

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 846**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08839029 .9**

96 Fecha de presentación: **16.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2197417**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende S-nitrosoglutatión y un polisacárido**

30 Prioridad:
17.10.2007 HU 0700678

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.06.2012

73 Titular/es:
**PHARMAGENIX AG
Limmatquai 1
8001 Zurich , CH**

72 Inventor/es:
**LACZA, Zsombor y
HORNYÁK, István**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 846 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica que comprende S-nitrosoglutatión y un polisacárido

Campo de la invención

5 La invención se refiere principalmente a composiciones farmacéuticas que comprenden S-nitrosoglutatión (GSNO) y uno o más polímero(s) de tipo polisacárido junto con uno o más polímero(s) y aditivo(s) farmacéuticamente aceptados. La invención está basada en el descubrimiento de que polímeros de tipo polisacárido (tales como el chitosán) son capaces de estabilizar el de otro modo altamente lábil GSNO.

Estado de la técnica

10 La vasoconstricción que se desarrolla durante alteraciones microcirculatorias, que aumenta la susceptibilidad a la trombosis, y la acumulación de radicales libres que se han liberado en ciertos problemas metabólicos causan un daño tisular complejo que conduce a una disminución en el potencial de curación de heridas y a ulceración crónica en varios casos [Greenman et al., 2005, Lancet, 366, 1711-7; Sigauco-Roussel et al., 2004, Diabetes, 53, 1564-9; Veves et al., 1998, Diabetes, 47, 457-63; Hile y Veves, 2003, Curr. Diab. Rep., 3, 446-51; Nikolovska et al., 2005, Acta Dermatovenerol Croat, 13, 242-6]. Están disponibles numerosos medicamentos dermatológicos para tratar las alteraciones microcirculatorias que se desarrollan en, p.ej., la diabetes o la vasoconstricción. De manera característica, estas composiciones contienen aceites esenciales (p.ej. romero) y otros ingredientes activos no específicos que tienen una eficacia no verificada clínicamente. Según resultados experimentales, el óxido nítrico (NO) puede afectar de manera beneficiosa a la alteración microcirculatoria [Cals-Grierson y Ormerod, 2004, Nitric Oxide, 10, 179-93]. El NO es un compuesto gaseoso rápidamente reactivo, que tiene -entre otros- un efecto relajante de los músculos lisos, y que se usa como inhalante en fisioterapia. Debido a su consistencia, el NO apenas se puede usar con fines dermatológicos, sin embargo, la observación clínica confirma su eficacia para tratar úlceras que no curan [Miller et al., 2004, J. Cutan. Med. Surg., 8, 233-8]. Alternativamente, usando compuestos donadores de NO, tales como nitroprusiato de sodio, se pueden transferir cantidades terapéuticamente eficaces de NO a la epidermis, sin embargo, la administración de estos compuestos está acompañada de varios problemas nuevos que hacen difícil su aplicación. A saber, la mayoría de los donadores de NO liberan no sólo NO, sino también otras especies de nitrógeno reactivas que pueden ser dañinas para los tejidos durante la aplicación a largo plazo. Un problema más importante surge del hecho de que la degradación de los donadores de NO es muy rápida, por consiguiente no se conocen composiciones para el aumento de la corriente sanguínea que tengan una estabilidad adecuada y un efecto vasodilatador local predecible. En tercer lugar, mediante su absorción a través de la piel, las composiciones donadoras de NO que se degradan lentamente alcanzan la circulación sistémica y ejercen su efecto en tejidos lejos del área tratada, lo que no es preferible.

35 Ciertos estudios científicos ya han sido dirigidos a usar el sustrato de la NO sintasa, es decir, L-arginina, en el tratamiento de alteraciones microcirculatorias [Fosell, 2004, Diabetes Care, 27, 284-5]. El sistema de la NO sintasa en sí es necesario para que la L-arginina ejerza su actividad, sin embargo, es característico el daño de este sistema enzimático a la alteración microcirculatoria. Adicionalmente, la L-arginina es también un sustrato de otras enzimas competentes con la NO sintasa diferentes, tales como argininas, arginina descarboxilasa, etc. Por tanto, en base a lo anterior, obviamente es más preferible administrar el NO al sistema circulatorio local que la aplicación de su precursor.

40 En medicina se usan ampliamente parches para la piel que contienen nitrato, y sus efectos están basados en parte en su rasgo donador de NO. Sin embargo, el nitrato, considerado como un precursor del agente vasodilatador (NO), es transferido a la circulación sistémica, sin un aumento en la circulación sanguínea de la superficie de la piel directamente expuesta. El efecto deseado de un donador de NO para tratar una alteración microcirculatoria es justo el opuesto a ello: debe generar vasodilatación local sin ejercer efectos sistémicos significativos.

45 Se conocen numerosas patentes donde se usa un compuesto donador de NO en composiciones tópicas que liberan monóxido de nitrógeno a una velocidad deseada. Por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.287.601 B1 describe una formulación en la que se usa nitroglicerina, hidroxilamina, nitroprusiato, nitrato o azida como compuestos donadores de NO en combinación con un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID). La patente de EE.UU. 5.519.020 describe el uso de un aducto de óxido de nitrógeno/polímero insoluble en agua, donde el polímero podría ser, p.ej., polietilimina-celulosa. La patente de EE.UU. 7.048.951 B1 B2 describe que se mezcla nitrito de sodio en polvo, ácido ascórbico y preferiblemente ácido maleico, y la mezcla obtenida libera monóxido de nitrógeno cuando es expuesta al agua.

50 Se conocen varias realizaciones donde una matriz basada en polímero comprende monóxido de nitrógeno unido físicamente o químicamente. La patente de EE.UU. 5.994.444 describe que un polímero biológicamente degradable (preferiblemente poli(ácido L-láctico)) es impregnado con un compuesto donador de óxido de nitrógeno, preferiblemente con un compuesto de nitrito inorgánico. La patente de EE.UU. 5.770.645 2 describe polímeros que son derivatizados con el grupo -NOx, que es capaz después de liberar NO.

El NOlabs (Helsinborg, Suecia) presentó varias solicitudes (solicitudes de patente internacional WO 2006/084911-14) donde se usa monóxido de nitrógeno para el tratamiento de diferentes enfermedades, que incluyen úlcera y

neuropatía diabéticas. En estas enfermedades se usan polímeros que liberan NO para obtener la liberación de NO deseada. Preferiblemente, se usa un derivado de NO de polietilimina lineal (L-PEI-NO). En la descripción general se hace referencia al quitosán como un tipo de ciertos polímeros que pueden ser derivatizados con NO. Además, se hace referencia a los polisacáridos sólo como soportes inertes para los polímeros que liberan NO (p.ej., solicitud de patente internacional WO 2006/084912, págs. 11-12).

Estudios de investigación verifican que un compuesto de nitrosotiol endógeno, el GSNO, que es un donador de NO natural, es particularmente adecuado para la preparación de composiciones vasodilatadoras locales (Sogo et al., 2000, Br. J. Pharmacol., **131**, 1236-44). Durante la descomposición del GSNO se genera NO y glutatión reducido, con un conocido efecto antioxidante. Debido a sus efectos vasodilatadores e inhibitorios de la agregación plaquetaria, el NO penetrado en la circulación local mejora la circulación de la sangre en la piel e inhibe la formación de trombos [Khan et al., 2005, J. Cereb. Blood Flow Metab., **25**, 177-92; Kuo et al., 2004, J. Surg. Res., **119**, 92-9; Sogo et al., 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun., **279**, 412-9]. Sin embargo, su aplicabilidad es limitada, dado que en disoluciones acuosas la vida media de este compuesto es muy corta, sólo 5,5 horas.

La estabilidad del GSNO podría ser mejorada significativamente usando vehículos farmacéuticamente conocidos. El poli(etilenglicol), la poli(vinilpirrolidona) o el poli(alcohol vinílico) son adecuados para disminuir la velocidad de degradación del GSNO, principalmente formando puentes de hidrógeno [A. B. Seabra et al., mayo de 2005, J. Pharm. Sci., **95**, No. 5, 994-1003; A. B. Seabra, M. G. de Oliveira, 2004, Biomaterials, **25**, 3773-82; Seabra et al., 2004, Nitric Oxide, **11**, 263-72]. Sin embargo, estos métodos no son suficientes para generar una composición estable apropiada para la práctica médica cotidiana, dado que la vida media del agente a temperatura ambiente o a 4°C podría ser alargada sólo durante unos días.

El documento US 2002/0002136 describe composiciones de glutatión (GSH, GSSH) o nitrosoglutatión o éster monoalquílico de glutatión con un policatión tal como quitosán.

El papel de los puentes de hidrógeno estabilizantes también es enfatizado en la patente de EE.UU. 7.015.347 B2, donde se reivindicaron compuestos que tienen grupos OH o SH intramoleculares capaces de estabilizar el grupo S-NO.

Adicionalmente, también se conocen macromoléculas donadoras de NO que contienen grupos S-NO unidos covalentemente a una estructura de polietilenglicol [Seabra et al., Spt-Oct de 2005, Biomacromolecules, **6(5)**, 2512-20].

Sólo una publicación describe que se administraron hidrogeles que comprendían GSNO a voluntarios sanos, y en el estudio se observó un aumento dependiente del NO en la corriente sanguínea local [Seabra et al., 2004, British J. Dermatol., **151**, 977-83]. La velocidad de vasodilatación se correlacionó bien tanto con la concentración aplicada de GSNO como con los productos metabólicos de NO medidos en la piel, verificando así la especificidad del efecto. Los sujetos no reportaron efectos secundarios durante el estudio. En el estudio se usaron como vehículos hidrogeles Synperonic F127 basados en poli(óxido de etileno)/poli(óxido de propileno) (Uniquema, Bélgica). Sin embargo, la composición de hidrogel usada en el estudio no es adecuada para la aplicación clínica, dado que no desacelera la descomposición del GSNO, de ahí que se deba preparar en fresco para cada administración.

También se conocen derivados de nitrosoglutatión desarrollados para vasodilatación local [véase Lacer SA, solicitud de patente húngara Nº P0105203]. Estos compuestos cíclicos no han sido aplicados en la práctica clínica hasta ahora, esto es porque no hay información acerca de su eficacia o metabolismo. Hablando en términos generales, el agente endógeno con metabolismo bien conocido, tal como GSNO, tiene probablemente menos efectos secundarios en comparación con derivados sintéticos, por lo tanto es más preferible.

El objeto de la invención es una composición vasodilatadora adecuada para aplicación dermatológica que es suficientemente estable bajo condiciones de almacenamiento en farmacia y en el hogar, además puede ser aplicada fácilmente y es capaz de causar un incremento clínicamente significativo en el flujo sanguíneo. Por lo tanto, se puede usar preferiblemente para el tratamiento y la prevención de úlcera, neuropatía, tal como neuropatía diabética periférica, y síndrome del pie diabético.

Compendio de la invención

En la búsqueda de la solución para los problemas expuestos anteriormente, los inventores realizaron estudios extensivos y descubrieron que el efecto de polisacárido(s), p.ej. quitosán, puede disminuir significativamente la velocidad metabólica del GSNO. En base a estos inesperados resultados, la invención proporciona una composición que comprende GSNO que permanece adecuadamente estable durante el almacenamiento, después de ser puesta en la piel (preferiblemente después de regeneración) la composición ejerce significativos efectos vasodilatadores locales y de aumento de la corriente sanguínea, por tanto se puede usar en la prevención y tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Los inventores descubrieron que usando polisacárido(s), tales como quitosán, la estabilidad de tal composición que contiene GSNO conocida puede ser aumentada, en la que se pueden usar uno o más polímeros farmacéuticamente aceptables conocidos como vehículo con efecto estabilizante, opcionalmente junto con aditivo(s). Una observación

especialmente inesperada es que, en mezclas poliméricas que contienen polisacárido, preferiblemente chitosán, el GSNO muestra una estabilidad más alta que en los polímeros puros en sí.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica caracterizada porque comprende GSNO y un polisacárido, junto con polímeros de PVA y PEG y uno o más aditivo(s) farmacéuticamente aceptables.

5 Las realizaciones preferidas son como sigue:

Composición farmacéutica en la forma de un gel acuoso y que contiene polímeros de PVA y PEG como polímero farmacéuticamente aceptable.

Composición farmacéutica que se formula en una forma liofilizada.

Preferiblemente el chitosán es el polisacárido en el uso anterior.

10 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

Polisacárido

15 La expresión "polisacárido" se refiere a carbohidratos macromoleculares donde los monómeros se unen unos a otros mediante enlaces glicosídicos (glicanos). Incluye importantes biopolímeros, tales como el almidón, el glucógeno y la celulosa (que pueden ser considerados como productos de policondensación de dextrano y glucosa), la inulina (producto de policondensación de fructosa), la chitina, el ácido alginico, etc. Los polisacáridos mencionados anteriormente son los productos de policondensación de sacáridos de sólo un único tipo, de ahí que puedan ser considerados como homopolímeros. Naturalmente, en realizaciones de la invención también se pueden usar polisacáridos que comprenden monómeros diferentes (heteroglicanos, p.ej. hemicelulosas, heparina, ácido hialurónico, mureína). Se conocen diversas variaciones de polisacáridos derivatizados (p.ej. derivados desacilados, sulfonizados, etc.) que también se pueden usar en la realización de la invención.

Chitosán

25 Un polisacárido particularmente preferido es el chitosán (β -1,4-poli-D-glucosamina) que puede ser considerado como un derivado desacilado de la chitina (β -1,4-poli-N-acetil-D-glucosamina). De manera general, el chitosán está constituido por más que 5000 unidades de glucosamina, por tanto su peso molecular puede ser incluso de varios millones de daltons. El chitosán es bien conocido como agente reductor del colesterol, se puede aplicar como fibras dietéticas similares a la celulosa, tiene un efecto beneficioso sobre los niveles de lípidos, y está recomendado para prevenir la aterosclerosis y tratar enfermedades del hígado y el riñón. Adicionalmente, promueve la curación de heridas e inhibe procesos inflamatorios [Azad et al., 2004, J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater., **69**, 216-22; Muzzarelli et al., 1999, EXS, **87**, 251-64]. Además, el cuerpo metaboliza el chitosán sin productos finales dañinos, por lo tanto el chitosán también se puede usar en cavidades corporales [Khor y Lim, 2003, Biomaterials, **24**, 2339-49].

GSNO

35 El GSNO (S-nitrosoglutatión) es un compuesto endógeno que tiene un papel importante en el metabolismo del NO. El glutatión reducido, como tripéptido capturador de radicales libres encontrado en las células y ciertos componentes celulares, tales como las mitocondrias, es capaz de reaccionar con el NO, que se une al átomo de azufre de la cadena lateral de la tirosina central de la molécula, y se forma un nitrosoglutatión. Durante el metabolismo del GSNO, este enlace se disocia y el NO es liberado, por tanto el GSNO no sólo es una molécula capturadora de radicales libres sino que es también una molécula transportadora de NO. Se puede encontrar una cantidad significativa de GSNO no sólo en las células, sino que también está presente en el espacio extracelular, p.ej. en la sangre, por tanto su función fisiológica es la contribución en el transporte de NO y en el mantenimiento de un nivel constante de NO en la sangre.

45 Se conocen varios esquemas de reacción para sintetizar GSNO. Según una reacción conocida, se añade nitrito de sodio y después acetona a una disolución acuosa de glutatión ácida y fría, preferiblemente en alícuotas múltiples y durante agitación. Después de la separación y el lavado del precipitado resultante, se obtiene S-nitrosoglutatión adecuadamente puro [Tetrahedron Letters, Vol. 26, No. 16, 2013-2016, 1985]. Se describen otros métodos de preparación en Acc. Chem. Res. 1999, 32, 869-876; J. Chem. Soc. Perkin Trans., I., 1994, donde también se describe la factibilidad de realizar la reacción en un entorno ácido.

50 El GSNO es un compuesto de color marrón que tiene un espectro de absorción característico. Uno de sus dos picos característicos está en el intervalo UV, mientras que el máximo del otro está alrededor de 540 nm. Durante la descomposición, el espectro de absorción del GSNO sufre un cambio. El cambio en la altura del pico a 540 nm es linealmente proporcional a la concentración de GSNO. Se pueden usar longitudes de onda en el intervalo del IR lejano como absorción de fondo, dado que no ocurre ningún cambio en ellas durante el proceso de descomposición del GSNO. Estos rasgos permiten hacer un seguimiento de la concentración de GSNO espectrofotométricamente.

Polímeros farmacéuticamente aceptables

El polisacárido aplicado (preferiblemente quitosán) disminuye significativamente la degradación de GSNO también por sí mismo, sin embargo se usa junto con otros compuestos de tipo polimérico farmacéuticamente aceptables, poli(alcohol vinílico) [PVA] y polietilenglicol [PEG].

5 Aditivos farmacéuticamente aceptables

Además, la composición puede contener cualquier aditivo usual tal que sea necesario para la optimización de los rasgos físicos de la composición. Así, puede contener vehículos inertes, agentes gelificantes, potenciadores de la viscosidad, colorantes, agentes amortiguadores, odorantes, conservantes, estabilizantes, etc.

10 Las composiciones acordes con la invención son preferiblemente hidrogeles o composiciones secas tales que puedan ser transformadas en hidrogel para uso en medicación poniéndolas en contacto con agua.

La composición de tipo hidrogel contiene preferiblemente agua destilada o disolución isotónica acuosa.

Método para la preparación

15 En la preparación de la composición acorde con la invención, se prepara preferiblemente un gel acuoso a partir del polisacárido o a partir de la mezcla polimérica usada, después se mezcla el GSNO en él en una concentración deseada. Si se desea, el gel obtenido se liofiliza. Para un almacenamiento durante mucho tiempo, es factible mantener la composición liofilizada en un refrigerador. De modo factible, la composición liofilizada se regenera con agua, preferiblemente con agua destilada, justo antes de la aplicación.

Descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 3. En el eje X se da el número de la disolución y en el eje Y los valores de absorbancia.

Se hizo un seguimiento de la degradación de cada disolución en los días que siguen: 0., 1., 2., 5., 6., 12., 15., 20., 21., 28., 35. y 44. Aunque considerando cada serie de disoluciones de 5 disoluciones las columnas se solapan parcialmente, la forma de la disminución en absorbancia del GSNO puede ser vista claramente dentro del periodo de tiempo de 44 días estudiado para cada serie de disoluciones.

25 La Figura 2 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 4. En el eje X se da el número de la disolución y en el eje Y los valores de absorbancia relativa (la absorbancia de la disolución de partida se considera como 100). La descomposición de cada disolución se observó en el día 28.

30 La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 5. En el eje X se da el número de la disolución y en el eje Y los valores de absorbancia relativa (la absorbancia de la disolución de partida se considera como 100). La descomposición de cada disolución se observó en el día 69.

Ejemplos

La lista de materiales usados en los ejemplos es la que sigue:

1. Quitosán, pureza técnica (Sigma-Aldrich)
2. Quitosán, bajo peso molecular (Sigma-Aldrich)
- 35 3. Quitosán, peso molecular medio (Sigma-Aldrich)
4. L-glutación (reducido, 99% de pureza, Sigma-Aldrich)
5. Nitrito de sodio (99% de pureza, Sigma-Aldrich)
6. Polietilenglicol (peso molecular medio: 200; Sigma-Aldrich)
7. Poli(alcohol vinílico), hidrolizado al 80%, peso molecular medio: 9000-10000 (Sigma-Aldrich)
- 40 8. Ácido láctico (Fluka)
9. Agua desionizada analíticamente pura (Millipore Milli-Q)

Medición del GSNO

45 Se hizo un seguimiento de la descomposición del GSNO espectrofotométricamente, dado que el espectro de absorción del GSNO sufre cambios y el cambio de tamaño del pico a 540 nm es linealmente proporcional a la concentración de GSNO. Se usaron longitudes de onda en el intervalo del IR lejano como absorción de fondo, dado

que no ocurre ningún cambio en ellas durante la descomposición del GSNO.

Ejemplo 1

Preparación del GSNO

Método A

- 5 Se disolvieron 1,53 g (5 mmol) de L-glutati6n (GSH) en una mezcla de 5,5 ml de agua y 2,5 ml de una disoluci6n acuosa de HCl (2 N) enfriada en ba6o de hielo, despu6s se a6adieron 0,345 g (5 mmol) de nitrito de sodio. La mezcla se agit6 durante 40 min a 5°C, despu6s se a6adieron 10 ml de acetona y la disoluci6n se agit6 durante 10 min adicionales. El dep6sito marr6n precipitado se filtr6 y posteriormente se lav6 con agua enfriada en hielo (5 x 1 ml), acetona (3 x 10 ml) y 6ter (3 x 10 ml). As6 se obtuvieron 1,29 g (3,8 mmol) de S-nitrosoglutati6n (76% de rendimiento).

M6todo B

En primer lugar se a6adieron 0,204 g (0,666 mmol) de GSH, despu6s una cantidad equimolar de NaNO₂ a 8 ml de agua desionizada, y la mezcla se mantuvo en hielo y se agit6 durante 10 min adicionales en la oscuridad. La concentraci6n calculada de la disoluci6n reci6n obtenida es 2,726% en peso.

- 15 En experimentos posteriores se us6 una disoluci6n de GSNO reci6n preparada seg6n el m6todo B anterior.

Ejemplo 2

- 20 Se mezclaron geles de PVA y chitos6n preparados previamente con la disoluci6n de GSNO del ejemplo 1B en una cantidad que dilu6a la disoluci6n de GSNO original en 3 veces. Se pipetearon al6cuotas de 200 µl en los pocillos de una placa de 96 pocillos en duplicados. Se cubrieron las placas y se almacenaron a 4°C en la oscuridad. Dado que durante el almacenamiento las preparaciones perdieron diferentes cantidades de agua, despu6s de acabar el experimento se hizo necesario completarlas con agua hasta el volumen original. La concentraci6n de GSNO se expres6 como el % de disminuci6n de la densidad 6ptica, medida espectrofotom6tricamente al principio y al final del experimento.

Ejemplo 3

- 25 [sobre la base del aparato de medida HI11]

disoluciones 1-5:

Disoluci6n madre: 0,2 g de PVA y 0,6 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Se prepararon las siguientes disoluciones a partir de la disoluci6n madre:

disoluciones 1-5:

- 30
1. 700 µl de disoluci6n madre + 100 µl de disoluci6n acuosa de chitos6n (1%)
 2. 725 µl de disoluci6n madre + 75 µl de disoluci6n acuosa de chitos6n (1%)
 3. 750 µl de disoluci6n madre + 50 µl de disoluci6n acuosa de chitos6n (1%)
 4. 775 µl de disoluci6n madre + 25 µl de disoluci6n acuosa de chitos6n (1%)
 5. 800 µl de disoluci6n madre

- 35 disoluciones 6-10:

Disoluci6n madre: 0,15 g de PVA y 0,65 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 6-10 se prepararon a partir de esta seg6n los vol6menes dados para las disoluciones 1-5.

disoluciones 11-15:

- 40 Disoluci6n madre: 0,1 g de PVA y 0,7 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 11-15 se prepararon a partir de esta seg6n los vol6menes dados para las disoluciones 1-5.

disoluciones 16-20:

Disoluci6n madre: 0,05 g de PVA y 0,75 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 16-20 se prepararon a partir de esta seg6n los vol6menes dados para las disoluciones 1-5.

disoluciones 21-25:

Disolución madre: 0,8 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q) (disolución exenta de PVA). Las disoluciones 21-25 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-5.

Los experimentos se realizaron de manera análoga al ejemplo 2.

- 5 La Figura 1 muestra los resultados obtenidos. Se hizo un seguimiento de la degradación de cada disolución en los días que siguen: 0., 1., 2., 5., 6., 12., 15., 20., 21., 28., 35. y 44. Aunque considerando cada serie de disoluciones de 5 disoluciones las columnas se solapan parcialmente, la forma de la disminución en absorbancia del GSNO puede ser vista claramente dentro del periodo de tiempo de 44 días estudiado para cada serie de disoluciones. También se puede ver que siempre la concentración de chitosán más alta muestra la estabilidad más alta dentro de la serie de disoluciones. De manera interesante, los mejores resultados se obtuvieron con la serie de disoluciones 6-10 y 11-15, por lo tanto el sistema es sensible también a la relación PVA/PEG.

Ejemplo 4

Disolución madre: 1 g de PVA disuelto en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q) (disolución exenta de PEG). Se prepararon las siguientes disoluciones a partir de la disolución madre:

15 disoluciones 1-4:

1. 400 µl de disolución madre + 400 µl de disolución acuosa de chitosán (1%)
2. 600 µl de disolución madre + 200 µl de disolución acuosa de chitosán (1%)
3. 700 µl de disolución madre + 100 µl de disolución acuosa de chitosán (1%)
4. 800 µl de disolución madre (exenta de chitosán)

20 disoluciones 5-8:

Disolución madre: 0,8 g de PVA y 0,2 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 5-8 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-4.

disoluciones 9-12:

- 25 Disolución madre: 0,6 g de PVA y 0,4 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 9-12 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-4.

disoluciones 13-16:

Disolución madre: 0,4 g de PVA y 0,6 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 13-16 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-4.

disoluciones 17-20:

- 30 Disolución madre: 0,2 g de PVA y 0,8 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 17-20 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-4.

disoluciones 21-24:

Disolución madre: 1 g de PEG disuelto en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q) (disolución exenta de PVA). Las disoluciones 21-24 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-4.

- 35 Los experimentos se realizaron de manera análoga al ejemplo 2.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos. La descomposición de cada disolución se observó en el día 28.

Ejemplo 5

Disolución madre: 0,8 g de PVA disuelto en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q) (disolución exenta de PEG). Se prepararon las siguientes disoluciones a partir de la disolución madre:

40 disoluciones 1-4:

1. 400 µl de disolución madre + 400 µl de disolución acuosa de chitosán (1%)
2. 600 µl de disolución madre + 200 µl de disolución acuosa de chitosán (1%)
3. 700 µl de disolución madre + 100 µl de disolución acuosa de chitosán (1%)

4. 800 µl de disolución madre (exenta de chitosán)

disoluciones 5-8:

Disolución madre: 0,6 g de PVA y 0,2 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 5-8 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-4.

5 disoluciones 9-12:

Disolución madre: 0,4 g de PVA y 0,4 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 9-12 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-4.

disoluciones 13-16:

10 Disolución madre: 0,2 g de PVA y 0,6 g de PEG disueltos en 4 ml de agua (Millipore Milli-Q). Las disoluciones 13-16 se prepararon a partir de esta según los volúmenes dados para las disoluciones 1-4.

Los experimentos se realizaron de manera análoga al ejemplo 2.

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos. La descomposición de cada disolución se observó en el día 69.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica caracterizada porque comprende S-nitrosoglutatión (GSNO) y un polisacárido, junto con polímeros de poli(alcohol vinílico) (PVA) y polietilenglicol (PEG) y uno o más aditivo(s) farmacéuticamente aceptables.
- 5 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque el polisacárido es chitosán.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la composición es un gel acuoso.
4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la composición se formula en una forma liofilizada.

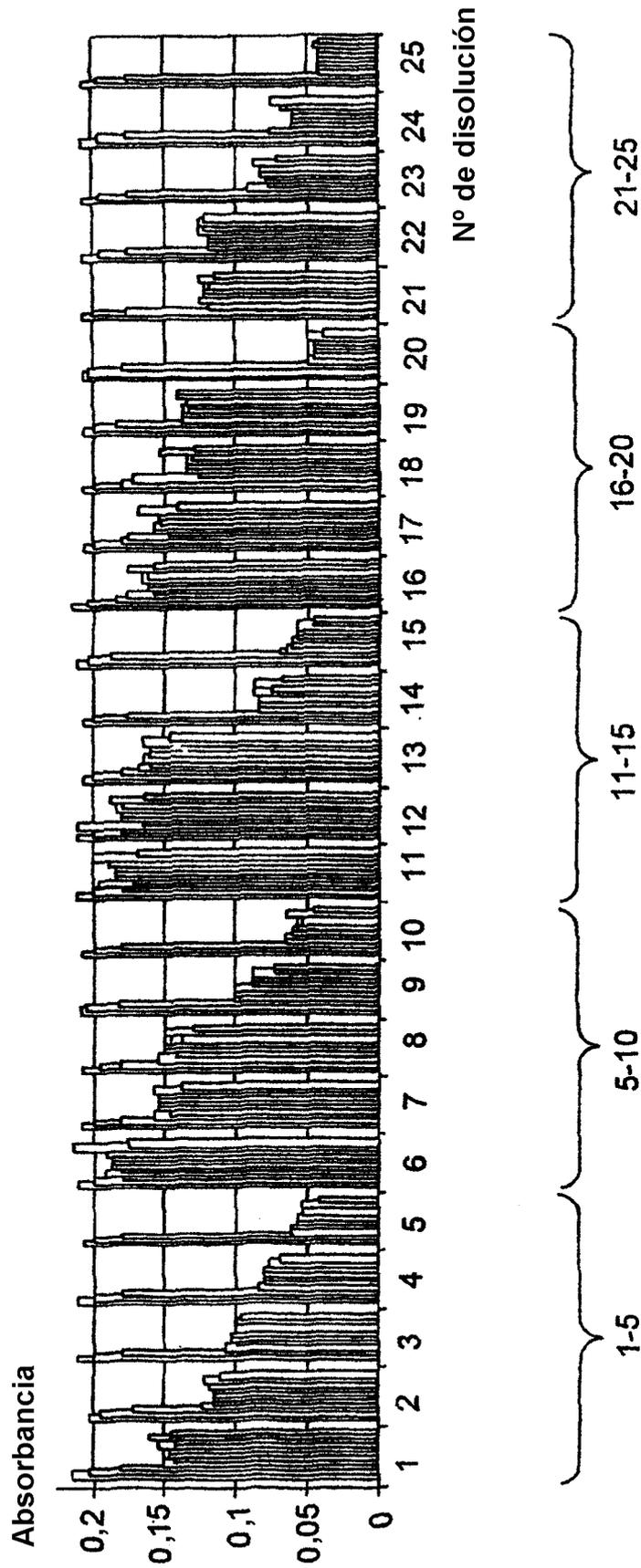


Fig. 1

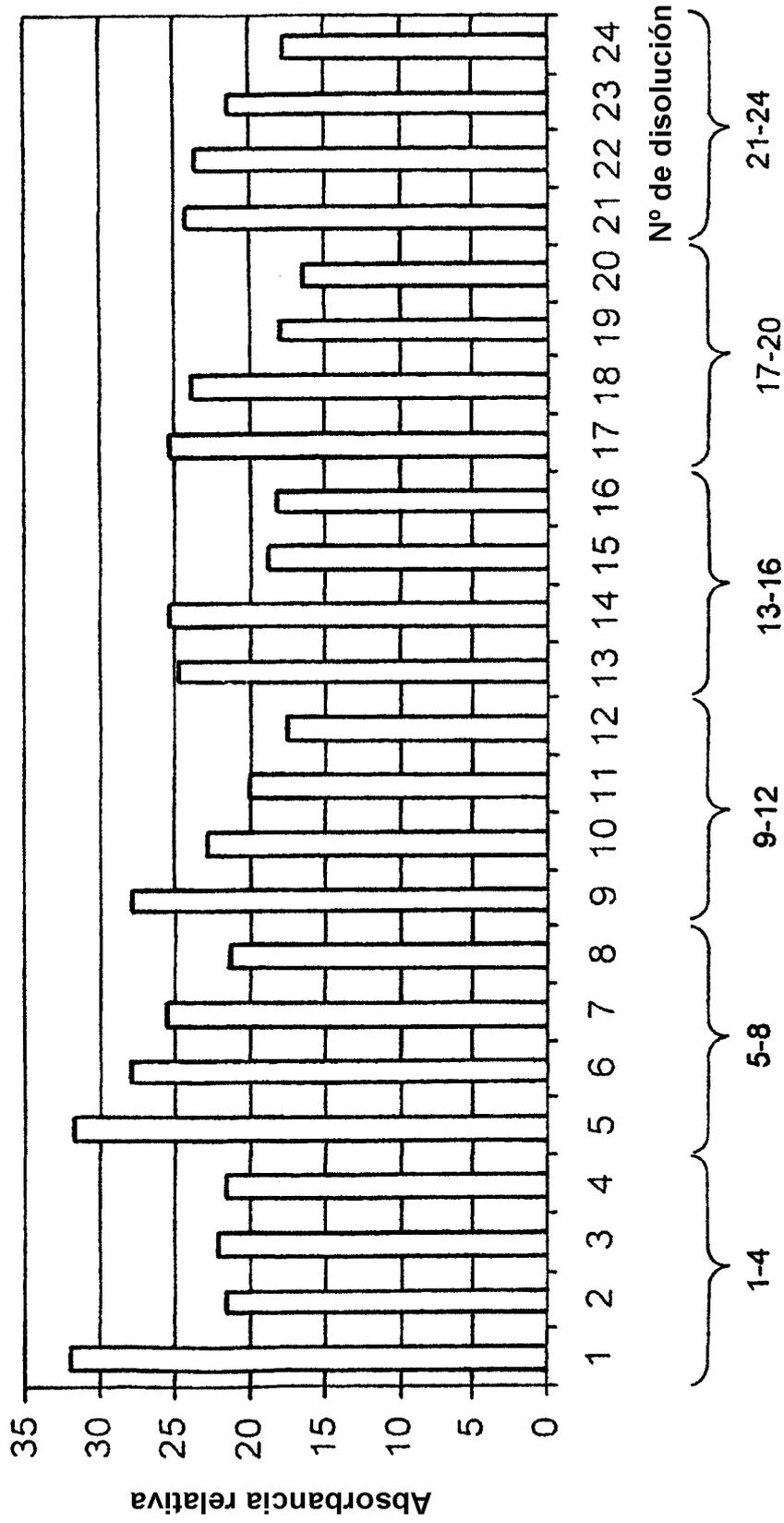


Fig.2

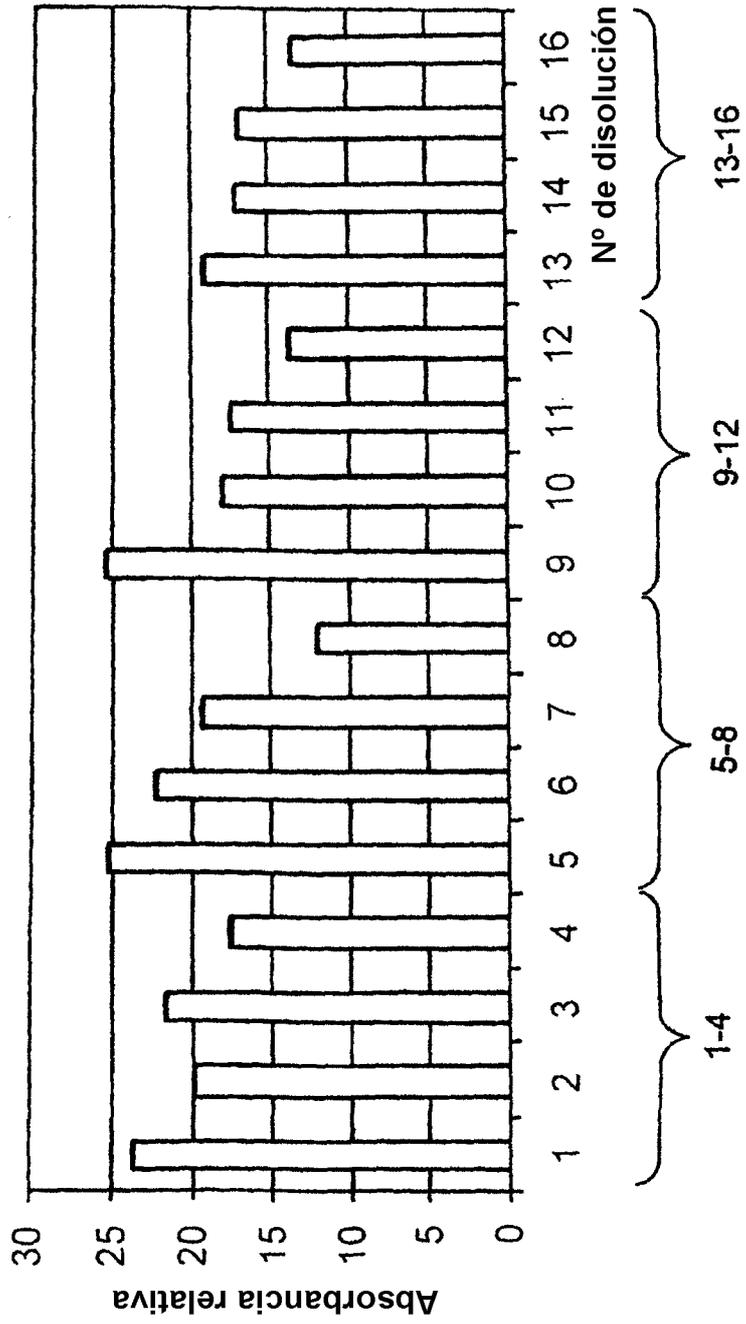


Fig.3