



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 615**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4412 (2006.01)

A61K 31/4418 (2006.01)

A61K 31/4427 (2006.01)

A61K 31/721 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03718739 .0**

86 Fecha de presentación : **08.04.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1499312**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54

Título: **El uso de derivados de hidroxipiridona en la curación de heridas.**

30

Prioridad: **20.04.2002 EP 02008902**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73

Titular/es: **Sanofi-Aventis Deutschland GmbH**
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt am Main, DE

72

Inventor/es: **Bohn, Manfred;**
Kraemer, Karl, Theodor y
Wenger, Roland, H.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

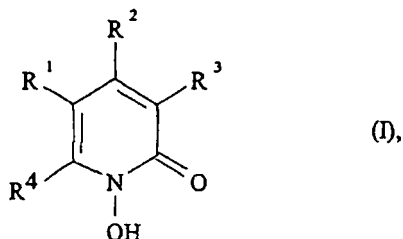
ES 2 282 615 T3

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

El uso de derivados de hidroxipiridona en la curación de heridas.

La presente invención se refiere al uso de compuestos de la fórmula I,



en la que R¹; R²; R³ y R⁴ tienen los significados indicados debajo, en la cura de heridas en las que las heridas se definen según la reivindicación 1.

Compuestos de fórmula I tales como la sal de 2-aminoetanol de 6-Ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona, también conocida como ciclopirox olamina (CPX), son agentes anti-fungicidas extendidos usados para tratar micosis de la piel y uñas desde hace más de 20 años. Aparte de su actividad antimicótica, la CPX también es eficaz frente a bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas (Dittmar, W. *et al.* (1981) Microbiological laboratory studies with ciclopiroxolamine. *Arzneimittelforschung* 31, 1317-1322). La CPX se aplica como una crema o gel al 1% para tratar dermatomicosis y como un esmalte de uñas al 8% para tratar onicomycosis. La CPX se conoce por inhibir diversas actividades enzimáticas de los hongos en microorganismos, incluyendo el transporte a través de la membrana de aminoácidos, potasio y fosfato. Sin embargo, el mecanismo molecular general de la actividad anti-microbiana de la CPX no se conoce exactamente.

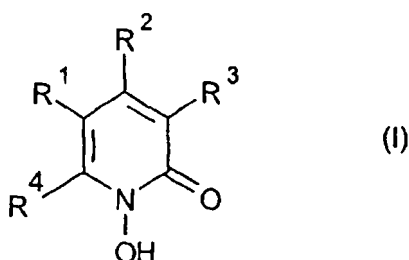
En estudios dirigidos a los efectos cutáneos de una disolución al 1% de CPX aplicada en piel de conejo durante 20 días, se ha observado ocasionalmente enrojecimiento transitorio de la piel sana y enrojecimiento persistente de la piel herida experimentalmente (Alpermann, H. G., and Schütz, E. (1981) Studies on the pharmacology and toxicology of ciclopiroxolamine. *Arzneimittelforschung* 31, 1328-1332). El enrojecimiento transitorio ocasional de la piel sana se explicó como una reacción secundaria de la CPX.

El documento WO 9937300 describe preparados en polvo que contienen hidroxipiridonas para tratar úlceras en las piernas.

La angiogénesis terapéutica mediante factores de crecimiento angiogénicos recombinantes o por terapia génica, ha llegado a ser una modalidad de tratamiento importante durante los últimos años (Höckel, M. *et al.* (1993) Therapeutic angiogenesis. *Arch. Surg.* 128, 423-429). En ensayos clínicos humanos continuos, la terapia génica VEGF se suministra para el tratamiento de isquemia límbica crítica e isquemia de miocardio. La terapia de VEGF también se ha investigado experimentalmente en ulceración gástrica y duodenal, además de en úlceras dérmicas y en sustitutos de la piel cultivada.

Ahora se ha encontrado que los compuestos de la fórmula I tienen una potente actividad angiogénica y angiogénesis inducida como es evidente por numerosos vasos unidos formados nuevamente. Adicionalmente, se ha encontrado que la aplicación tópica de CPX no lleva a burdas alteraciones sistémicas en la expresión de VEGF, que limita su función a regiones de aplicación tópica. Es bastante seguro y altamente ventajoso comparado con la terapia génica. Así, los compuestos de la fórmula I pueden usarse para el tratamiento de heridas y/o curado de heridas, porque la potente actividad angiogénica difiere considerablemente de la actividad anti-microbiana conocida de los compuestos de fórmula I. Así, no solo se evitan infecciones durante el tratamiento de heridas sino que el curado de heridas se mejora, por ejemplo, formando numerosos nuevos vasos en y alrededor de la herida.

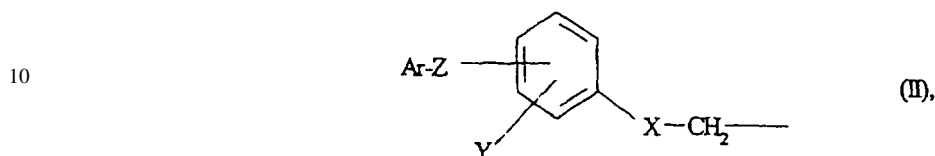
La invención se refiere, por lo tanto, al uso de 1-hidroxi-2-piridonas de la fórmula I



ES 2 282 615 T3

para la preparación de un compuesto farmacéutico para el tratamiento de heridas y/o cura de heridas, en las que las heridas se definen según la reivindicación 1, en que R^1 , R^2 y R^3 son idénticos o diferentes y son un átomo de hidrógeno o alquilo que tienen 1 a 4 átomos de carbono, y

5 R^4 es un radical hidrocarburo saturado que tiene 6 a 9 átomos de carbono o un radical de la fórmula II



15 en la que

X es S u O,

20 Y es un átomo de hidrógeno o hasta 2 átomos de halógeno tal como cloro y/o bromo,

Z es un enlace sencillo o un radical divalente que comprende

a) O, o

25 b) S, o

c) $-C(R^5)(R^6)-$; en el que R^5 y R^6 son idénticos o diferentes y son independientemente un átomo de hidrógeno o alquilo (C_1-C_4); o

30 d) otros radicales divalentes que tienen 2 a 10 carbonos en forma de una cadena, que comprende además opcionalmente uno o más de los siguientes:

i) un doble enlace carbono-carbono, o

35 ii) O, S, o una de sus mezclas, en la que si están presentes 2 o más átomos de O y/o S o una de sus mezclas, cada átomo de O o S está separado por al menos 2 átomos de carbono; y,

en cualquiera de los radicales bivalentes anteriores, las valencias libres de los átomos de carbono de dicho radical bivalente están saturadas por un átomo de hidrógeno, alquilo (C_1-C_4) o una de sus mezclas; y

40 Ar es un sistema anular aromático que tiene hasta dos anillos que pueden estar sustituidos por hasta tres radicales del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo, metoxi, alquilo (C_1-C_4), trifluorometilo y trifluorometoxi en forma libre o de sal.

45 En los radicales "Z", los miembros de cadena de carbono son grupos $-CH_2$ preferiblemente. Si los grupos $-CH_2-$ están sustituidos por grupos alquilo (C_1-C_4), son sustituyentes preferidos CH_3 y C_2H_5 .

Radicales ejemplares de "Z" son:

50 $-O-$, $-S-$, $-CH_2-$, $-(CH_2)_m-$ ($m = 2-10$), $-C(CH_3)_2-$, $-CH_2O-$, $-OCH_2-$, $-CH_2S-$, $-SCH_2-$, $-SCH(C_2H_5)-$, $-CH=CH-$, $-CH_2O-$, $-O-CH_2-CH=CH-CH_2O-$, $-OCH_2-CH_2O-$, $-OCH_2-CH_2CH_2O-$, $-SCH_2CH_2CH_2S-$, $-SCH_2CH_2CH_2CH_2O-$, $-SCH_2CH_2OCH_2CH_2-$, $-SCH_2CH_2OCH_2CH_2O-CH_2CH_2S-$ o $-S-CH_2-C(CH_3)_2-CH_2-S-$.

55 El radical "S" denota un átomo de azufre; el radical "O" denota un átomo de oxígeno. El término "Ar" denota fenilo o sistemas condensados tales como naftilo, tetrahidronaftilo e indenilo, y también sistemas aislados tales como aquellos que se derivan de bifenilo, difenilalcanos, difeniléteres y difeniltioéteres.

60 El término "radical hidrocarbonado saturado que tiene 6 a 9 átomos de carbono" significa que el radical puede ser de cadena lineal, ramificada o cíclica, y no contiene enlaces múltiples alifáticos, es decir, sin enlaces etilénicos o acetilénicos. Ejemplos del radical R^4 son por ejemplo, hexilo, heptilo, octilo, ciclohexilo o cicloheptilo.

65 El radical hidrocarbonado R^4 en el compuesto de fórmula I, es preferiblemente radical de alquilo (C_6-C_8) o ciclohexilo, que pueden también estar unido por medio de un grupo metileno o etileno al anillo de piridona o puede contener un grupo endometilo. R^4 también puede ser un radical aromático que, sin embargo, se enlaza preferiblemente al radical piridona por medio al menos de un átomo de carbono alifático.

ES 2 282 615 T3

Son importantes representantes de la clase de compuesto caracterizado por la fórmula I:

6-[4-(4-clorofenoxi)fenoximetil]-1-hidroxi-4-metil-2-piridona,

6-[4-(2,4-diclorofenoxi)fenoximetil]-1-hidroxi-4-metil-2-piridona,

6-(bifenilil-4-oximetil)-1-hidroxi-4-metil-2-piridona,

6-(4-bencil-fenoximetil)-1-hidroxi-4-metil-2-piridona,

6-[4-(2,4-dicloro-benciloxi)fenoximetil]-1-hidroxi-4-metil-2-piridona,

6-[4-(4-clorofenoxi)fenoximetil]-1-hidroxi-3,4-dimetil-2-piridona,

6-[4-(2,4-diclorobencil)fenoximetil]-1-hidroxi-3,4-dimetil-2-piridona,

6-[4-(cinnamiloxi)fenoximetil]-1-hidroxi-4-metil-2-piridona,

1-hidroxi-4-metil-6-[4-(4-trifluorometilfenoxi)fenoximetil]-2-piridona,

1-hidroxi-4-metil-6-ciclohexil-2-piridona,

1-hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetilpentil)-2-piridona,

1-hidroxi-4-metil-6-n-hexil-, -6-iso-hexil-, -6-n-heptil- o -6-iso-heptil-2-piridona,

1-hidroxi-4-metil-6-octil- o -6-iso-octil-2-piridona, en particular 1-hidroxi-4-metil-6-ciclohexil-metil- o -6-ciclohexil-etil-2-piridona, donde el radical ciclohexilo puede, en cada caso, llevar también un radical metilo,

1-hidroxi-4-metil-6-(2-biciclo[2,2,1]heptil)-2-piridona,

1-hidroxi-3,4-dimetil-6-bencil- o -6-dimetilbencil-2-piridona o

1-hidroxi-4-metil-6-(β -feniletíl)-2-piridona.

Los compuestos mencionados anteriormente de la fórmula I pueden emplearse tanto en forma libre como en forma de sal; el uso en forma libre se prefiere.

Si se usan bases orgánicas, se emplean preferiblemente bases poco volátiles, por ejemplo alcanolaminas de bajo peso molecular tales como etanolamina, dietanolamina, N-etiletanolamina, N-metildietanolamina, trietanolamina, dietilaminoetanol, 2-amino-2-metil-n-propanol, dimetilaminopropanol, 2-amino-2-metilpropanodiol, triisopropanolamina. Bases poco volátiles adicionales que pueden mencionarse aquí son, por ejemplo, etilendiamina, hexametilendiamina, morfolina, piperidina, piperazina, ciclohexilamina, tributilamina, dodecilamina, N,N-dimetildodecilamina, estearilamina, oleilamina, bencilamina, dibencilamina, N-etilbencilamina, dimetilestearilamina, N-metilmorfolina, N-metilpiperazina, 4-metilciclohexilamina, N-hidroxi-etilmorfolina. Las sales de hidróxidos de amonio cuaternario tales como hidróxido de trimetilbencilamonio, hidróxido de tetrametilamonio o hidróxido de tetraetilamonio pueden usarse, y además guanidina y sus derivados, en particular sus productos de alquilación. Sin embargo, también es posible emplear, por ejemplo, alquilaminas de bajo peso molecular tales como metilamina, etilamina o trietilamina, como agentes formadores de sal. Sales con cationes inorgánicos, por ejemplo, sales de metales alcalinos, en particular sales de sodio, potasio o amonio, sales de metal alcalinotérreo tales como en particular sales de magnesio o calcio, y sales con cationes di- a tetravalentes, por ejemplo sal de zinc, aluminio o zirconio, también son adecuados para que los compuestos se empleen según la invención.

Los compuestos de la fórmula I pueden prepararse, por ejemplo, mediante el procedimiento según los documentos US 2 540 218 o US 4 797 409.

La presente invención se refiere además al uso del compuesto de la fórmula I, en que Ar es un sistema bicíclico, que está derivado del bifenilo, difenilalcano o difeniléter.

La presente invención se refiere además al uso del compuesto de la fórmula I, que contiene un radical ciclohexilo en la posición R⁴.

La presente invención se refiere además al uso del compuesto de fórmula I, que contiene un radical octilo de la fórmula -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-C(CH₃)₃ en la posición R⁴.

La presente invención se refiere también al uso del compuesto de la fórmula I, en la que se emplea 1-hidroxi-4-metil-6-[4-(4-clorofenoxi)fenoximetil]-2-(1H)piridona, 1-hidroxi-4-metil-6-ciclohexil-2-(1H)piridona o 1-hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetilpentil)-2-(1H)piridona.

- 5 La presente invención se refiere también al uso de los compuestos de la fórmula I para la producción de un compuesto farmacéutico para el tratamiento de heridas en las que las heridas se definen según la reivindicación 1.

Debido a la inducción de angiogénesis se mejora la cura de heridas, porque nuevos vasos sanguíneos se forman y el suministro de la herida con nutrición y oxígeno se mejora. Así, también el curado de heridas de heridas no infectadas se aumenta dramáticamente. Los compuestos de la fórmula I no solo evitan infecciones de la herida, por ejemplo, bacterias u hongos, aunque solo soporta el curado de heridas mediante un mejor suministro de la herida por inducción de vasos sanguíneos nuevamente formados. Así, el curado de heridas no infectadas e infectadas, se mejora por el tratamiento de los compuestos de la Fórmula I.

- 15 El término “heridas” se entiende que significa, por ejemplo, heridas por aplastamiento, cortes, heridas enormes, heridas de bala, incisiones, heridas por presión, heridas de puñalada o heridas debido a cirugía o cirugía plástica.

El término “curado de heridas” se entiende que significa procedimientos regenerativos para el cerrado de una herida, especialmente la nueva formación de vasos capilares y el aumento de tejido conectivo y células epiteliales.

- 20 Los compuestos de la fórmula I y sus sales fisiológicamente tolerables se pueden administrar a animales, preferiblemente a mamíferos y, en particular, a seres humanos como compuestos farmacéuticos para el tratamiento de heridas y/o curado de heridas. Se pueden administrar solos o como mezclas con otros o en forma de preparaciones farmacéuticas que permiten la administración tópica. El término “mamífero” se entiende que significa, por ejemplo, ser humano, caballo, ternera, cerdo, rata, ratón, oveja o perro.

Los compuestos farmacéuticos pueden administrarse de forma percutánea o tópica, por ejemplo en la forma de emulsiones, ungüentos, disoluciones o tintes, polvos, o en otras formas, por ejemplo en forma de aerosoles o espumas. Para el uso según la invención de los compuestos mencionados, son adecuados preparados farmacéuticos líquidos, semisólidos y sólidos, en particular disoluciones, cremas, ungüentos, polvos y preparados en gel, donde se usa preferiblemente el último por su liberación aumentada del compuesto activo.

- 30 Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se preparan de un modo en sí conocido y familiar para las personas con experiencia en la técnica y se utilizan vehículos inorgánicos y/u orgánicos inertes farmacéuticamente aceptables además del compuesto o compuestos de fórmula I y/o sus sales fisiológicamente tolerables.

Los compuestos de la fórmula I pueden además incorporarse en o dentro de gasa quirúrgica, venda o vendaje.

- 40 Vendajes adecuados se ilustran más en detalle mediante los siguientes ejemplos:

Vendajes de alginato

Los vendajes de heridas de alginato están tejidos a partir de fibras de alginato de calcio. El alginato de calcio es un biopolímero marino que se deriva del alga marina. Los alginatos son altamente absorbentes. Cuando los vendajes de alginato entran en contacto con el exudado de la herida, se forma un gel blando, manteniendo un ambiente húmedo en la superficie de la herida que es propicio para la formación de tejido de granulación y epitelialización. Los vendajes de alginato están indicados para heridas de alta exudación, ya que tienen la capacidad de absorber tanto como 20 veces su peso.

- 50 *Vendajes compuestos*

Son generalmente multicapa, incorporando una capa no adherente que está en contacto con la herida, y varias capas absorbentes, drenantes y semi-oclusivas. La capa absorbente no incorpora una espuma, alginato, hidrocoloide o hidrogel. Un soporte de cinta adhesiva no tejido asegura el vendaje a la piel. Estos vendajes se usan como vendajes de cobertura para todas las fases del curado de heridas y son vendajes primarios para muchos tipos de heridas post-operatorias.

Capas de contacto

- 60 Las capas de contacto son vendajes de láminas delgadas colocadas directamente en una herida abierta para proteger el tejido dañado del contacto directo con otros agentes o vendajes aplicados a la herida. Siempre se usan vendajes secundarios con capas de contacto.

Vendajes de espuma

- 65 Los vendajes de espuma están hechos principalmente de poliuretano, aunque también se usa silicona. Están disponibles como o bien vendajes de espuma planos o como rellenos, y pretenden usarse en la granulación y heridas de epitelialización que producen algún exudado.

ES 2 282 615 T3

Gasa

Los vendajes de gasa tejida están hechos al 100% de hilo de algodón. Los hilos están tejidos horizontal y verticalmente, con 10 a 20 etapas separadas de fabricación empleadas en el procedimiento de producir una esponja de 12 capas de 4 x 4 pulgadas. Los vendajes de gasa tejida vienen en un amplio intervalo de tipos y se usan comúnmente para el envasado y desbridación.

La tela sin tejer no está ni tejida ni tricotada. Las fibras están unidas de tal forma que parece que están tejidas. La mayoría de los vendajes no tejidos están fabricados a partir de una mezcla de rayón y poliéster. El rayón proporciona suavidad y absorbencia, mientras que el poliéster proporciona fortaleza. La principal aplicación de los vendajes de gasa no tejidos es la absorción y la envoltura.

Vendajes de gasa impregnados

Los vendajes de gasa impregnados son materiales tejidos o no tejidos en los que se han incorporado sustancias dentro del material de vendaje.

Vendajes hidrocoloidales

Los vendajes hidrocoloidales son vendajes populares de segunda generación, que son moderadamente absorbentes, retienen la humedad, conformables a la herida y auto-adhesivos. También son oclusivos, formando una barrera contra la contaminación bacteriana. Además de estar disponibles en formas dimensionales, los hidrocoloides se suministran como polvos, gránulos, pastas y otras formas especializadas. Los principales componentes funcionales son gelatina, pectina o hidrocoloides relacionados. Están indicados para usar en úlceras de presión, quemaduras y una variedad de otros tipos de heridas.

Vendajes de hidrogel

Los hidrogeles son vendajes semipermeables de los que el agua es el componente principal. Se incluyen glicerina o propilenglicol como humectantes, y un almidón de co-polímero se añade a veces como absorbente. Los vendajes están disponibles como obleas impregnadas de gasa, láminas y geles amorfos, y están indicados para heridas de espesor parcial y total no drenantes a moderadamente drenantes.

Vendajes de película transparente

Los vendajes de película transparente son vendajes oclusivos que consisten en una membrana de poliuretano enmarcado por una capa adhesiva. Los vendajes varían en espesor, grado de oclusividad y otras propiedades. Los vendajes de película transparente están indicados para usar en pequeñas incisiones quirúrgicas, puntos de inserción para catéteres venosos periféricos y centrales, quemaduras superficiales, heridas de rotura de espesor parcial, y como vendajes secundarios.

Vendajes biológicos y biosintéticos

Este sector incluye

- un grupo de vendajes basados en colágeno, naturalmente absorbentes y compatible biológicamente
- vendajes contruidos de aminoácidos biocompatibles relacionados e hidrolisatos de proteína
- vendajes que combinan materiales derivados sintética y biológicamente

Los compuestos de la fórmula I pueden administrarse tópicamente a seres humanos y otros mamíferos tales como perro, gato, caballo, cerdo, ternera u oveja.

Los preparados farmacéuticos normalmente contienen de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5%, preferiblemente de 0,5% a 2%, especialmente preferiblemente 1%, en peso de los compuestos de la fórmula I y/o sus sales tolerables fisiológicamente. También son posibles porcentajes menores y mayores.

Además de los ingredientes activos de fórmula I y/o sus sales fisiológicamente aceptables y sustancias de transporte, los preparados farmacéuticos pueden contener aditivos tales como, por ejemplo, rellenos, ligantes, lubricantes, agentes humectantes, estabilizantes, emulsionantes, conservantes, colorantes, espesantes, diluyentes, sustancias tamponadoras, disolventes, solubilizantes, agentes para lograr un efecto prolongado, sales para alterar la presión osmótica, agentes de recubrimiento o antioxidantes. También pueden contener dos o más compuestos de la fórmula I y/o sus sales fisiológicamente tolerables. Asimismo, además de por lo menos un compuesto de la fórmula I y/o sus sales fisiológicamente tolerables, los preparados farmacéuticos también pueden contener uno o más ingredientes terapéutica o profilácticamente activos distintos. Dichos ingredientes activos adicionales pueden ser dexpantenol, alantoina, dextranómero, y/o extractos de la planta Echinacea.

Se ha de entender que los cambios que no afecten sustancialmente a la actividad de las distintas realizaciones de la presente invención están incluidos dentro de la invención aquí descrita. Así, los siguientes ejemplos tienen como fin ilustrar pero no limitar la presente invención.

5 Ejemplo 1

Inducción de la expresión del gen VEGF por CPX

Métodos

10

Cultivo celular

Las células HRCH05 que contienen un gen indicador dependiente de HIF-1, transfectado estable, se describieron anteriormente (Wanner, R. M., *et al.* (2000) Epolones induce erythropoietin expression via hypoxia-inducible factor-1 α activation. Blood **96**, 1558-1565). La línea celular hepatoma HepG2 humana se obtuvo de la Colección de Cultivos Tipo Americano (números ATCC HB-8065). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, alta glucosa, Life Technologies) suplementado con FCS inactivado por el calor al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin, 1 x aminoácidos no esenciales y 1 mM de Na-piruvato (todo comprado a Life Technologies) en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C. Las presiones parciales de oxígeno en la incubadora (Forma Scientific, modelo 3131) fueron o bien de 140 mm Hg (20% de O₂ v/v, normoxia) o 7 mm Hg (1% de O₂ v/v, hipoxia). La ciclopirox olamina (CPX), mesilato de deferoxamina (DFX) y 2,2'-dipiridilo (DP), se compraron a Sigma. Las disoluciones de existencias de CPX y DP se prepararon en metano a 0,5 M y 1 M, respectivamente. El DFX se disolvió recientemente a 10 mM en el medio de cultivo celular.

La transfección transitoria, el gen indicador y los ensayos de viabilidad de células HepG2 se electroporaron transitoriamente con una construcción de luciferasa conducida por un promotor de VEGF como se describe anteriormente (Ikeda, E., *et al.* (1995) Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. J. Biol. Chem. **270**, 19761-19766). Después de la estimulación, las células transfectadas transitoriamente y estables, se lisaron en tampón de lisis pasiva (Promega) y la actividad de la luciferasa se determinó usando un equipo de ensayo de luciferasa según las instrucciones del fabricante (Promega) en un luminómetro de 96 pocillos (MicroLumat LB96P, EG&G Berthold). La proliferación celular/viabilidad se ensayó mediante el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) como se describe (30, 31). Las absorbancias a 570 nm se determinaron en un fotómetro de 96 pocillos (Rainbow, SLT LabSystems).

Resultados

El CPX en una concentración de concentraciones de 5 μ M a 20 μ M indujeron fuertemente a la proteína HIF-1 α en células de hepatoma HepG2 normóxico después de 6 y 24 horas de tratamiento. Mientras no pudiera detectarse la proteína HIF-1 α en células normóxicas, la hipoxia (1% de O₂) también se induciría fuertemente por HIF-1 α . La combinación de CPX e hipoxia no aumentaría adicionalmente los niveles de HIF-1 α después de 6 horas, aunque disminuye bastante los niveles de HIF-1 α después de 24 horas de tratamiento.

Como se determinó por el manchado del Norte de mRNA derivado de células HepG2 tratadas con CPX, DFX y DP durante 24, 48 y 72 horas, quelantes de hierro indujeron además la expresión de los genes diana HIF-1 endógenos VEGF, transporte de glucosa-1 (Glut-1) y aldolasa, aunque no de los genes de control L28 y β -actina.

La funcionalidad de la expresión de mRNA de VEGF inducido por CPX se demostró adicionalmente por la acumulación de proteína VEGF en el sobrenadante del cultivo celular de HepG2, que aumentó de una manera dependiente de la dosis después de 6 o 24 horas de tratamiento.

50

Un gen indicador de luciferasa conducido por un fragmento promotor de VEGF de 1180 bp se transfectó transitoriamente en células HepG2, que se rompieron y trataron con concentraciones aumentadas de CPX durante 24 horas. Un aumento dependiente de la dosis en la actividad de luciferasa se observó, sugiriendo que la CPX activa transcripcionalmente la expresión de VEGF. En resumen, estos resultados demuestran que la CPX puede activar la transcripción endógena de VEGF, la expresión de mRNA y acumulación de proteína secretada.

Ejemplo 2

Falta de inducción del gen diana HIF-1 por CPX en el riñón de rata perfundido aislado

60

El DFX administrado sistémicamente puede inducir la estabilidad del HIF-1 ubicado y la expresión de eritropoyetina específica del riñón en ratones (Wang, G. L., y Semenza, G. L. (1993) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. Blood **82**, 3610-3615). Considerando una aplicación tópica de CPX como un agente inductor de HIF-1 para angiogénesis terapéutica, era importante probar si el CPX podría llevar a una inducción sistémica de VEGF. Como un modelo *ex vivo*, se perfundieron riñones de rata aislados durante 3 horas bajo condiciones normóxicas con concentraciones aumentadas de CPX. Sin embargo, la CPX no indujo los niveles de mRNA de los genes diana HIF-1 de VEGF, Glut-1 o aldolasa a concentraciones que oscilaban de 0,1 μ M a 100 μ M. Las mayores concentraciones

de CPX (33 μ M y 100 μ M) llevaron a una baja regulación de la función del riñón como se indicaba por un fuerte aumento en las velocidades de excreción de albúmina y sodio. Después de la perfusión con oxígeno al 3% durante 3 horas, se observó un aumento en los niveles de mRNA de Glut-1, aunque no en los de VEGF y aldolasa, que no se elevó adicionalmente por la CPX.

Ejemplo 3

Inducción de angiogénesis en la membrana corioalantoidea de pollo (CAM) por ensayo de CPX en la membrana corioalantoidea de pollito (CAM)

Método

Los ensayos en CAM se realizaron como se describe por Olivo, M. *et al.* (A comparative study on the effects of tumor necrosis factor- α (TNF- α), human angiogenic factor (h-AF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the chorioallantoic membrane of the chick embryo, (1992). Anat. Rec. **234**, 105-115). Brevemente, los huevos fecundados (comprados en Lohmann Tierzucht, Cuxhaven, Alemania) se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada. Los huevos se dejaron sobre sus laterales y se volvieron del revés dos veces al día. Después de 6 días, se taladró un pequeño agujero a través de la cáscara en el saco de aire (visualizado usando una fuente de luz fuerte) y se serró una ventana de aproximadamente 0,5 cm² en el lateral del huevo. La ventana se selló con cinta y los huevos se incubaron de nuevo hasta el día 9, cuando se aplicó sal de 2-aminoetanol de 6-Ciclohexil-1-hidroxi-4-metil-2(1H)-piridona (CPX) a la CAM usando el método Elvax[®] (véase Olivo, M. *et al.* anteriormente). Por lo tanto, gotas de copolímero de etileno/acetato de vinilo (Elvax[®] 40L-03, DuPont, proporcionado por C. H. Erbslöh KG, Krefeld, Alemania) se lavaron ampliamente en etanol y se secaron a presión reducida. Las gotas de Elvax[®] se disolvieron entonces en cloruro de metileno al 10% (p/v) y se añadió CPX a la concentración deseada. Una gota (40 μ L) de esta disolución se pipeteó en una lámina de cristal silicatado y el disolvente se dejó evaporar completamente. Usando forceps, el disco de Elvax[®] se levantó cuidadosamente de las láminas de cristal y se colocó en la CAM. Al día 11, la ventana se amplió y la CAM se documentó usando una cámara digital (Olympus) acoplada a un ocular de un estereomicroscopio.

Resultados

Basado en las observaciones que la CPX indujo en la expresión de VEGF en el cultivo celular (véase el ejemplo 1), la capacidad angiogénica en un modelo *in vivo* de angiogénesis se analizó. Por lo tanto, la CAM de pollo en el día 9 de desarrollo se recubrió con discos de polímero inerte que contenían diversas concentraciones de CPX o sólo disolvente. Después de dos días de incubación, no se pudieron observar señales de angiogénesis con los discos de control de disolvente. En contraste, los discos de polímero que contenían 50 mM CPX indujeron consistentemente la angiogénesis de la CAM como era evidente por numerosos vasos unidos radialmente, nuevamente formados. Un total de 10 CAM tratadas con 50 mM CPX mostraron angiogénesis similar, mientras todas las 7 CAM de control no tenían ninguna señal de angiogénesis. 5 mM CPX era indistinguible para los controles y 500 mM CPX era tóxico para el embrión de pollo.

Ejemplo 4

Modelo de herida en la piel de ratón

Método

Ambas orejas de ratones adultos NMRI se hirieron bajo anestesia con 100 mg/kg de Ketamina (Narketan[®]) y 5 mg/kg de Xilazina (Rompun[®]) mediante agujeros de perforación de 2 mm de diámetro usando una herramienta estándar de perforación de orejas. Las orejas se trataron diariamente con una crema para la piel común que contiene (Batrafen[®]) o no conteniendo CPX al 1% (p/v). Una oreja se trató con CPX y la otra oreja con la crema de control. La cantidad de crema fue suficiente para cubrir el agujero y se distribuyó igualmente sobre la oreja entera.

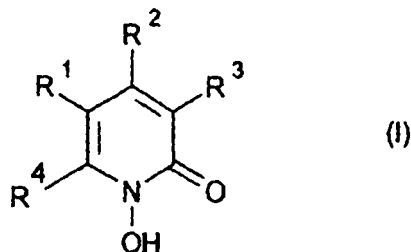
Resultados

El CPX puede inducir la angiogénesis en un modelo de herida en la piel de un ratón

Los agujeros de las orejas perforados de 2 mm de diámetro (una forma extendida de marcar ratones en instalaciones de animales) se trataron diariamente con una crema dérmica disponible comercialmente que contiene CPX al 1% en una oreja y una crema dérmica normal libre de CPX aunque por lo demás idéntica, en la otra oreja, respectivamente. La CPX puede provocar enrojecimiento del borde de la herida que nunca se observó en el área de la piel sana de la misma oreja. En esta serie, 4 de 10 animales mostraron efectos similares y ninguno de los animales tuvo enrojecimiento más pronunciado en el borde de la herida tratada con placebo que en el borde de la herida tratada con CPX. El enrojecimiento inducido por CPX sería crecimiento de los vasos mejorado.

REIVINDICACIONES

1. El uso de 1-hidroxi-2-piridonas de la fórmula I



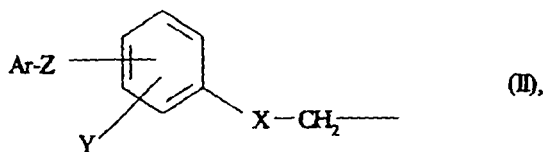
para la preparación de un compuesto farmacéutico para la cura de heridas,

en la que las heridas son heridas por aplastamiento, cortes, heridas de disparo, incisiones, heridas por presión, heridas por apuñalamiento o heridas debidas a cirugía o cirugía plástica,

en el que el compuesto de la fórmula I se administra tópicamente en forma de emulsiones, ungüentos, disoluciones, tinturas, polvos, crema o preparado en gel o en forma de aerosoles o espumas,

en la que R^1 , R^2 y R^3 son idénticos o diferentes y son un átomo de hidrógeno o alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono, y

R^4 es un radical hidrocarburo saturado que tiene 6 a 9 átomos de carbono o un radical de la fórmula II



en la que

X es S u O,

Y es un átomo de hidrógeno o hasta 2 átomos de halógeno tal como cloro y/o bromo,

Z es un enlace sencillo o un radical divalente que comprende:

a) O, o

b) S, o

c) $-C(R^5)(R^6)-$; en el que R^5 y R^6 son idénticas o diferentes y son independientemente un átomo de hidrógeno o (C_1-C_4) -alquilo; o

d) otros radicales divalentes que tienen 2 a 10 carbonos en forma de una cadena, que comprende además opcionalmente uno o más de los siguientes:

i) un doble enlace carbono-carbono, o

ii) O, S, o una de sus mezclas, en la que si 2 o más átomos de O y/o S o una de sus mezclas está presente, cada átomo de O o S está separada por al menos 2 átomos de carbono; y,

en cualquiera de los radicales bivalentes anteriores, las valencias libres de los átomos de los carbonos de dicho radical bivalente están saturadas por un átomo de hidrógeno, alquilo (C_1-C_4) o una de sus mezclas; y

Ar es un sistema anular aromático que tiene hasta dos anillos que pueden sustituirse por hasta tres radicales del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo, metoxi, alquilo (C_1-C_4) , trifluorometilo y trifluorometoxi en forma libre o de sal.

ES 2 282 615 T3

2. El uso según la reivindicación 1, en la que

Ar en el compuesto de la fórmula I es un sistema bicíclico, que se deriva de bifenilo, difenilalcano o difeniléter.

5 3. El uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I contiene un radical ciclohexilo en la posición R⁴.

10 4. El uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I contiene un radical octilo de la fórmula -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-C(CH₃)₃ en la posición R⁴.

5 10 5. El uso según una o más de la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula I es 1-hidroxi-4-metil-6-[4-(4-clorofenoxi)fenoximetil]-2-(1H)piridona, 1-hidroxi-4-metil-6-ciclohexil-2-(1H)piridona o 1-hidroxi-4-metil-6-(2,4,4-trimetilpentil)-2-(1H)piridona.

15 6. El uso según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto de fórmula I se administra como sí mismo, o en mezclas con otro.

20 7. El uso según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la dosis del compuesto de fórmula I en el preparado farmacéutico es de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5%, preferiblemente de 0,5% a 2%, especialmente preferiblemente 1% en peso del compuesto de la fórmula I y/o sus sales tolerables fisiológicamente.

25 8. El uso según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el preparado farmacéutico contiene además un ingrediente activo tal como dexpantenol, alantoina, dextranómero o extractos de la planta Echinacea o una mezcla de dichos ingredientes.

30

35

40

45

50

55

60

65