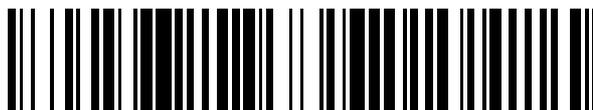


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 679**

51 Int. Cl.:  
**A61L 15/44** (2006.01)  
**A61K 9/70** (2006.01)  
**A61L 15/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08776200 .1**  
96 Fecha de presentación: **14.07.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2173391**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.04.2010**

54 Título: **MEJORAS RELACIONADAS CON APÓSITOS CUTÁNEOS.**

30 Prioridad:  
**09.08.2007 GB 0715554**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.12.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.12.2011**

73 Titular/es:  
**INSENSE LIMITED**  
**COLWORTH SCIENCE PARK**  
**SHARNBROOK, BEDFORD MK44 1LQ, GB**

72 Inventor/es:  
**JEZEK, Jan y**  
**WATSON, Lynne, Patricia**

74 Agente: **Linage González, Rafael**

**ES 2 370 679 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

Mejoras relacionadas con apósitos cutáneos

5 **Campo de la Invención**

Esta invención se refiere a apósitos cutáneos para su aplicación en una parte de un cuerpo humano o animal para el tratamiento de la piel (con fines terapéuticos o cosméticos), y se refiere en particular (pero no exclusivamente) a apósitos para heridas para el tratamiento de piel comprometida, en particular lesiones de la piel, es decir, cualquier interrupción en la superficie de la piel, provocada por daño o enfermedad, incluyendo úlceras cutáneas, quemaduras, cortes, punciones, laceraciones, traumatismos cerrados, lesiones por acné, forúnculos, etc. El término "apósito cutáneo" abarca apósitos tales como parches, esparadrapos, vendas y gasas, etc. para su uso junto con la administración transdérmica de agentes. El término también incluye material en forma amorfa o líquida. El término abarca los apósitos para su aplicación a superficies corporales en general, incluyendo tejidos internos y externos, en particular, la piel, incluyendo el cuero cabelludo. La invención se basa en las propiedades beneficiosas del óxido nítrico (NO).

**Antecedentes de la invención**

El óxido nítrico tiene una multitud de efectos en los tejidos vivos. El mecanismo de estos efectos se basa casi siempre en la interacción del óxido nítrico, tanto con un componente metálico (normalmente hierro) como con grupos tioles de enzimas clave y otras proteínas. Dependiendo de la enzima particular, esta interacción puede conducir a la activación o bien a la inhibición de la proteína. Un ejemplo de un efecto basado en la activación de una enzima es el de la vasodilatación: el óxido nítrico se une al hierro hemínico de la enzima guanilato ciclasa, lo que da como resultado un cambio conformacional, exponiendo el sitio catalítico de la enzima. Esto conduce a una conversión catalítica de GTP a cGMP. Esta conversión inicia toda la cascada de reacciones, conduciendo a la fosforilación de la proteína y a la relajación del músculo (vasodilatación). Otros efectos basados en la activación de enzimas o en factores de crecimiento por óxido nítrico incluyen la estimulación de división celular (proliferación) y la maduración celular, la estimulación de la diferenciación celular y la formación de los receptores celulares, la neovascularización, la formación de fibroblastos en la herida y de este modo la potenciación de la formación de colágeno, etc.

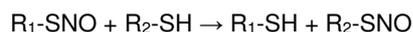
La administración tópica de óxido nítrico puede ser una característica muy útil en diversas aplicaciones terapéuticas o cosméticas incluyendo la cicatrización de heridas, el tratamiento de infecciones de la piel o las uñas, disfunción sexual, etc.

En condiciones normales, el óxido nítrico (NO) es una sustancia gaseosa, inestable, de vida corta. Su inestabilidad es debida al electrón desapareado del nitrógeno. Por lo tanto, es beneficioso suministrar óxido nítrico por vía tópica en forma de un óxido nítrico dador que se difunde en la zona del cuerpo y libera óxido nítrico, espontáneamente o bien al activarse.

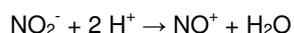
Dadores de óxido nítrico particularmente útiles son los nitrosotioles. Los nitrosotioles son dadores de óxido nítrico que se pueden liberar por su descomposición espontánea:



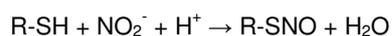
La tasa de descomposición varía considerablemente dependiendo de la cadena lateral del tiol. Por ejemplo, aunque la nitrosocisteína se puede descomponer casi totalmente en unos minutos bajo condiciones normales, se necesitan horas/días para lograr la descomposición casi completa del nitrosoglicerol. Se puede acelerar notablemente la descomposición en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ . Los nitrosotioles también pueden donar óxido nítrico directamente sobre otro grupo tiol. Este proceso, que se denomina transnitrosación, es bastante frecuente *in vivo*:



Los nitrosotioles se pueden producir por reacción entre tioles y nitrito en un entorno ácido. El mecanismo de reacción implica la formación del catión nitrosonio ( $\text{NO}^+$ ) que, a su vez, reacciona con un tiol para producir el correspondiente nitrosotiol:



Por tanto, los S-nitrosotioles se pueden producir convenientemente mezclando un tiol (por ejemplo, tioglicerol) con una fuente de nitrilo (por ejemplo, nitrito de potasio) en disolución ácida. La reacción transcurre a  $\text{pH} < 6$ , la velocidad de la reacción se incrementa con la acidez de la disolución:



El documento WO 2006/095193 da a conocer un apósito cutáneo adaptado, al activarse, para liberar uno o más S-nitrosotioles. El apósito comprende uno o más componentes que contienen una fuente de nitrito, una fuente de tiol y una fuente de protones.

5 El documento WO 2005/0949 da a conocer un material que incluye una superficie y un agente reactivo que puede generar óxido nítrico *in situ* cuando se pone en contacto con nitrito, nitrato o nitrosotioles en la sangre. El agente reactivo comprende una fuente de metales o una fuente de iones metálicos tales como cobre, hierro y cinc.

10 Es un hecho bien conocido que la tasa de la generación de nitrosotiol se puede controlar con el pH. En principio, la tasa se incrementa con el incremento en la acidez de la formulación que contiene una fuente de nitrito y un tiol. Sin embargo, aunque es posible garantizar esta rápida generación de nitrosotioles sencillamente ajustando el pH, la acidez requerida puede prevenir la aplicabilidad de esta formulación (por ejemplo, cuando se aplica sobre piel intacta o con una herida).

15 Aunque algunas aplicaciones pueden requerir sólo una tasa lenta de generación de nitrosotiol, existen otras aplicaciones que se benefician de una rápida irrupción de nitrosotioles. Es posible garantizar esta rápida generación de nitrosotioles sencillamente ajustando el pH, la acidez requerida puede prevenir la aplicabilidad de esta formulación (por ejemplo, cuando se aplica sobre piel intacta o con una herida).

## 20 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un apósito cutáneo adaptado, al activarse, para generar uno o más S-nitrosotioles por reacción entre un tiol y una sal de nitrito en el apósito, comprendiendo el apósito cutáneo una fuente de iones de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y/o  $\text{Fe}^{2+}$ .

La invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la presencia de cationes de metales de transición, tales como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$ , preferentemente  $\text{Cu}^{2+}$ , puede incrementar la tasa de producción de nitrosotiol en un sistema que contiene una fuente de nitrito y un tiol. Esto se logra sin hacer ningún cambio en el pH de la formulación. Este efecto proporciona un control alternativo sobre la tasa de generación de nitrosotiol y permite que se logre una generación de nitrosotiol más rápida a pH más moderado, que es menos irritante y nocivo para la piel.

Aunque se ha establecido bien desde varias décadas el efecto de dos cationes metálicos ( $\text{Hg}^+$  y  $\text{Cu}^+$ ) sobre la tasa de descomposición de nitrosotiol, el uso de metales de transición para incrementar la tasa de producción de nitrosotiol no se consideró previamente.

Se apreciará que el nitrito es un compuesto con un  $\text{pK}_a$  de 3,4 (a 25°C). Por tanto, el nitrito puede actuar como un tampón en el sistema, pudiendo mantener el pH en el intervalo de desde 3 hasta 4.

40 Después de activar el apósito, por ejemplo poniendo en contacto dos componentes, en una zona de la piel, el pH será tal que los S-nitrosotioles comiencen a generarse. Durante esta reacción el nitrito ayudará a mantener un entorno ácido. Sin embargo, su capacidad de tamponación se reducirá mientras transcurre la reacción.

45 Preferentemente, no hay tampones adicionales con un  $\text{pK}_a$  de desde 1 hasta 4 en el apósito, de modo que el pH del apósito aumenta mientras transcurre la reacción, incrementando el pH desde un valor ácido (por ejemplo, por debajo de 5, por ejemplo, desde 3 hasta 4) hasta un valor más neutro (por ejemplo, por encima de 5, por ejemplo, desde 6 hasta 7).

50 Aunque el aumento en el pH reducirá y puede al final detener la producción de S-nitrosotioles, la presencia de una fuente de iones de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y/o  $\text{Fe}^{2+}$ , en particular de  $\text{Cu}^{2+}$ , acelera la producción de S-nitrosotioles, permitiendo que continúe la producción a valores más altos de pH.

55 Por ejemplo, si se requiere la rápida generación de óxido nítrico para lograr una vasodilatación localizada y el consiguiente incremento de la circulación sanguínea, entonces el pH de la formulación, inmediatamente después de la activación, ha de ser muy bajo, de forma que la nitrosilación del tiol transcurre muy rápidamente. Sin embargo, en presencia de cationes de metales de transición se puede lograr la misma tasa rápida de nitrosilación del tiol con un pH más moderado.

60 El tiol se puede seleccionar preferentemente del grupo que consiste en 1-tioglicerol, 1-tioglucona, éster metílico o etílico de cisteína.

Otros tioles adecuados incluyen glutatona (L-glutatona, ya que ésta es la versión fisiológicamente importante), cisteína, N-acetilcisteína, mercaptoetilamina, ácido 3-mercaptopropanoico.

65 El uno o más S-nitrosotioles se generan haciendo reaccionar juntos los reactivos en el apósito.

El apósito incluye un nitrito, por ejemplo, nitrito de potasio y un tiol, por ejemplo, 1-tioglicerol, que reaccionan juntos en el apósito al activarse para generar y liberar S-nitrosotiol.

Los reactivos se proporcionan adecuadamente como componentes separados del apósito que se mantienen separados antes de su uso. Para activar el apósito, los dos componentes del apósito se ponen en contacto (en presencia de una fuente de agua y protones, si es necesario), dando como resultado la producción en el apósito del S-nitrosotiol que entonces se libera normalmente del apósito. Preferentemente, los dos componentes del apósito se envasan de forma separada. Alternativamente, se pueden poner en contacto y envasar juntos en un recipiente sellado de modo que estén listos para su uso como un sistema de un componente cuando se retira el envase.

Preferentemente, el apósito comprende un primer componente que comprende el tiol y un segundo componente que comprende el nitrito.

En esta disposición de dos componentes, normalmente el primer componente es ácido, teniendo un pH en el intervalo de desde 2 hasta 5, preferentemente de desde 3 hasta 4. El segundo componente puede tener un pH en el intervalo de desde 5 hasta 12, preferentemente desde 6 hasta 11 y más preferentemente desde 7 hasta 10. Opcionalmente, en el segundo componente está presente una pequeña cantidad de tampón con un  $pK_a$  en el intervalo de desde 7 hasta 12.

Preferentemente, el primer componente comprende adicionalmente un tampón con un  $pK_a$  de desde 4,5 hasta 7,0, preferentemente de desde 5 hasta 6, lo más preferentemente de aproximadamente 5,5. Como se comentó anteriormente, el pH del primer componente tiene preferentemente un valor de desde 3 hasta 4. A este pH, estará presente una proporción muy alta del tampón en la forma protonada y por tanto puede servir como una fuente útil (o como reserva) de protones.

Puesto que la capacidad de tamponación es mínima al pH de entre aproximadamente 3 a 4, el nitrito será un tampón dominante en la composición después de la activación. Mientras transcurre la conversión de nitrito a S-nitrosotiol, acompañada por el consumo de protones, la capacidad de tamponación de nitrito disminuirá y el pH se incrementará. La contribución a la tamponación de la fuente de protones tampón (por ejemplo, con  $pK_a$  de aproximadamente 5,5) será mínima en las fases iniciales, pero prevendrá que el pH suba muy bruscamente por encima de 4,5, donde la conversión de nitrito a S-nitrosotiol es más bien ineficaz. El pH sólo alcanzará esos niveles si se convierte la mayoría del nitrito, punto en el que ya no se necesita más un pH bajo ya que se ha logrado la acumulación de óxido nítrico.

Por tanto, hay una cooperación entre el nitrito ( $pK_a$  de 3,4) y la fuente de protones tampón ( $pK_a$  de aproximadamente 5,5) en términos de intercambio de protones, garantizando una conversión eficaz de nitrito mientras que se mantiene un entorno de pH moderado.

Se pueden determinar fácilmente las cantidades adecuadas de los reactivos para lograr la tasa y el rendimiento deseados de producción de uno o más S-nitrosotioles. En general, es probable que las cantidades de cada reactivo en el intervalo del 0,1% - 5% (p/p), basándose en el apósito, sean apropiadas.

El o cada componente de apósito puede estar en forma de una capa, por ejemplo, en forma de una lámina, placa o película, que se puede producir a partir de un material amorfo, que no tenga ninguna forma o conformación fija, que se puede deformar y conformar en tres dimensiones, incluyendo que se comprima a través de una boquilla.

El o cada componente de apósito comprende convenientemente un vehículo o soporte, normalmente en forma de una matriz polimérica. El o cada componente del sistema puede estar en forma de líquido, gel amorfo o en forma de una capa, por ejemplo, en forma de una lámina, placa o película seca. Un soporte particularmente conveniente comprende un polímero basado en poli(ácido acrílico) que contiene grupos disociables con  $pK_a$  de entre 5 y 6.

El vehículo o soporte comprende convenientemente un hidrogel hidratado. Un hidrogel hidratado significa uno o más geles acuosos o basados en agua, en forma hidratada. Un hidrogel hidratado incluye así una fuente de agua, para la activación del apósito. Un hidrogel hidratado también puede actuar para absorber agua y otros materiales exudados de la zona de la herida, permitiendo que el apósito realice una función importante y útil retirando tales materiales de la zona de la herida. El hidrogel hidratado también proporciona una fuente de humedad, que puede actuar en uso para mantener una zona de herida húmeda, ayudando a la cicatrización.

Hidrogel hidratados adecuados se dan a conocer en el documento WO 03/090800. El hidrogel hidratado comprende convenientemente material de polímero hidrófilo. Materiales de polímero hidrófilo adecuados incluyen poliacrilatos y metacrilatos, por ejemplo, como los suministrados por First Water Ltd en forma de hidrogeles privados, incluyendo poli(ácido sulfónico de 2-acrilamido-2-metilpropano) (poli-AMPS) y/o sales de los mismos (por ejemplo, como se describe en el documento WO 01/96422), polisacáridos, por ejemplo, gomas de polisacáridos, en particular goma xantana (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial Keltrol), distintos azúcares, ácidos policarboxílicos (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial Gantrez AN-169 BF de ISP Europe), poli(éter metilvinílico / anhídrido maleico) (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial Gantrez UN 139, que tiene un peso molecular

en el intervalo de 20.000 a 40.000), polivinilpirrolidona (por ejemplo, en forma de calidades disponibles comercialmente conocidas como PVP K-30 y PVP K-90), óxido de polietileno (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial Polyox WSR-301), alcohol polivinílico (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial Elvanol), polímero poliacrílico reticulado (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial Carbopol EZ-1), celulosas y celulosas modificadas incluyendo hidroxipropilcelulosa (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial KluCEL EEF), carboximetilcelulosa de sodio (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial Cellulose Gum 7LF) y hidroxietilcelulosa (por ejemplo, disponible bajo la marca comercial Natrosol 250 LR).

En un gel se pueden usar mezclas de materiales de polímeros hidrófilos.

En un gel hidratado de material de polímero hidrófilo, el material de polímero hidrófilo está presente de forma deseable en una concentración de al menos un 1%, preferentemente al menos un 2%, más preferentemente al menos un 5%, aún más preferentemente a menos un 10%, o al menos un 20%, de forma deseable en al menos un 25% e incluso de forma más deseable en al menos un 30% en peso basado en el peso total del gel. Se pueden usar incluso mayores cantidades, de hasta aproximadamente un 40% en peso basado en el peso total del gel. Se han obtenido buenos resultados con el uso de un hidrogel hidratado de poli-AMPS y/o sales del mismo en una cantidad de aproximadamente un 30% en peso del peso total del gel.

El material de hidrogel hidratado normalmente está en forma de una capa, lámina o película sólida de material que normalmente está reticulado, y que puede incorporar una estructura de refuerzo mecánica. Se puede seleccionar el tamaño y la conformación de la capa, lámina o película para adaptarse al uso destinado del apósito. Son particularmente adecuados los grosores en el intervalo de 0,05 a 5 mm, preferentemente de 0,5 a 3 mm.

Alternativamente, el hidrogel hidratado puede estar en forma de un gel amorfo que no tenga una forma o conformación fija, que se puede deformar y conformar en tres dimensiones, incluyendo que se comprima a través de una boquilla. Normalmente, los geles amorfos no están reticulados o tienen niveles bajos de reticulación. Se puede usar un gel amorfo con comportamiento pseudoplástico. Un gel de este tipo es líquido cuando se somete a esfuerzo de cizalladura (por ejemplo, cuando se vierte o se comprime a través de una boquilla) pero es rígido cuando está estático. Por tanto, el gel puede estar en forma de un componente que se puede verter o comprimir que se puede dispensar, por ejemplo, desde un tubo comprimible o un dispensador similar a una jeringuilla, que comprende un pistón y un cilindro, normalmente con una boquilla de aproximadamente 3 mm de diámetro. Los geles amorfos permiten una mezcla eficaz del sistema de dos componentes. Se puede aplicar un gel de este tipo en forma de una capa de superficie, o en una cavidad de una herida como un gel que se puede conformar completamente que llena el espacio disponible y entra en contacto con la superficie de la herida.

Un ejemplo típico de una formulación de gel amorfo es: un 15% p/p de AMPS (sal de sodio), un 0,19% de diacrilato de polietilenglicol y un 0,01% de hidroxiciclohexilfenilcetona, completando el volumen hasta un 100% con agua desionizada de calidad analítica. Los reactivos se mezclan y se disuelven perfectamente, después se polimerizan durante entre 30-60 segundos, usando una lámpara UV-A que suministra aproximadamente 100 mW/cm<sup>2</sup>, para formar el hidrogel requerido. Éste puede estar contenido en jeringuillas de plástico a partir de las que se puede dispensar después el gel amorfo desde una jeringuilla hasta una zona objetivo, como una capa de superficie o para llenar una cavidad.

Los componentes del apósito también pueden estar en la forma seca. Ejemplos de materiales de polímeros de soporte secos adecuados comprenden poli(alcohol vinílico) (PVA), alginato o carboximetilcelulosa. Generalmente, la estabilidad de las sustancias activas, especialmente de los tioles, será mejor en la forma seca.

En una realización, la invención comprende un primer componente que comprende una capa de hidrogel hidratado, preferentemente poli-AMPS y/o sales del mismo, que contiene una fuente de nitrito, por ejemplo, nitrito de potasio, y un segundo componente que comprende una matriz polimérica seca, preferentemente PVA seco, que contiene un tiol, por ejemplo, 1-tioglicerol. El primer componente se puede usar en contacto con la piel, ya que el hidrogel hidratado tiene propiedades beneficiosas para el contacto con la piel, como se comentó anteriormente, colocándose el segundo componente en la parte superior del primer componente. Cuando se ponen en contacto los dos componentes, esto tiene el efecto de activación del apósito. El agua en el hidrogel hidratado del primer componente actúa proporcionando un entorno acuoso adecuado que permite la generación de S-nitrosotiol.

En otra realización, el apósito comprende dos componentes que son amorfos. Los componentes pueden estar, por ejemplo, en forma de un gel, semisólido, pasta, crema, loción o líquido por ejemplo, una disolución acuosa. Convenientemente, se pueden emplear hidrogeles hidratados, como se comentó anteriormente. En realizaciones de este tipo, cada componente contiene preferentemente un reactivo que, cuando se pone en contacto, se activa para liberar uno o más S-nitrosotioles. Preferentemente, un componente contiene un nitrito y el otro contiene un tiol. De forma alternativa, el nitrito y el tiol se podrían mantener juntos a un pH suficientemente alto como para prevenir la reacción entre ambos, por ejemplo, a un pH por encima de 7, conteniendo el segundo componente una fuente de acidez. Otra posibilidad es que un componente contenga S-nitrosotiol anhidro y el segundo componente contenga agua.

Se mantienen separados los dos componentes amorfos hasta que se desee la aplicación del apósito a una superficie corporal. De forma conveniente, están envasados en un recipiente que tiene una boquilla, a través de la que se pueden suministrar los componentes amorfos. Preferentemente, los dos componentes están envasados en un dispensador de dos compartimentos, que funciona preferentemente para suministrar ambos componentes de forma simultánea. Los dos componentes también se pueden poner en contacto y envasar juntos en un recipiente sellado, de modo que estén listos para su uso como un sistema de un componente cuando se retira el envase.

En otra realización más, el apósito comprende dos componentes secos. Ejemplos de materiales de polímeros de soporte secos adecuados comprenden alcohol polivinílico (PVA), alginato o carboximetilcelulosa. Los dos componentes se pueden mantener separados cada uno durante su almacenamiento y activarse poniéndolos en contacto y añadiendo humedad. De forma alternativa, se pueden mantener juntos durante su almacenamiento y activarse añadiendo humedad.

Realizaciones preferidas comprenden dos componentes de apósito, uno que contiene nitrito y el otro que contiene tiol, por ejemplo, glutatona. Los dos componentes pueden tomar una amplia variedad de formas materiales, como se comentó anteriormente. Sin embargo, actualmente se prefieren los siguientes ejemplos de combinaciones:

Componente nitrito	Componente tiol
Agua	Película o lámina seca
Agua	Película o lámina seca con humectante de glicerol
Solución acuosa viscosa	Película o lámina seca
Solución acuosa viscosa	Suspensión en glicerol
Agua	Suspensión en propilenglicol
Gel amorfo	Agua
Agua	Agua
Gel amorfo	Gel amorfo
Agua	Hidrogel en lámina
Hidrogel en lámina	Agua
Hidrogel en lámina de alto contenido en agua	Hidrogel en lámina de alto contenido en agua
Película o lámina seca	Película o lámina seca

Opcionalmente, el apósito incluye, o se usa con, una capa de contacto con la piel, que comprende preferentemente un hidrogel hidratado de poli-AMPS y/o sales del mismo, como se mencionó anteriormente.

Opcionalmente, el apósito incluye, o se usa con, una capa de recubrimiento o externa para adherir el apósito a la piel de un ser humano o animal de una forma conocida.

Los apósitos, de acuerdo con la invención, se pueden fabricar en un intervalo de tamaños y formas diferentes para el tratamiento de zonas de la piel, por ejemplo, de heridas de tamaños y formas diferentes. Las cantidades apropiadas de reactivos para un apósito particular se pueden determinar fácilmente por experimento.

Los componentes del apósito se almacenan adecuadamente antes de su uso en envases estériles, sellados, impermeables a al agua, por ejemplo, tubos de plástico de doble cámara o envases con láminas de aluminio laminados.

En el uso, el componente o componentes del apósito se retiran de su envase y se sitúan en el orden apropiado sobre la piel de un ser humano o animal, por ejemplo, sobre una herida u otra región de la piel que va a ser tratada para fines cosméticos o terapéuticos. También se puede usar el apósito como un coadyuvante para un suministro transdérmico, como se señaló anteriormente. El apósito se activa, en el caso de apósitos con múltiples componentes, poniendo en contacto los componentes, dando como resultado la liberación desde el apósito de uno o más S-nitrosotioles (después de su generación en el apósito tras la activación). Los S-nitrosotioles se descomponen espontáneamente para producir óxido nítrico, que tiene efectos beneficiosos sobre los tejidos y también produce la vasodilatación.

La invención se describirá adicionalmente, a modo de ilustración, en los siguientes ejemplos, y con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 es una gráfica de la absorbancia (338 nm) frente al tiempo (en minutos) que muestra el efecto de los

cationes cúpricos sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol a pH 4,0. La absorbancia (338 nm) es directamente proporcional a la concentración de S-nitroso-1-tioglicerol en la disolución.

5 La figura 2 es una gráfica de la absorbancia (338 nm) frente al tiempo (en minutos) que muestra el efecto de los cationes cúpricos sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol a pH 4,5. La absorbancia (338 nm) es directamente proporcional a la concentración de S-nitroso-1-tioglicerol en la disolución.

10 La figura 3 es una gráfica de la absorbancia (338 nm) frente al tiempo (en minutos) que muestra el efecto de los cationes cúpricos sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol a pH 5,0. La absorbancia (338 nm) es directamente proporcional a la concentración de S-nitroso-1-tioglicerol en la disolución.

15 La figura 4 es una gráfica de la absorbancia (338 nm) frente al tiempo (en minutos) que muestra el efecto de los cationes de cinc sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol a pH 4,0. La absorbancia (338 nm) es directamente proporcional a la concentración de S-nitroso-1-tioglicerol en la disolución.

La figura 5 es una gráfica de la absorbancia (496 nm) frente al tiempo (en minutos) que muestra el efecto de los cationes ferrosos sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol a pH 4,0. La absorbancia (496 nm) es directamente proporcional a la concentración de S-nitroso-1-tioglicerol en la disolución.

20 La figura 6 es una gráfica de la absorbancia (496 nm) frente al tiempo (en minutos) que muestra el efecto de los cationes ferrosos sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol a pH 4,5. La absorbancia (496 nm) es directamente proporcional a la concentración de S-nitroso-1-tioglicerol en la disolución.

## 25 Ejemplos

### MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

#### Productos químicos y otros materiales

30 Agua (conductividad < 10  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; calidad de reactivos analítica, Fisher o bien Sanyo Fistreem MultiPure)

Nitrito de sodio, de Sigma (S2252)

35 1-Tioglicerol, de Fluka (88641)

Ácido clorhídrico, de Fisher (J/4310/17)

Sulfato ferroso, de Aldrich (21.542-2)

40 Nitrato cúprico, de Aldrich (467855)

Sulfato de cinc, de Sigma (Z4750)

45 Citrato de sodio, de Fisher (BPE327-500)

#### Medición de la concentración de S-nitrosotiol en disoluciones acuosas usando una medida de absorbancia directa a 338 nm

50 Se sabe que los nitrosotioles absorben luz UV aproximadamente a 338 nm ( $\epsilon_{338}$  = aproximadamente  $900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Por lo tanto, se puede seguir la tasa de nitrosilación por la medida de la absorbancia directa a 338 nm (Cook et al. Analytical Biochemistry, 238, 150-158, 1996). Se preparó una disolución que contenía nitrito (5 mM) y una concentración dada de un metal de transición ( $\text{Cu}^{2+}$  o bien  $\text{Zn}^{2+}$ ) en un tampón de citrato (50 mM, pH 4,0 o bien pH 4,5) y se midió la absorbancia (338 nm). Se añadió 1-tioglicerol a la mezcla hasta lograr una concentración 5 mM y se siguieron los cambios en la absorbancia (338 nm) como una función del tiempo. Debido a la interferencia de la especie de hierro, no se pudo usar este procedimiento para estudiar el efecto de los cationes de  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la velocidad de la tasa de nitrosilación.

#### Medición de la concentración de S-nitrosotiol en disoluciones acuosas usando el procedimiento de Griess

60 Se usó este procedimiento para estudiar el efecto de los cationes de  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la velocidad de la tasa de nitrosilación. Se preparó una disolución que contenía nitrito (5 mM) y una concentración dada de  $\text{Fe}^{2+}$  en un tampón de citrato (pH 4,0 o bien pH 4,5 o bien pH 5,0). Se añadió 1-tioglicerol a la mezcla hasta lograr una concentración 5 mM y se midió la concentración de S-nitroso-1-tioglicerol como una función del tiempo usando el siguiente procedimiento (basado en Cook et al. Analytical Biochemistry, 238, 150-158, 1996).

65 Se prepararon los siguientes reactivos:

Reactivo 1: tampón Na-fosfato (pH 7,4, 0,1 M).

5 Reactivo 2: reactivo de Griess: 20 mg de N-(1-naftil)etilendiamina diclorhidrato (NADD) + 500 mg de sulfanilamida disuelto en 2 ml de DMSO. (N.B. Esta disolución es sensible a la luz y se debe mantener en la oscuridad tanto como sea posible).

Reactivo 3: cloruro mercúrico (10 mM) en DMSO (13,58 mg de HgCl<sub>2</sub> en 5 ml de DMSO).

10 Se siguió entonces el procedimiento en seis etapas expuesto a continuación:

- Dispensar 1,5 ml del reactivo 1 en una cubeta de plástico.

15 - Añadir 200 µl de la muestra (es decir, muestra en la que se va a determinar la concentración de S-nitroso-1-tioglicerol).

- Añadir 1,17 ml de agua desionizada.

20 - Añadir 100 µl del reactivo 2.

- Añadir 30 µl del reactivo 3 y mezclar bien la disolución.

- Leer la absorbancia de la mezcla resultante a 496 nm en 10 min.

25 Se puede estimar la concentración de nitrosotiol a partir de la lectura de la absorbancia usando el coeficiente de absorción molar para nitrosotioles = aproximadamente 10.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### **Ejemplo 1: Efecto de Cu<sup>2+</sup> sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol**

30 Este ejemplo muestra el efecto de los cationes cúpricos sobre la tasa de generación de nitrosotiol a pH 4,0 (figura 1), pH 4,5 (figura 2) y pH 5,0 (figura 3). La tasa de nitrosilación, seguida de la medida de la absorbancia de las muestras a 338 nm se incrementó considerablemente en presencia de cationes cúpricos en el intervalo de concentración de 10 µM a 100 µM.

#### **Ejemplo 2: Efecto de Zn<sup>2+</sup> sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol**

40 Este ejemplo muestra el efecto de los cationes de cinc sobre la la tasa de generación de nitrosotiol a pH 4,0 (figura 4). La tasa de nitrosilación, seguida de la medida de la absorbancia de las muestras a 338 nm, se incrementó en presencia de cationes de cinc 100 µM. El incremento en la tasa de nitrosilación fue más marcado en presencia de cationes de cinc 250 µM.

#### **Ejemplo 3: Efecto de Fe<sup>2+</sup> sobre la tasa de nitrosilación de 1-tioglicerol**

45 Este ejemplo muestra el efecto de los cationes ferrosos sobre la tasa de generación de nitrosotiol a pH 4,0 (figura 5) y pH 4,5 (figura 6). No se pudo seguir la tasa de nitrosilación midiendo la absorbancia de las muestras a 338 nm debido a la interferencia de la especie de hierro. En su lugar, se siguió la generación del S-nitroso-1-tioglicerol por el procedimiento de Griess (Cook et al. Analytical Biochemistry, 238, 150-158, 1996). Se encontró que la tasa de nitrosilación se incrementaba en presencia de cationes ferrosos tanto 100 µM como 250 µM.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un apósito cutáneo adaptado, al activarse, para generar uno o más S-nitrosotioles por reacción entre un tiol y una sal de nitrito en el apósito, comprendiendo el apósito cutáneo una fuente de iones de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y/o  $\text{Fe}^{2+}$ .
2. Un apósito cutáneo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un primer componente que comprende el tiol y un segundo componente que comprende la sal nitrito.
- 10 3. Un apósito cutáneo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que está exento de cualquier material adicional que tenga un  $\text{pK}_a$  de desde 1,0 hasta 4,0.
- 15 4. Un apósito cutáneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que, mientras el nitrito y el tiol reaccionan para generar el uno o más S-nitrosotioles, el pH del apósito en contacto con la piel se incrementa desde un valor ácido hasta un valor más neutro.
- 20 5. Un apósito cutáneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un tampón con un  $\text{pK}_a$  de desde 4,5 hasta 7,0.
6. Un apósito cutáneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el pH del primer componente es de desde 2,0 hasta 5,0.
7. Un apósito cutáneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el pH del segundo componente es de desde 5,0 hasta 12,0.
- 25 8. Un apósito cutáneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que los componentes primero y segundo son amorfos.
- 30 9. Un apósito cutáneo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que el primer componente y/o el segundo componente comprende un soporte polimérico.
10. Un apósito cutáneo de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el soporte polimérico comprende poli(ácido acrílico).

Figura 1

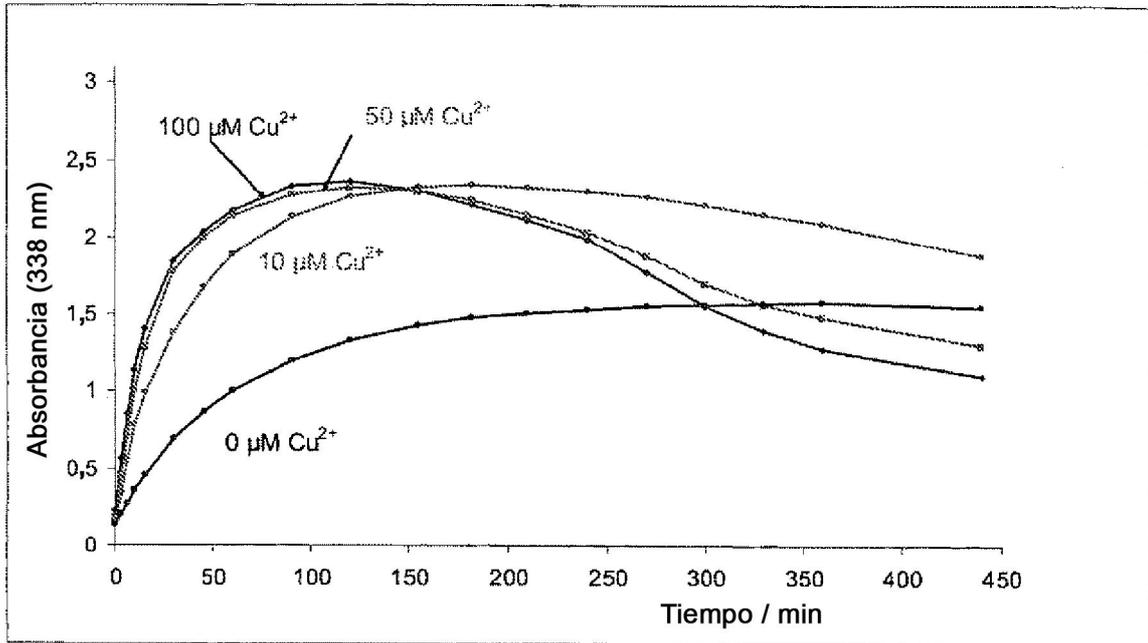


Figura 2

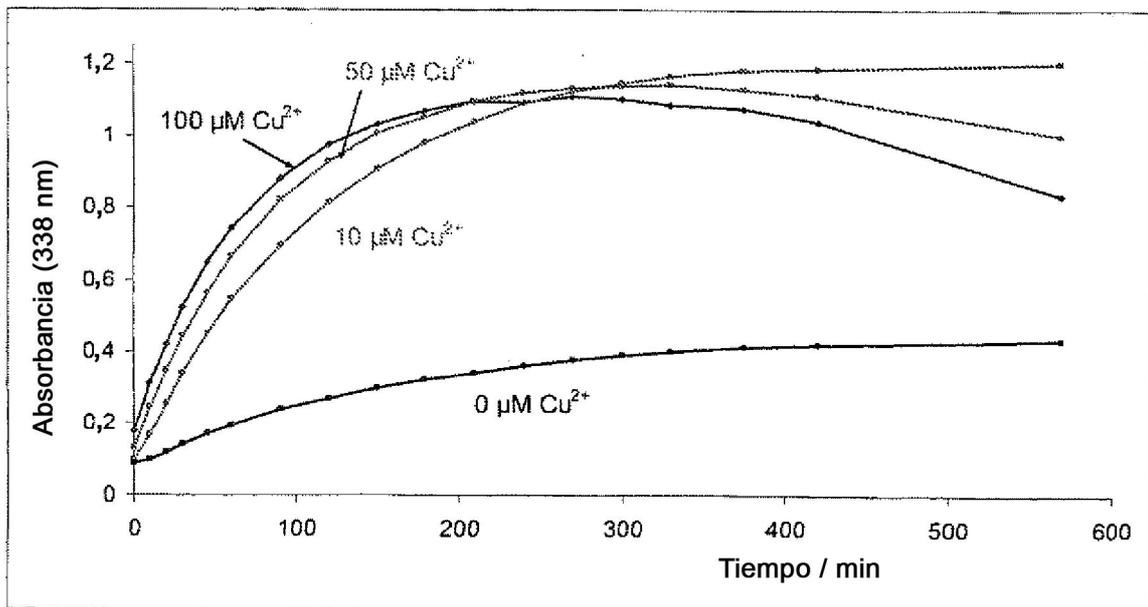


Figura 3

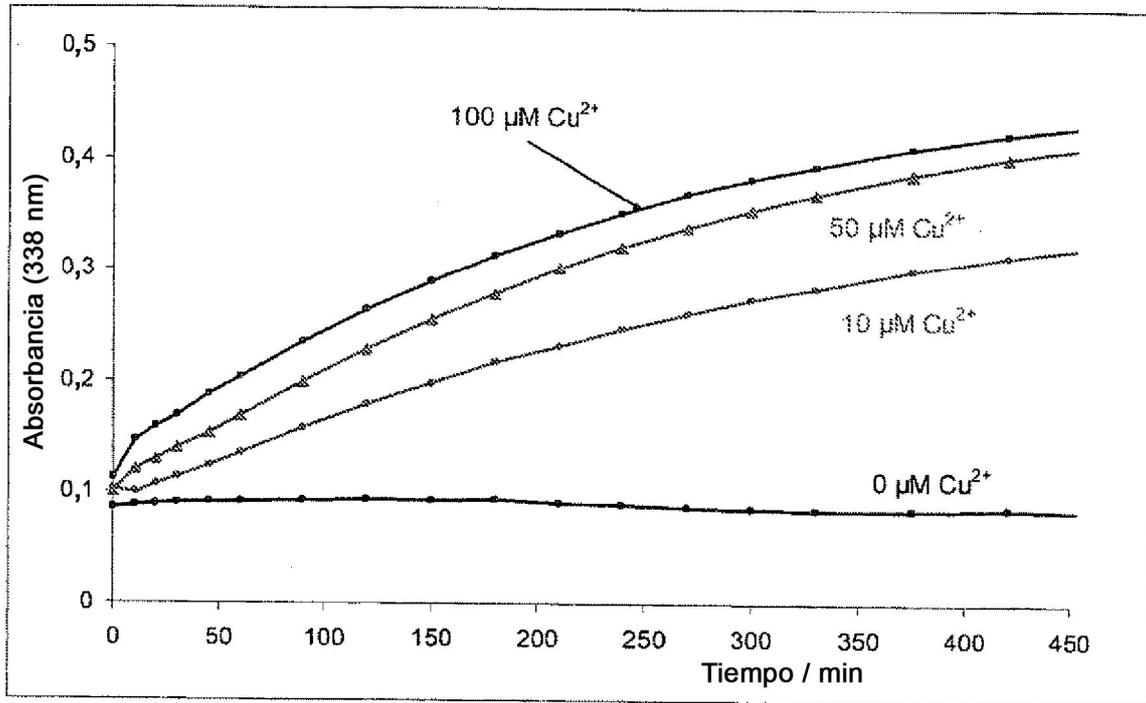


Figura 4

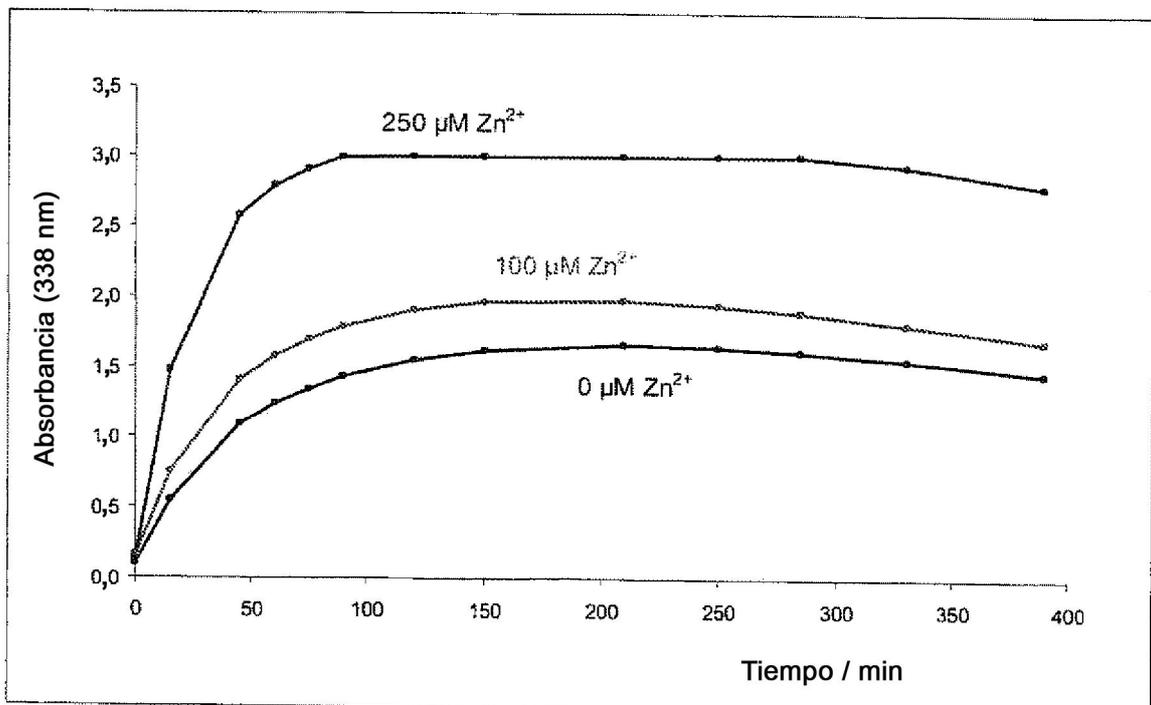


Figura 5

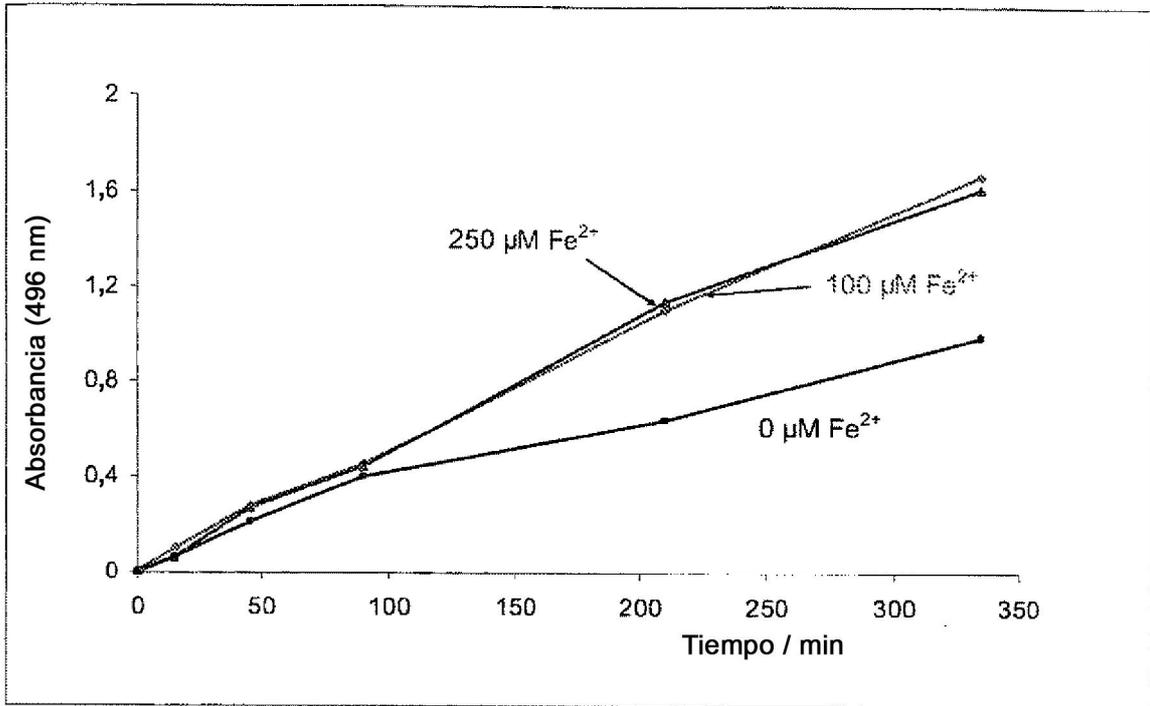


Figura 6

