



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 280 136**

② Número de solicitud: 200600377

⑤ Int. Cl.:

A61K 31/6615 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

C07F 3/06 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **17.02.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2007**

Fecha de la concesión: **22.07.2008**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2008**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.08.2008

⑰ Titular/es: **Universitat de les Illes Balears
Campus Uniersitario
Ctra. Valldemossa, Km. 7,5 - Edif. Son Lledó
07071 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES**

⑱ Inventor/es: **Grases Freixedas, Félix;
Perelló Bestard, Joan;
Isern Amengual, Bernat;
Sanchis Cortés, Pilar;
Prieto Almirall, Rafael M. y
Costa Bauzà, Antonia**

⑲ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑳ Título: **Asociación a dosis fija de fitato y zinc.**

㉑ Resumen:

Asociación a dosis fija de fitato y zinc.

La invención se refiere a una asociación a dosis fija de fitato y zinc en proporciones sinérgicas para utilizar en el tratamiento de la cristalización de la hidroxiapatita. Ventajosamente, dicha asociación está en una relación molar entre el fitato y el zinc superior a 4:1.

La invención también se refiere a la utilización de dicha asociación para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento, profilaxis y/o prevención de la cristalización de la hidroxiapatita humanos.

ES 2 280 136 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Asociación a dosis fija de fitato y zinc.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una asociación a dosis fija de fitato y zinc en proporciones sinérgicas para utilizar en el tratamiento de la cristalización de la hidroxiapatita.

10 La invención también se refiere a la utilización de dicha asociación para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento, profilaxis y/o prevención de la cristalización de la hidroxiapatita humanos.

Antecedentes de la invención

15 En general, cualquier proceso de cristalización patológica es consecuencia del desequilibrio entre tres grupos de factores: sobresaturación, promotores de la cristalización (básicamente nucleantes heterogéneos) y represores de la cristalización (inhibidores de la cristalización y mecanismos celulares de defensa).

20 Un sistema está sobresaturado respecto a un soluto cuando lo contiene en cantidades superiores a la establecida por su producto de solubilidad. Se trata, pues, de un factor termodinámico y solamente es una cuestión cinética (es decir, del tiempo transcurrido) que acabe por formarse el correspondiente sólido.

25 Los promotores o nucleantes heterogéneos son sustancias que facilitan la formación del cristal, disminuyendo el período de inducción al evitar la etapa de nucleación homogénea. Se trata, por tanto, de factores cinéticos.

Los inhibidores de la cristalización son sustancias que dificultan o impiden el desarrollo de cristales. Pueden actuar a nivel de nucleación (adsorbiéndose sobre el núcleo homogéneo o heterogéneo en formación), de crecimiento cristalino (adsorbiéndose sobre las caras del cristal en formación) o en ambos procesos a la vez. Por tanto, se trata también de factores cinéticos.

30 El *myo*-inositol hexafosfato (fitato) es el inhibidor más poderoso que se conoce del desarrollo de sales cálcicas, y actúa sobre la nucleación heterogénea del oxalato cálcico, sobre el crecimiento cristalino del oxalato cálcico y sobre la nucleación homogénea y heterogénea del fosfato cálcico. El fitato, junto con el pirofosfato, presenta efectos inhibidores tanto sobre la cristalización de la brushita como sobre la de la hidroxiapatita. Ambos compuestos son dos de las formas en las que puede cristalizar el fosfato cálcico, componente mayoritario de las mineralizaciones patológicas vasculares.

35 Recientemente, se ha demostrado que el fitato está presente en todos los órganos, tejidos y fluidos biológicos de los mamíferos, entre los cuales se encuentra el hombre. Además, se ha demostrado que la mayoría de fitato extracelular encontrado en órganos, tejidos y fluidos de los mamíferos tiene un origen dietético y no es consecuencia de síntesis endógena, mientras que el fitato intracelular (que se encuentra en concentraciones muy inferiores) probablemente se origina en el interior de la célula. Por tanto, sus niveles en el organismo están directamente relacionados con su aporte exógeno, bien sea a través de su ingesta dietética o por aplicación tópica.

40 El plasma sanguíneo siempre está sobresaturado respecto al fosfato cálcico debido a los valores de concentración de fosfato, de calcio y pH. De hecho, frecuentemente se encuentran calcificaciones en el sistema cardiovascular, alterando la flexibilidad de los vasos sanguíneos y promoviendo la trombosis y la ruptura arterial. Cuando estas calcificaciones aparecen en las válvulas cardíacas éstas están asociadas a diversos desórdenes que, si no se corrigen, pueden conducir al fallo cardíaco y a la muerte.

50 Actualmente, se conocen diversos factores de riesgo que se asocian al desarrollo de calcificaciones en las arterias coronarias, como son la enfermedad renal, edad avanzada, colesterol plasmático elevado (disminución del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad e incremento del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad), obesidad y niveles de triglicéridos elevados, agentes citotóxicos (tabaquismo) e infecciones bacterianas.

55 Debe tenerse en cuenta que la aparición de calcificaciones cardiovasculares puede empezar en la segunda década de vida, y que las calcificaciones coronarias afectan al 50% de las personas entre 40 y 49 años, y al 80% de las personas entre 60 y 69 años.

60 El mecanismo exacto de formación de una calcificación vascular implica diversas etapas, pero en general, es necesaria la preexistencia de una lesión que actúe como inductora (nucleante heterogéneo) de la calcificación (fosfato cálcico, generalmente en forma de hidroxiapatita). El posterior desarrollo de la calcificación dependerá del balance de los factores restantes (sobresaturación, inhibidores de la cristalización, moduladores celulares de la calcificación).

65 Por lo tanto, un factor importante para evitar el desarrollo de las calcificaciones cardiovasculares es la presencia de inhibidores de la cristalización. En un trabajo reciente se ha demostrado la acción preventiva del fitato sobre el desarrollo de calcificaciones cardiovasculares cuando se aplica por vía tópica (Véase PCT/IB2004/003588).

ES 2 280 136 B1

En un campo diferente, la hidroxiapatita también se acumula en la cavidad bucal por mineralización de la placa bacteriana dental. La placa bacteriana dental es un depósito sobre los dientes que no puede ser eliminado con agua a presión o simplemente enjuagándose. El cepillado ayuda a la prevención de una acumulación rápida de estos depósitos, pero incluso el cepillado regular no es suficiente para eliminar todos los depósitos que se adhieren a los dientes. La placa que se adhiere a la superficie del diente se puede calcificar (placa dental calcificada) formando el sarro, tartar o cálculo dental. Así, la placa es un precursor del cálculo. Sin embargo, al contrario que el cálculo, la placa se puede formar en cualquier parte de la superficie del diente, particularmente en el margen gingival. Por lo tanto, la presencia de placa en los dientes, además de ser antiestética, puede ser precursora del desarrollo de gingivitis y enfermedades periodónticas. Hay una correlación directa entre la cantidad de placa bacteriana y la severidad de la gingivitis.

El sarro o cálculo son depósitos calcificados en los dientes que se forman por la mineralización de la placa, la cual se inicia en un período de 24-72 horas y tarda un promedio de 12 días en madurar. Está formado por materia orgánica e inorgánica con una composición muy similar a otras calcificaciones patológicas observadas en el organismo (litiasis renal, calcinosis cutis, etc.):

- Materia orgánica: procede principalmente de microorganismos (bacterias, hongos, etc..) que se encuentran unidos unos a otros formando colonias, aunque también puede proceder de los restos de alimentos que permanecen en la cavidad bucal.
- Materia inorgánica: constituida en gran parte por calcio y ortofosfato presentes en la saliva que se encuentran dispuestos en una red cristalina denominada hidroxiapatita (HAP).

La formación de los cálculos ocurre en dos etapas. En la primera de ellas, se deposita la placa bacteriana sobre los dientes, la cual está formada por bacterias vivas y muertas rodeadas por una matriz gelificada derivada de las bacterias y de la saliva. En la segunda fase, dicha placa sufre un proceso de mineralización hasta formar el cálculo dental. Inicialmente, empieza a depositarse fosfato cálcico amorfo en y dentro de la matriz extracelular de la placa dental, que llega a estar lo suficientemente empaquetado para que los agregados sean resistentes a la deformación, convirtiéndose en última instancia en el material cristalino HAP. El fosfato cálcico amorfo, aunque relacionado con la HAP, difiere de él en su estructura cristalina, morfología de las partículas y estequiometría.

La inhibición de la formación de HAP se ha probado mediante la acción de inhibidores, secuestradores, supresores eficaces de iones calcio y magnesio y/o agentes quelantes. Se han usado para ello polifosfatos deshidratados tales como hexametafosfatos, tripolifosfatos, pirofosfatos y similares solubles en agua.

Así, nos encontramos con una gran cantidad de patentes (EE.UU. 3.488.419; EE.UU. 4.215.105; EE.UU. 4.515.772) que utilizan o hacen referencia al uso y funciones de estos polifosfatos propuestos hasta ahora en composiciones orales. Sin embargo, como se describe en la patente de EE.UU. 4.627.977, los polifosfatos deshidratados lineales se hidrolizan de forma significativa en la cavidad oral y/o en la saliva mediante las enzimas de la saliva (fosfatasas) a ortofosfatos, los cuales no presentan acción inhibitoria de la formación de HAP; aunque dicha hidrólisis se reduce mediante el uso combinado de estos polifosfatos con fluoruro (como se describe en la patente de EE.UU. 4.808.4109) y también con el ión fluoruro formando parte de un polímero de polocarboxilato en el documento US-A-4.627.977, todavía no se ha encontrado un tratamiento eficaz para la inhibición de la hidroxiapatita.

Por otra parte, la patente estadounidense US5300289 describe composiciones orales antimicrobianas con fitato para el cuidado bucal. Las composiciones orales descritas contienen ácido fítico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un compuesto antimicrobiano catiónico y un agente compatibilizador para el control del cálculo dental, placa dental, gingivitis, periodontitis y/o mal aliento. En particular, describe una composición que comprende: (1) de 0,001 a 10% en peso de uno o más compuestos que presentan enlaces C-O-P, donde el compuesto que presenta el enlace C-O-P es myo-inositol hexakis(dihidrogeno fosfato), myo-inositol pentakis(dihidrogeno fosfato), myo-inositol tetrakis(dihidrogeno fosfato) o una sal fisiológicamente aceptable de estos; (2) de 0,001 a 10% en peso de uno o más compuestos antimicrobianos catiónicos; y (3) de 0,1 a 20% en peso de uno o más agentes compatibilizadores. Como compuesto antimicrobiano catiónico describe una lista de 10 posibles compuestos o sus derivados. Los agentes compatibilizadores se seleccionan entre ácidos y sus sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, o mezclas de los mismos. También se describe que la presencia de un ión metálico seleccionado entre estroncio, magnesio, estaño, zinc, calcio o mezclas de los mismos en la composición mencionada no produce la precipitación del ácido fítico de la composición en solución y, por lo tanto, su adición en la composición descrita ayudará en la supresión del mal aliento. La relación molar entre dicho ión metálico y el ácido fítico puede estar presente en una composición oral desde 4:1 hasta 1:4, preferiblemente desde 3:1 hasta 1:3 y todavía, más preferiblemente, en una relación 1:1.

Por otro lado, el fitato ya ha sido utilizado en composiciones orales. Así, en las patentes US-4.259.316 y US-4.335.102 se utiliza el fitato en combinación con un compuesto de estaño (II). Sin embargo, la formación de complejos entre el fitato y el estaño no son efectivas para la inhibición de la formación de cálculos.

También en la patente de US-3.934.002 se utiliza el fitato juntamente con una bisbiguanida como agente antiplaca y anticaries. Sin embargo, ambos compuestos reaccionan entre sí con lo que no se pueden distribuir de forma homogénea a través de la composición oral, llegando a formar incluso dos fases claramente visibles.

Se han desarrollado un gran número de composiciones que comprenden distintas combinaciones de agentes antiplaca y antigingivitis, conjuntamente o de forma opcional con otros compuestos como, por ejemplo, agentes anticálculos que tienen por objeto eliminar la etiología bacteriana y los factores de riesgo.

- 5 Sin embargo, no existe todavía un tratamiento adecuado que permita la inhibición de la cristalización de la hidroxiapatita con buenos resultados.

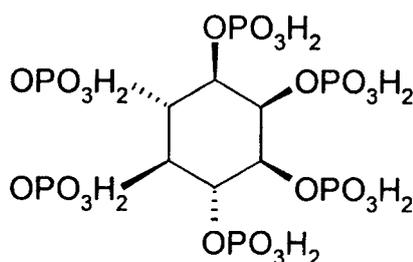
Descripción de la invención

- 10 El problema a solucionar por la presente invención puede plantearse como una vía alternativa para inhibir la cristalización de la hidroxiapatita en humanos, con efectos sorprendentes, en particular en el desarrollo de cálculos dentales y en la calcificación de hidroxiapatita en arteria, vena, corazón, cerebro, pulmón y piel.

- 15 La solución se basa en una asociación a dosis fija de fitato y zinc con efectos sinérgicos en la inhibición de la cristalización de la hidroxiapatita. La combinación de fitato y zinc no ha sido descrita como mezcla sinérgica frente a la cristalización de la hidroxiapatita y en ningún caso se explica el efecto sinérgico entre el fitato y el zinc dando lugar a un aumento del efecto inhibidor de la cristalización del fitato frente a la hidroxiapatita.

Definiciones

- 20 En la presente invención, por "fitato" o "myo-inositol hexafosfato" se entiende la molécula que corresponde a la fórmula:



- 40 y sus sales correspondientes, las cuales incluyen, pero no se limitan a sales de sodio, potasio, calcio, magnesio o cálcico-magnésica.

- En la presente invención por "inhibidor de la cristalización" se entiende una sustancia que es capaz de disminuir o evitar la formación de mineralizaciones.

- 45 Entre las mineralizaciones más conocidas se destacan las cardiovasculares, bucodentales o en otras partes del organismo, principalmente calcificaciones, debido a su acción de prolongación del tiempo de inducción de la cristalización.

- En la presente invención, por "mineralización cardiovascular" se entiende cualquier concreción sólida acumulada en la pared de un vaso sanguíneo o cualquier parte del corazón.

50 Descripción detallada de la invención

- El objetivo general de la presente invención es inhibir la formación de la hidroxiapatita. Dicha sal forma mineralizaciones en el organismo que, en general, pueden evitarse o reducirse con el fitato presente en el organismo. Sin embargo, cuando no es así, no existe todavía una composición, mezcla o tratamiento que permita de manera eficaz 55 inhibir la cristalización de la hidroxiapatita de manera externa.

- La presente invención proporciona una asociación de fitato y Zn^{2+} para el tratamiento, prevención y/o profilaxis de la formación de hidroxiapatita en el sistema cardiovascular y la cavidad bucodental. Así mismo, la presente invención proporciona una asociación de fitato y Zn^{2+} para el tratamiento, prevención y/o profilaxis de la formación de hidroxiapatita en las articulaciones, glándulas mamarias, riñón, cerebro, pulmón y piel, pues la inhibición de la cristalización de una sal en un tejido blando depende de la concentración de inhibidor que se pueda alcanzar en dicho tejido. Las concentraciones de fitato en tejidos blandos son similares (y en el cerebro son 10 veces superiores) por lo que en estos tejidos blandos se espera el mismo efecto que en el tejido cardiovascular.

- 65 En particular, los autores de la presente invención han encontrado que la presencia de zinc en una asociación de fitato y zinc, da lugar a un aumento del efecto inhibidor de la cristalización del propio fitato (no presentando el zinc por sí solo ningún efecto inhibidor de la cristalización de la hidroxiapatita). El zinc se adsorbe sobre el núcleo en formación o cristal en crecimiento de hidroxiapatita. Al ser la afinidad del fitato por el zinc superior a la del calcio,

ES 2 280 136 B1

la adsorción de zinc sobre la hidroxiapatita aumenta la afinidad del fitato por el núcleo en formación o cristal en crecimiento, potenciando su efecto inhibitor de la cristalización.

5 Sorprendentemente, se ha encontrado que una asociación de fitato y zinc a una relación molar superior a 4:1 da lugar a un aumento del efecto inhibitor de la cristalización del fitato del orden del 40%; siempre dependiendo del período de inducción y de la relación molar fitato/zinc.

10 Ventajosamente, una relación molar igual al 5:1, después de 10 minutos de período de inducción de la cristalización da lugar a un aumento del efecto inhibitor de la cristalización del fitato del orden del 50% (véase figura 2).

10 En la presente invención se demostrará, a continuación, el efecto sinérgico de una asociación de fitato y Zn^{2+} sobre la cristalización de la hidroxiapatita. Véanse, en particular, los ejemplos 1 y 2 que siguen.

15 Posteriormente y de forma sorprendente, también se demostrará como una asociación de fitato y Zn^{2+} inhibe el desarrollo de calcificaciones de hidroxiapatita en fragmentos de válvula aórtica humana implantados en ratas Wistar. Los autores de la presente invención han encontrado un efecto sinérgico de una asociación de fitato y Zn^{2+} , en especial, por vía oral, que inhibe el desarrollo de calcificaciones cardiovasculares con resultados excelentes (Véase ejemplo 3).

20 Los autores de la presente invención también han estudiado el efecto de una asociación de fitato y Zn^{2+} de acuerdo con la presente invención sobre la formación de hidroxiapatita en la cavidad bucodental en un individuo sometido a diferentes tratamientos (Véanse los ejemplos 4 y 5). El objetivo en este caso es incrementar la capacidad inhibitor de la saliva frente a la cristalización de sales cálcicas y prevenir complicaciones de formación de las biomineralizaciones cálcicas, mediante el uso de una composición oral que comprende la asociación de fitato y Zn^{2+} . La base para el uso de un enjuague con fitato y Zn^{2+} es la disminución del riesgo de formación de biomineralizaciones de hidroxiapatita y se fundamenta en los siguientes hechos:

30 (1) El fitato es un potentísimo inhibitor de la nucleación homogénea, heterogénea y crecimiento cristalino de la hidroxiapatita y otros fosfatos cálcicos. Como consecuencia de esta acción se inhibe la cristalización de la hidroxiapatita y se impide el desarrollo de micropartículas de fosfato cálcico adheridas al diente.

(2) El fitato se encuentra presente en la saliva humana, variando su concentración en función de la alimentación del individuo.

35 (3) Determinados individuos con déficit salival de fitato pueden presentar cálculos de hidroxiapatita sublinguales.

(4) El fitato presenta la ventaja de ser un producto natural presente en la saliva humana más resistente a la acción de las fosfatasas salivales que otros polifosfatos lineales.

40 (5) La asociación sinérgica de fitato y Zn^{2+} presenta *in vitro* unos resultados sobre la inhibición de la cristalización de la hidroxiapatita más importantes que el fitato por sí solo.

45 Por lo tanto, cualquier forma farmacéutica ya sea un enjuague bucal, un complemento vitamínico u otra forma de administración que comprenda la asociación sinérgica de fitato y Zn^{2+} según la presente invención forma parte del alcance de la misma.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de una asociación de fitato y Zn^{2+} sobre la hidroxiapatita *in vitro*.

50 En dicha figura 1 puede observarse que la primera curva corresponde a la precipitación directa sin fitato ni Zn^{2+} . La segunda (Zn^{2+}) consiste en la adición de $0,038 \mu M$ de Zn^{2+} . Como puede observarse no se aprecia ningún efecto inhibitor. La tercera curva (Fitato) corresponde a la precipitación de hidroxiapatita en presencia de $0,38 \mu M$ de fitato. Se aprecia un importante efecto inhibitor de la cristalización. Finalmente, la última representación (Fitato + Zn^{2+}) corresponde a la precipitación en presencia de $0,38 \mu M$ de fitato y $0,038 \mu M$ de Zn^{2+} (relación molar fitato-Zn 10:1). Se observa como la precipitación de hidroxiapatita es inhibida totalmente. Además, no se trata de un efecto aditivo, sino de un efecto sinérgico, pues el Zn por sí solo no presenta ningún efecto inhibitor.

La Figura 2 muestra el efecto de una asociación de fitato y Zn^{2+} sobre la hidroxiapatita *in vitro*.

60 En dicha figura 2 puede observarse que la primera serie corresponde a la precipitación directa sin fitato ni Zn^{2+} . La segunda consiste en la adición de $0,3 \mu M$ de Zn^{2+} . Como puede observarse no se aprecia ningún efecto inhibitor. La tercera serie corresponde a la precipitación de hidroxiapatita en presencia de $1,5 \mu M$ de fitato. Se aprecia un importante efecto inhibitor de la cristalización.

65 Finalmente, se muestran dos series utilizando fitato $1,5 \mu M$ y dos concentraciones diferentes de zinc: Zn^{2+} : $0,3 \mu M$ (relación molar fitato-Zn 5:1) y $0,15 \mu M$ (relación molar fitato-Zn 10:1), respectivamente. Se observa como existe un efecto sinérgico entre el fitato y el Zn^{2+} , pues el Zn por sí solo no presenta ningún efecto inhibitor.

ES 2 280 136 B1

La Figura 3 muestra el efecto de una asociación de fitato y Zn^{2+} sobre la hidroxiapatita formada en válvulas aórticas humanas implantadas en ratas Wistar. En dicha figura puede observarse la disminución estadísticamente significativa del grado de calcificación en válvulas en el grupo tratado con una dieta con fitato + Zn^{2+} respecto al grupo control tratado con una dieta sin fitato.

5

Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos del alcance de la misma.

10

Ejemplo 1

Se diseñó un sistema *in vitro* para estudiar la cinética de precipitación de la hidroxiapatita. Se trabajó con un sistema utilizando las siguientes condiciones experimentales: [fosfato] = 1,5 mM, $[Ca^{2+}] = 60$ mg/l, pH = 7,5. Se registró la cinética de precipitación de la hidroxiapatita con un espectrofotómetro Shimadzu (UV-120-02) trabajando con cubetas de plástico de 3 ml y registrando la absorbancia cada 5 minutos a 550 nm. Los resultados se muestran en la figura 1. Se observó como la precipitación de hidroxiapatita era inhibida totalmente, con la mezcla sinérgica fitato-Zn, usando la relación molar 10:1.

Ejemplo 2

Con el mismo sistema que el ejemplo 1, se trabajó con un sistema utilizando las siguientes condiciones experimentales: [fosfato] = 2,5 mM, $[Ca^{2+}] = 60$ mg/l, pH = 7,5. Se registró la cinética de precipitación de la hidroxiapatita con un espectrofotómetro Shimadzu (UV-120-02) trabajando con cubetas de plástico de 3 ml y registrando la absorbancia cada 5 minutos a 550 nm. Los resultados se muestran en la figura 2. Se observó como existe un efecto sinérgico entre el fitato y el Zn^{2+} , pues el Zinc por sí solo no presenta ningún efecto inhibitorio.

25

Ejemplo 3

Se aclimataron 12 ratas Wistar macho de aproximadamente 250 g (procedentes de Harlan Iberica s.l., Barcelona, España) durante 7 días en nuestro estabulario, cuyas condiciones de temperatura y humedad eran $21 \pm 1^\circ C$ y $60 \pm 5\%$ respectivamente y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas. Las ratas se estabularon en jaulas de Plexiglas, con dos animales por jaula, y se alimentaron con comida y bebida *ad libitum*.

Después del período de aclimatación, los animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos de 6 ratas, un grupo control, tratado solamente con Zn^{2+} , alimentado con la dieta AIN-76A (una dieta purificada carente en fitato y con un 0,003% de Zn^{2+}) y un grupo tratado con la misma dieta y un suplemento del 1% de fitato en forma de sal cálcico-magnésica (relación molar fitato- Zn^{2+} (30:1). Después de 16 días se implantaron a cada animal 2 fragmentos de válvula aórtica humana sin calcificar en la región abdominal. El tratamiento con las dietas se prolongó durante 30 días más después de la implantación. Después de este período, se recogieron muestras de orina de 24 horas para la determinación de fitato y, posteriormente, los animales se anestesiaron con pentobarbital (50 mg kg^{-1} , i.p.) y las válvulas fueron extraídas y secadas.

Se estudió la superficie y el interior de algunas de las placas implantadas por microscopía electrónica de barrido, y se compararon con fragmentos de válvula sin implantar. Los resultados fueron los siguientes: a. Superficie de un fragmento de válvula sin implantar, donde no se apreciaba calcificación. b. Superficie de un fragmento de válvula implantado durante 30 días en una rata del grupo control, donde se observó una capa de fosfato cálcico, con estructura de hidroxiapatita aspidínica. c. Interior de un fragmento de válvula implantado durante 30 días en una rata del grupo control donde se observó la calcificación de fosfato cálcico.

50

Posteriormente se realizó una digestión ácida de las placas utilizando una mezcla $HNO_3:HClO_4$ 1:1, determinando el calcio total por espectroscopia de emisión atómica utilizando un plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). Los resultados, expresados en porcentaje en peso de calcio en el fragmento, pueden observarse en la Figura 3.

Los procedimientos utilizados en este experimento se han realizado de acuerdo con la Directiva 86/609/EEC referente a la protección de animales usados con fines experimentales y científicos y se solicitó permiso oficial para llevar a cabo el experimento al Comité Ético de la Universitat de les Illes Balears.

55

Los niveles urinarios de fitato al final del estudio fueron estadísticamente inferiores en el grupo control ($0,08 \pm 0,03$ mg/l) respecto al grupo tratado ($1,22 \pm 0,24$ mg/l). La implantación de estos fragmentos de válvula condujo al desarrollo de calcificaciones de fosfato cálcico (hidroxiapatita) en la superficie y el interior de la válvula. Se observó una disminución estadísticamente significativa del grado de calcificación de la válvula aórtica implantada en el grupo tratado con fitato + Zn^{2+} respecto al grupo control (véase Figura 3), demostrándose así que el fitato plasmático es capaz de inhibir el desarrollo de calcificaciones de hidroxiapatita formadas en válvulas aórticas humanas implantadas en ratas Wistar.

65

ES 2 280 136 B1

Ejemplo 4

En primer lugar, se decidió evaluar el efecto del fitato sobre la formación de hidroxiapatita en la cavidad bucodental. Se sometió un paciente a dos tratamientos diferentes durante 1 semana (Tabla 1), administrando 2 veces al día 10 ml de uno u otro enjuagues bucales. Se procedió a la evaluación *cuantitativa* de los depósitos mineralizados en la cavidad bucodental y se observó una disminución visual significativa del sarro o cálculo dental.

TABLA 1

Enjuagues bucales utilizados

| Compuesto | Colutorio estándar | Colutorio fitato |
|-----------------|--------------------|-------------------|
| | Concentración (%) | Concentración (%) |
| Agua | c.s.p. | c.s.p. |
| Etanol | 10 | 10 |
| Sorbitol | 3 | 3 |
| Fitato potásico | - | 4 |
| Mentol | 0,0425 | 0,0425 |
| Poloxamer 407 | 1 | 1 |
| Triclosán | 0,012 | 0,012 |
| Colorante | 0,015 | 0,015 |

Ejemplo 5

Posteriormente, se trabajó con un colutorio con menos fitato, combinado con Zn^{2+} , evaluando después de 15 días de forma *cuantitativa* los depósitos de hidroxiapatita en la cavidad bucodental. Se sometió un paciente a dos tratamientos diferentes durante 2 semanas (Tabla 2), administrando 2 veces al día 20 ml de uno u otro enjuagues bucales. Se procedió a la evaluación cuantitativa de los depósitos mineralizados en la cavidad bucodental, recogiendo los depósitos de placa y sarro del paciente mecánicamente y por aspiración en un filtro en una clínica dental, disolviendo la hidroxiapatita presente en los depósitos con HCl 1M y determinando el calcio y el fósforo por espectroscopia de emisión atómica utilizando un plasma acoplado inductivamente (Optima 5300DV). Se determinó una reducción del 95,1% en los depósitos mineralizados de fósforo y del 88,3% en calcio.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 280 136 B1

TABLA 2

Enjuagues bucales utilizados

| Compuesto | Colutorio estándar | Colutorio fitato |
|-------------------|--------------------|---------------------------------------|
| | Concentración (%) | Concentración (%) |
| Agua | c.s.p. | c.s.p. |
| Etanol | 10 | 10 |
| Sorbitol | 3 | 3 |
| Fitato (potásico) | - | 0,1 |
| Zinc (cloruro) | 0,001 | 0,001 (relación molar fitato-Zn 10:1) |
| Mentol | 0,0425 | 0,0425 |
| Poloxamer 407 | 1 | 1 |
| Triclosán | 0,012 | 0,012 |
| Colorante | 0,015 | 0,015 |

ES 2 280 136 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Asociación a dosis fija de fitato y zinc en proporciones sinérgicas para utilizar en el tratamiento de la cristalización de la hidroxiapatita.
2. Asociación a dosis fija de fitato y zinc según la reivindicación 1, en donde dicha asociación está en una relación molar entre el fitato y el zinc superior a 4:1.
- 10 3. Asociación a dosis fija de fitato y zinc según la reivindicación 1, en donde dicha asociación está en una una relación molar entre el fitato y el zinc de 5:1.
4. Asociación a dosis fija de fitato y zinc según la reivindicación 1, en donde dicha asociación está en una una relación molar del fitato frente al zinc superior a 5:1.
- 15 5. Utilización de una asociación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento, profilaxis y/o prevención de cálculos dentales.
6. Utilización de una asociación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento, profilaxis y/o prevención de calcificaciones cardiovasculares.
- 20 7. Utilización según la reivindicación 6, donde dichas calcificaciones cardiovasculares tiene lugar en una arteria, en una vena y/o en el corazón.
- 25 8. Utilización de una asociación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento, profilaxis y/o prevención de calcificaciones en el cerebro.
9. Utilización de una asociación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento, profilaxis y/o prevención de calcificaciones en el pulmón.
- 30 10. Utilización de una asociación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento, profilaxis y/o prevención de calcificaciones en la piel.
11. Utilización de una asociación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la preparación de un enjuague bucal.
- 35 12. Utilización de Zn^{2+} en una asociación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores como agente potenciador del efecto inhibidor del fitato en la nucleación y el crecimiento cristalino de la hidroxiapatita.

40

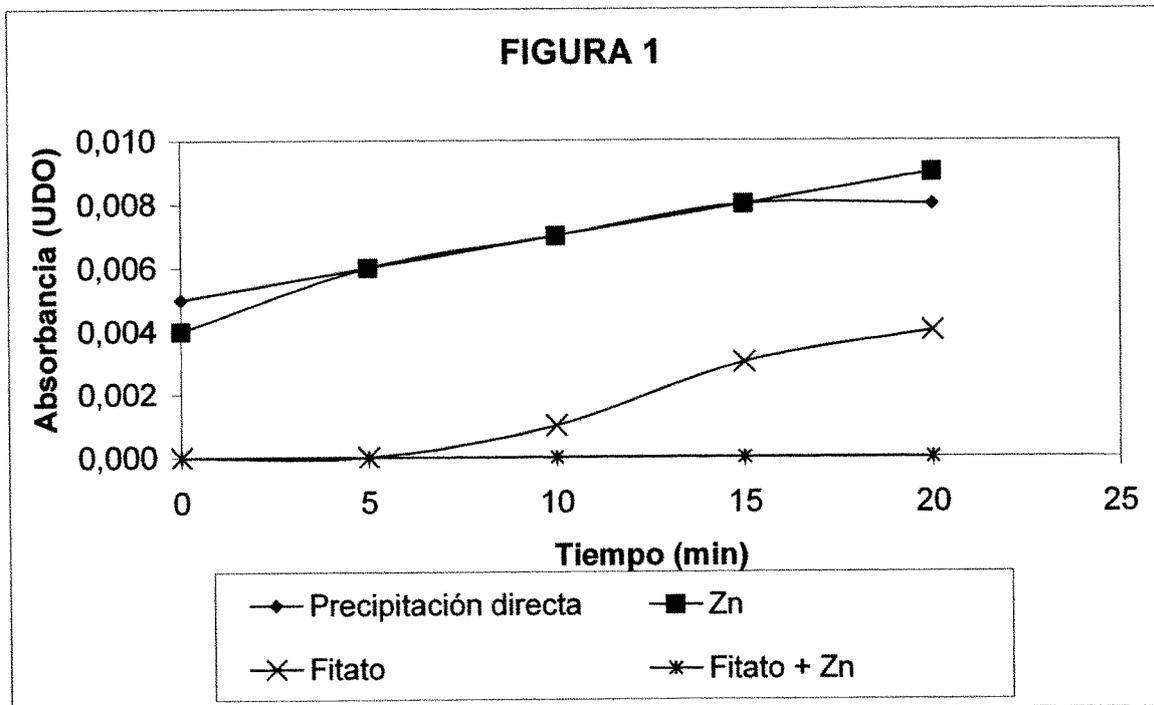
45

50

55

60

65



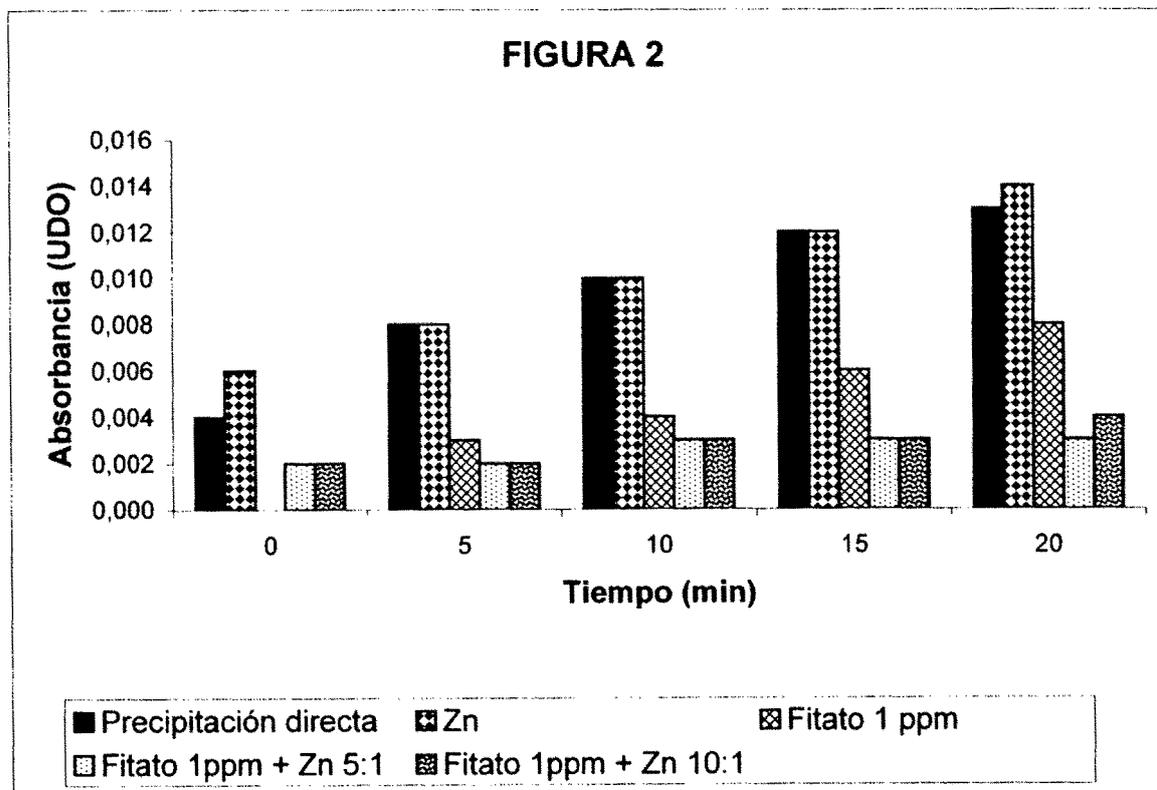
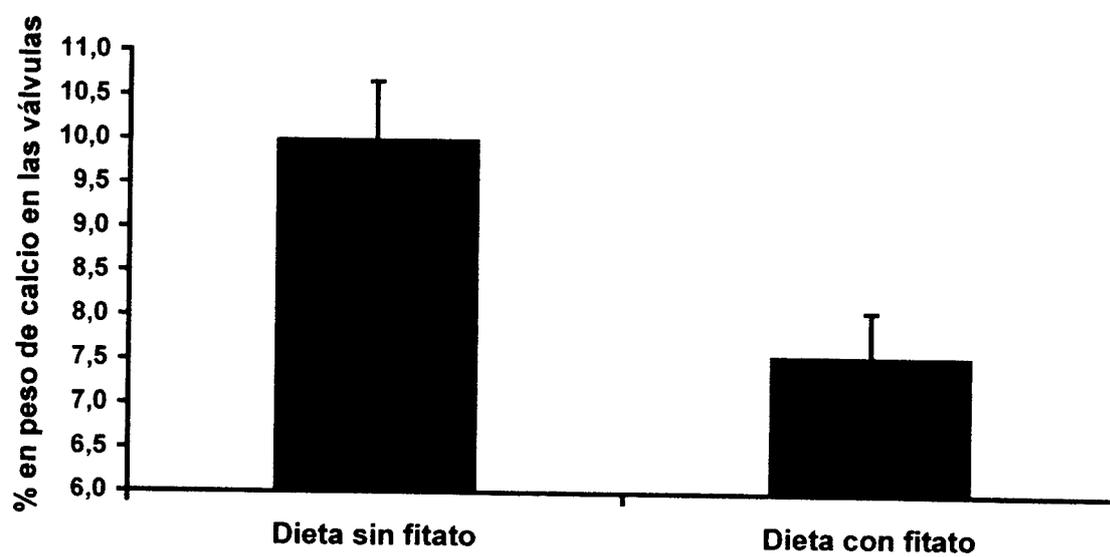


FIGURA 3





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 280 136

② N° de solicitud: 200600377

③ Fecha de presentación de la solicitud: 17.02.2006

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | ES 2007238 A6 (UNIV DE LES ILLES BALEARS; GRASES FREIXEDAS FELICIANO) 01.06.1989, todo el documento. | 1,5-12 |
| X | CN 1102978 A (YAO HUANXIN) 31.05.1995, (resumen) [en línea] [recuperado el 20-04-2007]. Recuperado de: EPO WPI Database, AN 1997-281770[26], DW199726. | 1,5,11 |
| A | JP 8104635 A (ICHIMARU PHARCOS INC) 23.04.1996, (resumen) [en línea] [recuperado el 20-04-2007]. Recuperado de: EPO WPI Database, AN 1996-255077[26], DW199626. | 1,10 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
23.04.2007

Examinador
M^a J. de Concepción Sánchez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K 31/6615 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

C07F 3/06 (2006.01)