupos	3,4765714	1	3,476571	5,804704	0,023362	4,2252
En los Grupos	15,572	26	0,598923			
Total	19,048571	27				

	Control	Ensayo
Media	2,08	1,3
Desviación Estándar	0,8408016	0,552914
Varianza de la Muestra	0,7069474	0,305714
Curtosis	-0,7842291	-0,63067
Disimetría	-0,5887203	-0,40567
Rango	2,6	1,6
Mínimo	0,5	0,4
Máximo	3,1	2
Suma	41,6	10,4
Contaje	20	8

FIG. 7