

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 473 577**

51 Int. Cl.:

A61K 31/12	(2006.01) A61P 17/02	(2006.01)
A61K 31/198	(2006.01) A61P 17/06	(2006.01)
A61K 31/736	(2006.01) A61P 17/16	(2006.01)
A61K 36/483	(2006.01) A61Q 19/00	(2006.01)
A61K 36/9066	(2006.01) A61K 8/73	(2006.01)
A61K 35/12	(2006.01)	
A61K 35/30	(2006.01)	
A61K 35/32	(2006.01)	
A61K 35/36	(2006.01)	
A61P 17/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2011 E 11758490 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014 EP 2583682**

54 Título: **Composición antioxidante que comprende galactomanano y N-acetil-cisteína**

30 Prioridad:

15.06.2010 EP 10165939

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.07.2014

73 Titular/es:

**HISTOCELL, S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia Ed. 800, 2º
48160 Derio (Bizkaia), ES**

72 Inventor/es:

**CASTRO FEO, MARÍA BEGOÑA;
AZCOITIA RAMSDEN, IKER;
PALOMARES CASADO, TEODORO;
HERRERO DE MIGUEL, JONE;
ALONSO VARONA, ANA ISABEL y
DEL OLMO BASTERRECHEA, MAITE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 473 577 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 antioxidante que comprende galactomanano y N-acetil-cisteína

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a composiciones antioxidantes que comprenden galactomanano y N-acetil-cisteína, y a su uso en el tratamiento de enfermedades, trastornos y estados que afectan a la piel, particularmente estados cutáneos que cursan con la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel humana, tales como fotoenvejecimiento y otro daño de la piel relacionado con la edad. También se refiere a apósitos para heridas que comprenden galactomanano y N-acetil-cisteína, y particularmente a las composiciones reivindicadas en la presente para la administración de principios activos a heridas.

10 ANTECEDENTES

El envejecimiento de la población y el aumento de enfermedades metabólicas crónicas tales como hipertensión o diabetes han favorecido la presencia de úlceras crónicas en los últimos años.

15 Ocasionalmente, debido al estado de salud del paciente (diabetes) o a la presencia de una gran cantidad de daño en el tejido (quemaduras graves), pueden surgir fenómenos que alteran la serie de procesos que deben tener lugar para que se produzca la cicatrización, desarrollándose una úlcera crónica.

La formación de una úlcera crónica está asociada con un proceso inflamatorio excesivo que altera la síntesis de las moléculas de señalización implicadas en la regulación del proceso que tiene lugar en la cicatrización. Estudios recientes relacionan directamente la fisiopatología de las úlceras crónicas con el estrés oxidativo presente en el lecho de la herida, como consecuencia del entorno proinflamatorio de la zona lesionada.

20 Cuando se produce una situación de estrés oxidativo, el organismo tiene mecanismos de detoxificación que permiten controlar el exceso de especies reactivas de oxígeno generadas, en cambio, cuando hay una falta de ajuste entre la capacidad detoxificante del organismo y los radicales libres presentes en el lecho de la herida, se obstaculiza el proceso de cicatrización, dando lugar a una úlcera crónica.

25 Una falta de ajuste en los mecanismos de detoxificación de los metabolitos reactivos de oxígeno (MRO) es una de las causas principales de cronicidad en las úlceras.

La cicatrización de heridas crónicas se puede inducir mediante el uso de apósitos antioxidantes para heridas que reaccionan específicamente con especies reactivas de oxígeno en exceso y por tanto reducen el nivel de estrés oxidativo. En la técnica, se describen diferentes ejemplos de materiales para promover la cicatrización.

30 Por ejemplo, en el documento US 6406712, se ha descrito un material de apósito para heridas, que se forma mezclando polvo de polímero hidrocoloidal seco con agua contenida en un envase sellado que tiene una barrera temporal o que puede retirarse manualmente de modo que el polímero seco y el agua pueden almacenarse por separado el uno del otro mientras se encuentran en el envase.

35 Otra descripción, en la solicitud de patente WO 01/49258A2, comprende materiales de contacto con tejido, tales como polímero biocompatible que comprende un polisacárido no gelificable, tal como goma guar, que atrapa oxígeno dentro del material de tipo espuma de célula cerrada que puede proporcionar o mantener una tensión de oxígeno óptima en un sitio tisular comprometido mientras absorbe el fluido en exceso y optimizar el microentorno para facilitar la reparación y regeneración tisulares si es necesario.

40 La solicitud de patente EP0781550A1 describe una composición farmacéutica bioadhesiva para la liberación controlada de principios activos, antiulcerosos entre otros, constituida por un copolímero de acetato de vinilo y polivinilpirrolidona y un componente adicional, tal como la goma de algarrobo entre otros.

También se ha descrito recientemente la actividad antioxidante de los galactomananos con la reducción de la peroxidación lipídica de sistemas sometidos a radiación UVA. También se conocen su capacidad para aumentar la elasticidad de diferentes mezclas de hidrogeles y su capacidad para absorber agua, que pueden proporcionar al lecho de la herida el grado necesario de humedad que necesita el proceso de la cicatrización.

La solicitud internacional WO2005/084650A1 reivindica un sistema de administración de principios activos secos y estables en almacenamiento para principios farmacéuticamente activos para su uso dérmico con fines de cicatrización de heridas. El sistema de administración comprende un xerogel en el que el material que forma el gel es un polisacárido, por ejemplo derivados de galactomanano. Cuando el xerogel entra en contacto con fluidos, se rehidrata y forma un hidrogel, mediante lo cual se disuelven los principios activos aplicados y se liberan a una velocidad controlada desde el hidrogel conduciendo a una concentración localmente alta.

Se describen materiales bioabsorbibles sólidos para su uso como apósitos para heridas en la solicitud de patente EP0792653, en los que se forma un sólido de este tipo mediante una mezcla de xantano, y al menos un galactomanano, tal como goma guar o goma de algarrobo. El material también comprende agentes terapéuticos entre los que se prefieren particularmente los que promueven activamente la cicatrización de heridas tales como glucosaminoglicanos.

En un procedimiento similar tal como se describió anteriormente, la solicitud internacional WO99/25395 reivindica un apósito para heridas con fines de cicatrización, en el que la matriz comprende un polímero reticulado biocompatible y un polisacárido no gelificable, un galactomanano, que incluye también uno o más principios activos, por ejemplo, agentes de cicatrización de heridas como factores de crecimiento, mucopolisacáridos y proteínas.

Se describen otros tipos de apósitos para la cicatrización de heridas en las solicitudes internacionales WO2004/112850 y WO2005/049101 en los que generalmente el material está formado por un sustrato bioabsorbible, que podría ser galactomanano, teñido con un colorante antioxidante, que puede reaccionar con especies reactivas de oxígeno, reduciendo, de esa manera, el nivel de estrés oxidativo en la herida.

También se conoce la N-acetil-cisteína como molécula antioxidante que actúa aumentando la síntesis de glutatión (GSH) intracelular. El efecto de reducción de GSH contribuye a eliminar directamente las especies reactivas de oxígeno y también a reciclar antioxidantes ya usados. Su uso en úlceras crónicas reduciría el estrés oxidativo de las mismas, favoreciendo así su cicatrización (Manikandan, P. *et al*, Molecular and Cellular Biochemistry, 2006, 290, 87-96; Rani Thaakur, S. *et al*, Pharmacologyonline, 2009, 1, 369-376).

En EP0848951 se describe una composición transdérmica que comprende N-acetil-cisteína en combinación con portadores adecuados que incluyen los hidrogeles. La composición se emplea en el tratamiento de úlceras venosas, úlceras diabéticas y úlceras por presión.

En Scharstuhl, A. *et al*: "Curcumin-induced fibroblast apoptosis and in vitro wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implications for scar formation", Journal Of Cellular and Molecular Medicine, University Press Carol Davila, Bucharest, RO, vol. 13, no. 4, 1 Abril 2009 (2009-04-01), en las páginas 712-725, se divulga una combinación de N-acetil-cisteína y curcumina en el tratamiento de la formación de cicatrices.

También se conoce la actividad antioxidante de la curcumina. La curcumina es el estado purificado del extracto bruto de la raíz de la cúrcuma, una planta cultivada principalmente en el Sureste asiático y ampliamente usada en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la piel. Gopinath, D. (Biomaterials, 2004, 25, 1911-1917) demuestra la capacidad mejorada de cicatrización de heridas por el antioxidante curcumina cuando se incorpora en una matriz de colágeno, que también actúa como matriz de soporte para el tejido regenerativo.

Aunque las propiedades antioxidantes de galactomananos y N-acetil-cisteína están bien documentadas en la técnica anterior, no existe ninguna indicación sobre las ventajas particulares conferidas por la combinación de ambos componentes y, particularmente, en cuanto al efecto antioxidante sinérgico proporcionado sobre cultivos celulares que experimentan un estrés oxidativo extenso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto que la combinación de galactomanano y N-acetil-cisteína proporciona un efecto sinérgico en la capacidad antioxidante de ambos componentes, que da como resultado una ventaja inesperada para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos que resultan de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto o enfermedades o estados que inducen la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto.

Las pruebas experimentales han mostrado que células de piel humana (fibroblastos) sometidas a un estrés oxidativo experimentan un aumento en la capacidad / preservación de la supervivencia celular cuando se administra una combinación de galactomanano, tal como goma de algarrobo, y N-acetil-cisteína a las células en cultivo.

Experimentos adicionales también han revelado que dicha combinación proporciona una reducción significativa en los niveles intracelulares de metabolitos reactivos de oxígeno en cultivos celulares de fibroblastos sometidos a un estrés oxidativo en presencia de peróxido de oxígeno, en comparación con goma de algarrobo o N-acetil-cisteína solas.

- 5 Además, se ha observado un efecto sinérgico incluso mayor cuando se añade curcumina (o cúrcuma) a la combinación de galactomanano y N-acetil-cisteína.

Por tanto, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una composición antioxidante que comprende galactomanano y N-acetil-cisteína para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o un estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto o de una enfermedad o un estado cutáneo que induce la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto.

- 10

Se prefiere particularmente el uso de goma de algarrobo como galactomanano en la composición usada en la invención.

En una realización particular, la composición antioxidante tal como se definió anteriormente comprende además curcumina (cúrcuma) como componente antioxidante adicional.

- 15 La invención también se refiere a una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende galactomanano y N-acetil-cisteína para el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o un estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto o de una enfermedad o un estado cutáneo que induce la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto, que comprende la administración de.

- 20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición antioxidante que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y curcumina.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a la composición antioxidante tal como se ha definido anteriormente para su uso como medicamento.

- 25 Otro aspecto de la invención se refiere a un hidrogel que comprende galactomanano y N-acetil-cisteína, en el que el galactomanano está en forma de una matriz reticulada, y se incorpora N-acetil-cisteína en dicha matriz reticulada de galactomanano. En una realización particular, el galactomanano se reticula por medio de un agente de reticulación, preferiblemente el agente de reticulación es glutaraldehído.

En otro aspecto, la invención se refiere al hidrogel tal como se ha definido anteriormente, en el que la matriz de galactomanano comprende además curcumina incorporada en la misma.

- 30 Adicionalmente, la presente invención también se refiere al hidrogel tal como se ha definido anteriormente que incluye además células. Se prefieren particularmente células seleccionadas del grupo que consiste en fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células madre mesenquimales diferenciadas o no diferenciadas, células corneales, células epiteliales, células del sistema leucocitario, células del sistema hematopoyético, células madre diferenciadas o no diferenciadas, células condrogénicas, osteoblastos, miocitos, adipocitos y neuronas u otras
35 células del sistema nervioso periférico y central.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un hidrogel tal como se ha definido anteriormente que comprende:

- a) disolver el galactomanano en una disolución acuosa;
- b) someter el galactomanano a una reticulación química añadiendo un agente de reticulación a la disolución acuosa de galactomanano para obtener un hidrogel que comprende una matriz de glucomanano reticulada;
- 40 c) incorporar N-acetil-cisteína, y opcionalmente la curcumina, en la matriz de glucomanano reticulada.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un apósito para heridas que comprende el hidrogel tal como se ha definido anteriormente.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un hidrogel tal como se ha definido anteriormente para su uso como medicamento.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un hidrogel tal como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento y/o la cicatrización de heridas traumáticas y quirúrgicas agudas, quemaduras, escaldaduras, fistulas, úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras de etiología mixta, y otras lesiones y trastornos inflamatorios y heridas crónicas o necróticas.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición cosmética que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y curcumina.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso no terapéutico de una composición cosmética que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y opcionalmente curcumina para un daño de la piel relacionado con la edad.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una composición cosmética que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y opcionalmente curcumina para su uso en la protección frente a la radiación UV.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y, opcionalmente curcumina, para su uso en el tratamiento del daño de la piel relacionado con la edad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra: (a) los resultados de proliferación celular en fibroblastos por medio del ensayo colorimétrico de MTT, usando diferentes concentraciones de NAC, y (b) los valores de CI_{50} con respecto al control.

20 La figura 2 muestra: (a) los resultados de proliferación celular en fibroblastos por medio del ensayo colorimétrico de MTT, usando diferentes concentraciones de cúrcuma, y (b) los valores de CI_{50} con respecto al control.

La figura 3 muestra los resultados correspondientes al ensayo colorimétrico de MTT cuando se somete un cultivo de fibroblastos a un entorno oxidativo y cuando se pone en contacto con LBG al 1%, NAC 1 mM, cúrcuma 1 μ M y combinaciones de los mismos.

25 La figura 4 muestra los niveles intracelulares de MRO de fibroblastos sometidos a un entorno oxidativo usando 1 mM de H_2O_2 , por medio de las unidades de fluorescencia obtenidas en el marcaje con la sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína y cuando se ponen en contacto los fibroblastos con LBG al 1%, NAC 5 mM, cúrcuma 5 μ M y combinaciones de los mismos.

30 La figura 5 muestra fotografías tomadas del microscopio electrónico de barrido (MEB) de un hidrogel de goma de algarrobo reticulada con glutaraldehído a: (a) el 0% en peso; (b) el 0,5% en peso; (c) el 1% en peso y (d) el 2,5% en peso.

La figura 6 muestra una vista macroscópica de una biopsia de la evolución durante 10 días de lesiones cutáneas generadas quirúrgicamente en la zona dorsal en un modelo animal de cicatrización en cerdos.

La figura 7 muestra una fotografía de la evolución durante 3 días de lesiones cutáneas generadas quirúrgicamente en la zona dorsal en un modelo animal de cicatrización en cerdos.

35 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La composición antioxidante usada en la invención comprende dos agentes antioxidantes, concretamente un galactomanano y N-acetil-cisteína. Estos componentes se mezclan físicamente en la composición sin estar unidos por ninguna interacción o enlace químico.

40 Tal como se muestra en las pruebas experimentales, la combinación de un galactomanano, tal como goma de algarrobo, y N-acetil-cisteína proporciona un efecto antioxidante sinérgico sobre cultivos celulares de fibroblastos sometidos a un estrés oxidativo, mejorando la capacidad de supervivencia celular mientras se reducen los niveles intracelulares de metabolitos reactivos de oxígeno.

Los galactomananos son polisacáridos que contienen una estructura principal de manosa con grupos laterales de galactosa, más específicamente una estructura principal de beta-D-manopiranososa con enlaces (1-4) con puntos de ramificación desde sus posiciones 6 unidas a alfa-D-galactosa, es decir, alfa-D-galactopiranososa con enlaces 1-6. Las gomas de galactomananos incluyen goma de algarrobo (LBG, *locust bean gum*), goma guar, goma de *Cassia*, goma tara, goma de mezquite y goma de alholva.

En una realización particular, el galactomanano se selecciona del grupo que consiste en goma guar, goma de algarrobo, goma de *Cassia*, goma tara, goma de mezquite, goma de alholva y goma de semilla de trébol blanco. Más preferiblemente, el galactomanano es goma de algarrobo. La goma de algarrobo es un polisacárido de manopiranososa que consiste en una estructura principal de manopiranososa con puntos de ramificación desde sus posiciones 6 unidas a residuos de α -D-galactosa. La goma de algarrobo tiene aproximadamente 4 residuos de manosa por cada residuo de galactosa (una razón manosa/galactosa de aproximadamente 4).

Los galactomananos pueden obtenerse a partir de fuentes recombinantes o sintéticas. Por ejemplo, la galactomanosa puede sintetizarse *in vivo* a partir de GDP-manosa y UDP-galactosa por las enzimas manano sintasa y galactosiltransferasa. Se ha aislado y caracterizado el ADN que codifica para estas proteínas, (publicación estadounidense 2004/0143871) y se ha mostrado que las plantas recombinantes transformadas con estas enzimas expresan niveles elevados de galactomanano. Además, el grado de galactosilación de la estructura principal de manopiranososa puede verse influida por la presencia (o ausencia) de alfa-galactosidasa *in vivo*, (véase Edwards *et al.* Plant Physiology (2004) 134: 1153-1162). La alfa-galactosidasa elimina residuos de galactosa de la estructura principal de manopiranososa. Por ejemplo, las semillas que expresan de manera natural galactomananos con un menor grado de galactosilación pueden expresar (o expresar más) alfa galactosidasa, que elimina restos de galactosa de la estructura principal de manopiranososa en esas especies de planta. La enzima alfa-galactosidasa puede emplearse para reducir la presencia de galactosa en la estructura principal de manopiranososa de gomas de galactomanosa que se producen de manera natural en una manipulación de laboratorio de las características de la goma de galactomanosa que se produce de manera natural. Las realizaciones de la presente invención incluyen galactomananos, que se han tratado con alfa-galactosidasa para reducir la presencia de galactosa en la estructura principal de manopiranososa. Las realizaciones de la presente invención incluyen gomas de galactomanano que se han tratado con alfa-galactosidasa u otras enzimas o tratamientos químicos, para dotar a la goma de las características deseadas como superficies de cultivo celular.

La proporción en peso de galactomanano en la composición de la invención oscila entre el 1 y el 5% con respecto al peso total de la composición.

La N-acetil-cisteína es una molécula antioxidante que interviene en la síntesis de glutatión intracelular, un compuesto que contribuye a eliminar directamente los radicales libres de oxígeno en la célula, así como a reciclar antioxidantes ya utilizados.

La N-acetil-cisteína está preferiblemente presente en la composición de la invención en una concentración que oscila entre 1 y 10 mM, más preferiblemente entre 1 y 5 mM.

En una realización preferida, la composición antioxidante utilizada en la invención es adecuada para la aplicación tópica sobre la piel. Las composiciones antioxidantes tópicas pueden adoptar cualquiera de una amplia variedad de formas, e incluyen, por ejemplo apósitos, lociones, disoluciones, aerosoles, cremas, geles, pomadas.

Las lociones son preparaciones que han de aplicarse en la superficie de la piel sin fricción, y son normalmente preparaciones líquidas o semilíquidas en las que están presentes partículas sólidas, incluyendo los principios activos, en una base acuosa o alcohólica. Las lociones son habitualmente suspensiones de sólidos, y comprenden preferiblemente una emulsión aceitosa líquida del tipo de aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas para tratar grandes áreas corporales debido a la facilidad de aplicar una composición más fluida. Generalmente, se prefiere que la materia insoluble en una loción (hidrogel) esté finamente dividida. Las lociones contienen desde aproximadamente el 0,001% hasta aproximadamente el 30% de los principios activos, desde el 1% hasta el 25% de un emoliente y la cantidad apropiada de agua. Ejemplos de emolientes son ceras hidrocarbonadas y aceites tales como aceites minerales, vaselina, parafina, ceresina, cera microcristalina, polietileno y perhidroescualeno; aceites de silicona tales como dimetilpolisiloxanos, metilfenilpolisiloxanos y copolímeros de glicol-silicona solubles en agua y solubles en alcohol; triglicéridos, tales como grasas y aceites animales y vegetales; alquil ésteres de ácidos grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono, alquencil ésteres de ácidos grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono; ácidos grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono, tales como ácidos pelargónico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, isoesteárico, hidroxiesteárico, oleico, linoleico, ricinoleico, araquidónico, behénico y erúxico; alcoholes grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono, tales como los alcoholes laurílico, miristílico, palmítico, estearílico, isoestearílico, hidroxiestearílico, oleílico, ricinoleílico, behenílico, erucílico y 2-octildodecanol son ejemplos apropiados de alcoholes grasos; éteres de alcoholes grasos, tales como alcoholes grasos etoxilados que tienen de 10 a 20 átomos de carbono incluyendo alcoholes laurílico, cetílico, estearílico, isoestearílico, oleílico y de

5 colesterol que tienen unidos a los mismos desde 1 hasta 50 grupos óxido de etileno o de 1 a 50 grupos óxido de propileno; lanolina y derivados; ceras tales como cera de abejas, esperma de ballena, miristato de miristoilo y estearato de estearilo; derivados de cera de abejas, tales como cera de abejas de polioxietileno-sorbitol; ceras vegetales, incluyendo ceras carnauba y candelilla; fosfolípidos tales como lecitina y derivados; esteroides, tales como

10 Las lociones de la invención contendrían adicionalmente desde el 1% hasta el 30% de un emulsionante. Los emulsionantes puede ser aniónicos, catiónicos o no iónicos. Los ejemplos de emulsionantes no iónicos incluyen alcoholes grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono, alcoholes grasos que tienen de 10 a 20 átomos de carbono condensados con de 2 a 20 moles de óxido de etileno u óxido de propileno, alquifenoles con de 6 a 12 carbonos en la cadena de alquilo condensados con de 2 a 20 moles de óxido de etileno, mono- y di-acil ésteres de etilenglicol, en los que el ácido graso contiene desde 10 hasta 20 carbonos, monoglicéridos en los que el ácido graso contiene desde 10 hasta 20 carbonos, dietilenglicol, polietilenglicoles de peso molecular 200 a 6000, polipropilenglicol de peso molecular 200 a 3000, glicerol, sorbitol, sorbitano, polioxietileno-sorbitol, polioxietileno-sorbitano y ésteres de cera hidrófilos. Los emulsionantes aniónicos adecuados incluyen ácidos grasos saponificados (jabones) con potasio, sodio o trietanolamina, en los que el ácido graso contiene desde 10 hasta 20 carbonos. Otros emulsionantes aniónicos adecuados incluyen metales alcalinos, amonio o amonio sustituido con sulfatos de alquilo, arilsulfonatos de alquilo y alquiletoxi-étersulfonatos que tienen de 10 a 30 carbonos en la cadena de alquilo y desde 1 hasta 50 unidades de óxido de etileno. Los emulsionantes catiónicos adecuados incluyen compuestos de amonio y morfolinio y piridinio cuaternarios.

El resto de la composición es agua. Las lociones se formulan simplemente mezclando todos los componentes entre sí. Preferiblemente, los principios activos se disuelven en el emoliente y se añade la mezcla resultante al agua.

25 Las composiciones de la presente invención también pueden formularse en forma de una disolución. Las disoluciones son mezclas homogéneas preparadas disolviendo los principios activos en un líquido de tal manera que las moléculas de los principios activos disueltos se dispersan entre las del disolvente. Las disoluciones contienen desde el 0,001% hasta el 30% de los principios activos antioxidantes y la cantidad adecuada de un disolvente orgánico. Sustancias orgánicas útiles como disolvente son propilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerina, ésteres de sorbitol, 1,2,6-hexanotriol, etanol, isopropanol, tartrato de dietilo, butanodiol y mezclas de los mismos. Tales sistemas de disolventes también pueden contener agua.

30 Estas composiciones se aplican sobre la piel en forma de una disolución, o se formulan disoluciones en forma de aerosol y se aplican sobre la piel como una pulverización.

35 Las composiciones en forma de aerosol contienen adicionalmente desde el 25% hasta el 80% de un propelente adecuado. Los ejemplos de propelentes adecuados incluyen hidrocarburos de bajo peso molecular clorados, fluorados o fluoroclorados. También se usan óxido nitroso y dióxido de carbono como gases propelentes. Se usa suficiente cantidad para expeler el contenido del cartucho.

40 La composición de la presente invención puede formularse también en forma de una crema. Por ejemplo, las cremas, tal como se sabe bien en las técnicas de formulaciones farmacéuticas y cosméticas, son emulsiones líquidas o semisólidas viscosas, o bien de aceite en agua o bien de agua en aceite. Las bases de cremas son lavables con agua y contienen una fase aceitosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase aceitosa está compuesta generalmente por vaselina y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico. Habitualmente, aunque no necesariamente, la fase acuosa supera a la fase aceitosa en volumen, y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero y puede seleccionarse de emulsionantes mencionados anteriormente para lociones o mezclas de los mismos.

45 Los geles son sistemas de tipo suspensión, semisólidos. Los geles de fase única contienen macromoléculas orgánicas distribuidas de manera sustancialmente uniforme por todo el líquido portador, que es normalmente acuoso, pero también, preferiblemente, contienen un alcohol y, opcionalmente, un aceite. Macromoléculas orgánicas preferidas, es decir, agentes gelificantes, pueden ser polímeros químicamente reticulados tales como polímeros de ácido acrílico reticulados, por ejemplo la familia "carbómero" de polímeros, por ejemplo, carboxipolialquilenos, que pueden obtenerse comercialmente con la marca comercial Carbopol®. También pueden preferirse polímeros hidrófilos tales como poli(óxido de etileno), copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y poli(alcohol vinílico); polímeros celulósicos tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa; gomas tales como goma tragacanto y xantana; alginato de sodio; y gelatina.

Las pomadas, tal como se conoce bien en la técnica, son preparaciones semisólidas que normalmente se basan en vaselina u otros derivados del petróleo. La base de pomada específica que va a usarse, tal como apreciarán los expertos en la técnica, es una que proporcionará varias características deseables, por ejemplo emoliencia. Las bases de pomadas pueden agruparse en cuatro clases: bases oleaginosas, bases emulsionables, bases de emulsión y bases solubles en agua. Las bases de pomada oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de pomada emulsionables, también conocidas como bases de pomada absorbentes, contienen poca o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases de pomada de emulsión son o bien emulsiones de agua en aceite o bien emulsiones de aceite en agua e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de pomada solubles en agua preferidas se preparan a partir de polietilenglicoles de peso molecular variable.

También puede incorporarse un vehículo farmacéutico aceptable en las composiciones y puede ser cualquier vehículo usado convencionalmente en la técnica. Los ejemplos incluyen agua, alcoholes inferiores, alcoholes superiores, alcoholes polihidroxilados, monosacáridos, disacáridos, polisacáridos, aceites de hidrocarburos, ceras, ácidos grasos, aceites de silicona, tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, tensioactivos de silicona y mezclas a base de agua y mezclas a base de emulsión de dichos vehículos.

Las composiciones tópicas descritas anteriormente pueden aplicarse regularmente a cualquier zona de la piel que requiera tratamiento con la frecuencia y en la cantidad necesarias para lograr los resultados deseados. La frecuencia de tratamiento depende de la naturaleza de la enfermedad o el estado cutáneo, es decir, la enfermedad o el estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel o que implica la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel, así como el grado de daño o deterioro de la piel.

Debido a las propiedades antioxidantes de la combinación de galactomanano y N-acetil-cisteína, puede usarse para tratar o prevenir una enfermedad o un estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto, o de una enfermedad o un estado cutáneo que implica la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto, particularmente en fibroblastos y queratinocitos de la piel.

Este tratamiento incluye poner en contacto con la piel de un sujeto aplicando directamente a la piel una formulación tópica tal como se describe en el presente documento, de una manera que afecta al sujeto, y/o al tejido cutáneo en el sujeto y/o a una o una pluralidad de células, para obtener un efecto farmacológico y/o efecto fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a prevenir completa o parcialmente una enfermedad o un trastorno tal como un estado que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel o que implica la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel, o un signo o síntoma del mismo, y/o el efecto puede ser terapéutico en cuanto a aliviar síntomas o signos o proporcionar una cura parcial o completa para un trastorno o una enfermedad de este tipo y/o sustancialmente reducir un efecto adverso atribuible al trastorno o la enfermedad.

Las realizaciones relacionadas contemplan, a modo de ejemplo:

(i) prevenir que se produzca la enfermedad o el trastorno (por ejemplo, estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno o que implica la producción de especies reactivas de oxígeno) en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o el trastorno, pero al que aún no se le ha diagnosticado que lo tiene;

(ii) inhibir la enfermedad o el trastorno, es decir, detener su evolución; o

(iii) aliviar o mejorar la enfermedad o el trastorno, es decir, provocar su regresión.

En una realización particular, el tratamiento de una enfermedad o un estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno incluye la reparación y regeneración de células o tejido dañado o lesionado en el sitio de daño de la piel. Este daño puede ser el resultado de la exposición del sujeto a una fuente de estrés oxidativo que puede promover la producción de especies de radicales de oxígeno en la piel, tal como la radiación de la luz solar (fotodaño), agentes químicos (incluyendo otros agentes tópicos tales como compuestos médicos, farmacéuticos o cosméticos), radioterapia o quimioterapia. También incluye tratamientos profilácticos para prevenir tal daño, por ejemplo, antes de la exposición del sujeto a una fuente de estrés oxidativo que puede promover la producción de especies de radicales de oxígeno en la piel, tal como radiación UV, agentes químicos (incluyendo otros agentes tópicos tales como compuestos médicos, farmacéuticos o cosméticos) o antes de la radioterapia o quimioterapia.

Más particularmente, la enfermedad o el estado cutáneo resulta de la exposición a la luz solar, más específicamente a la radiación UV de tipo UVA, UVB y UVC. Estados que son directa o indirectamente una consecuencia de (o bien se exacerban por, o bien incluyen como un factor de riesgo) la exposición a tal radiación incluyen efectos tanto

directos como inmediatos, así como efectos a más largo plazo, y complicaciones y secuelas que surgen del daño directo, a lo largo de un plazo más largo.

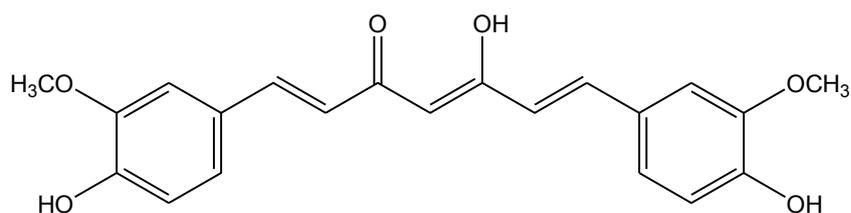
Se cree que la radiación UV incide sobre la piel a través de un mecanismo tanto directo como indirecto. El daño directo es el que se produce tras la exposición inmediata a la radiación, mientras que los efectos indirectos incluyen los que siguen a la generación de moléculas biológicas dañadas y la generación de especies de oxígeno sumamente reactivas que entonces activan otros procesos patológicos y biológicos. Las especies reactivas de oxígeno pueden tener efectos perjudiciales en la ubicación inmediata en la que se generan, como en la piel, o en sitios distantes, en los que tales especies reactivas pueden tener efectos sistémicos más amplios, tal como se pone de manifiesto por lo que se denomina "estrés oxidativo". Una intervención que reduce eficazmente el nivel de especies reactivas, teniendo de ese modo un efecto antioxidante, puede ralentizar, mejorar o detener la evolución de una amplia gama de enfermedades.

Los problemas de salud asociados con la exposición a radiación UV implican estados o enfermedades de la piel, pero también pueden surgir estados más extendidos y sistémicos, o ser una parte de complicaciones que siguen como consecuencia de tales estados o enfermedades de la piel. Por consiguiente, tales estados, colectivamente, pueden incluir quemadura solar, fotosensibilidad, inmunosupresión, envejecimiento prematuro, psoriasis, varios tipos de cáncer de piel y diversas enfermedades inmunológicas, así como inflamación localizada o extendida, diversas infecciones bacterianas o fúngicas, erupciones cutáneas y estreses oxidativos sistémicos provocados por la exposición a la radiación UV y la dieta. La queratosis actínica, por ejemplo, es una lesión precancerosa desarrollada tras muchos años de exposición solar. La erupción solar polimorfa, por ejemplo, es una erupción inducida por la exposición a la luz solar, que se entiende que está implicada en alergia localizada en la piel. Los tipos de cáncer de piel vinculados a la exposición a la luz solar incluyen, en orden de gravedad creciente, cáncer de células basales, cáncer de células escamosas y melanoma maligno.

En otra realización particular, la enfermedad o el estado cutáneo que induce la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto se selecciona de heridas traumáticas y quirúrgicas agudas, quemaduras, escaldaduras, fístulas, úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras de etiología mixta, y otras lesiones y trastornos inflamatorios y heridas crónicas o necróticas.

En una realización particular de la presente invención, la composición antioxidante de la invención comprende además curcumina como principio activo adicional. Se ha encontrado que la combinación de galactomanano con N-acetil-cisteína y curcumina proporciona un efecto antioxidante sinérgico incluso mayor tal como muestran los ejemplos proporcionados en la presente solicitud.

La curcumina, también conocida como cúrcuma, es un derivado de o-metoxifenol que se produce de manera natural de fórmula:



Es un pigmento amarillo obtenido de los rizomas de *Curcuma Longa* y se ha usado durante siglos en la medicina tradicional para el tratamiento de una variedad de estados inflamatorios. La curcumina también actúa como eliminador de radicales libres y antioxidante, inhibiendo la peroxidación de lípidos y el daño oxidativo al ADN.

La curcumina está presente preferiblemente en la composición de la invención en una concentración que oscila entre 1 y aproximadamente 7,5 μM , más preferiblemente entre 1 y 5 μM .

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición antioxidante que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y curcumina.

Dicha composición antioxidante es también adecuada para aplicación tópica sobre la piel y puede tomar cualquiera de una amplia variedad de formas, incluyendo, por ejemplo apósitos, lociones, disoluciones, pulverizaciones, cremas, geles, , tal como las mencionadas anteriormente.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a la composición antioxidante que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y curcumina para su uso como medicamento.

5 Esta composición antioxidante puede usarse también para tratar o prevenir una enfermedad o un estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto o una enfermedad o un estado cutáneo que implica la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto, tal como los mencionados anteriormente.

En otra realización particular, la presente invención se refiere a un hidrogel que comprende galactomanano y N-acetil-cisteína, en el que el galactomanano está en forma de una matriz reticulada y se incorpora N-acetil-cisteína en dicha matriz reticulada de galactomanano.

10 El término "hidrogel" se refiere a una red de cadenas poliméricas que comprende cadenas de galactomanano reticuladas que son insolubles en agua pero hinchables en agua, es decir, el agua es el medio de dispersión.

15 El hidrogel de la invención proporciona un medio fiable y eficaz para administrar N-acetil-cisteína al sitio de interés, tal como a una herida, úlcera, quemadura o escaldadura, mientras se mejoran las propiedades antioxidantes y de cicatrización de este principio activo. De hecho, las pruebas experimentales han mostrado el efecto antioxidante sinérgico inducido por la combinación de un galactomanano, tal como goma de algarrobo, y N-acetil-cisteína sobre cultivos celulares de fibroblastos, mejorando la capacidad de supervivencia celular mientras se reducen los niveles intracelulares de metabolitos reactivos de oxígeno. El hidrogel también proporciona una muy buena capacidad de regulación de la humedad para promover la cicatrización de heridas.

20 El hidrogel de la invención comprende cadenas polimerizadas de galactomanano, dichas cadenas de galactomanano están reticuladas con el fin de preparar galactomanano insoluble en agua pero hinchable en agua. El grado de reticulación determina las propiedades reológicas del hidrogel, así como sus propiedades hinchables, y permite obtener una porosidad que favorece la administración controlada de N-acetil-cisteína.

25 Particularmente, el galactomanano se selecciona del grupo que consiste en goma guar, goma de algarrobo, goma de *Cassia*, goma tara, goma de mezquite, goma de alholva y goma de semilla de trébol blanco. Más preferiblemente, el galactomanano es goma de algarrobo.

En una realización particular, el galactomanano se reticula por medio de un agente de reticulación. Pueden usarse agentes químicos tales como bórax (borohidrato de sodio), glutaraldehído y derivados epoxídicos. Particularmente, el agente de reticulación más preferido es glutaraldehído.

30 El contenido en agente de reticulación determina el tamaño de poro de la matriz y por tanto el perfil de administración del principio activo incorporado en la misma.

El galactomanano puede estar presente en el hidrogel según la invención en una cantidad de al menos el 50% en peso con respecto al peso total del hidrogel, preferiblemente al menos el 75% en peso. Más preferiblemente, al menos el 90% en peso del hidrogel consiste en galactomanano.

35 El resto del hidrogel comprende agua (hasta el 20% en peso), el principio activo (N-acetil-cisteína) y, opcionalmente, sales u otros compuestos estructurales que mejoran las propiedades reológicas del hidrogel.

Entre los compuestos estructurales que pueden estar presentes opcionalmente en el hidrogel, se prefieren proteínas tales como colágeno, fibronectina, laminina, elastina o combinaciones de los mismos, así como glicosaminoglicanos, tales como hialuronatos, sulfato de heparina o sulfato de condroitina.

40 Preferiblemente, el hidrogel según la presente invención absorberá agua o fluido de la herida y por tanto se humedecerá, hinchará o se convertirá en una masa gelatinosa pero no se disolverá ni se dispersará espontáneamente en la misma. La baja solubilidad hace que tales materiales sean especialmente adecuados para su uso como apósitos para heridas para eliminar especies reactivas de oxígeno del fluido de la herida.

45 Puede incorporarse directamente N-acetil-cisteína en la matriz de galactomanano reticulada. Este principio activo puede incorporarse mediante la absorción del agente por la matriz o añadiendo el agente en la formulación inicial para la matriz antes de la reticulación.

En una realización preferida de la invención, la incorporación de N-acetil-cisteína en la matriz de galactomanano se lleva a cabo mediante la formación de un xerogel.

5 El término "xerogel" se refiere a un sustrato sólido formado a partir de un hidrogel mediante secado con contracción libre. Retiene una alta porosidad (al menos el 25%) y una enorme área de superficie (150-900 m²/g) junto con un tamaño de poro muy pequeño (1-10 nm).

El xerogel obtenido se introduce en una disolución acuosa que comprende N-acetil-cisteína y entonces este principio activo se incorpora gradualmente en el poro de la matriz o se dispersa en la misma hasta que se alcanza el equilibrio.

10 La N-acetil-cisteína está presente preferiblemente en el hidrogel en una concentración que oscila entre 1 y 10 mM, más preferiblemente entre 1 y 5 mM.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al hidrogel de la invención mencionado anteriormente que comprende además curcumina como un principio activo adicional que va a incorporarse en la matriz de galactomanano. Se ha encontrado que la combinación de un galactomanano, tal como goma de algarrobo, con N-acetil-cisteína y curcumina proporciona un efecto antioxidante sinérgico incluso mayor.

15 Como en el caso de la N-acetil-cisteína, puede incorporarse también curcumina en la matriz de galactomanano mediante la absorción de este compuesto por la matriz o añadiéndolo en la formulación inicial para la matriz junto con la N-acetil-cisteína antes de reticular el galactomanano.

20 Sin embargo, también se prefiere incorporar curcumina y N-acetil-cisteína introduciendo un xerogel de galactomanano en una disolución que comprende ambos principios activos, permitiendo así la incorporación gradual de los mismos en la matriz de galactomanano.

La curcumina está presente preferiblemente en el hidrogel en una concentración que oscila entre aproximadamente 1 y aproximadamente 7,5 µM, más preferiblemente entre 1 y 5 µM.

25 Debe entenderse que los principios activos se incorporan en el hidrogel, de modo que los agentes se liberan directamente del hidrogel y se administran además por medio de las vías transdérmica o transmucosa. Los agentes incorporados pueden liberarse a lo largo de un periodo de tiempo prolongado con el fin de facilitar la cicatrización de heridas.

30 En una realización particular, una vez que el/los principio(s) activo(s) se incorporan y dispersan por toda la matriz de glucomanano, una parte del agente reside en la matriz mientras que la otra parte del agente se disuelve en la fase líquida libre y se mueve libremente a través de la matriz. Debido a que el agente se disuelve en la fase líquida libre, se crea un gradiente de concentración del agente activo entre la matriz del hidrogel y la humedad de la propia herida. Por tanto, cuando el hidrogel se coloca sobre una superficie húmeda tal como una herida abierta, el agente soluble se moverá a través de la fase líquida libre hacia la humedad de la herida libre de agente, dando como resultado la administración del agente a la herida. Este movimiento de agente soluble altera además el equilibrio entre agentes solubles e insolubles, y provoca que se disuelva más agente en la fase líquida libre, provocando así
35 que se administre más agente a la herida.

40 La administración de los principios activos también puede controlarse mediante el grado de reticulación en la matriz. La combinación de cadenas reticuladas entre sí crea microcavidades en las que los principios activos están encapsulados. Controlando la cantidad de agente de reticulación y la longitud de las cadenas de galactomanano, es posible regular el tamaño de las microcavidades de la matriz de galactomanano. Se producen microcavidades más grandes mediante un grado de reticulación inferior, que permiten una migración más libre y una administración más rápida de los agentes activos, mientras que microcavidades más pequeñas aumentan el tiempo de administración.

El procedimiento para la preparación del hidrogel de la invención comprende:

- a) disolver el galactomanano en una disolución acuosa;
- 45 b) someter el galactomanano a una reticulación química añadiendo un agente de reticulación a la disolución acuosa de galactomanano para obtener un hidrogel que comprende una matriz de glucomanano reticulada;
- c) incorporar N-acetil-cisteína, y opcionalmente la curcumina, en la matriz de glucomanano reticulada.

Preferiblemente, el galactomanano se disuelve en agua destilada a temperatura ambiente en una cantidad que oscila entre el 1% y el 5% en peso con respecto al peso total de la disolución. Esta disolución se mantiene con agitación durante aproximadamente 2-3 horas. Dependiendo del galactomanano, puede requerirse aumentar la temperatura con el fin de facilitar la disolución del mismo.

- 5 En una realización particular, el galactomanano es goma de algarrobo. En este caso, la disolución debe realizarse a una temperatura entre 110 y 120°C.

- 10 La etapa de reticulación se lleva a cabo con el objetivo de formar una estructura de matriz tridimensional, dotándola de poros o cavidades en los que se incorporará el principio activo. Los métodos de reticulación incluyen reticulación inducida por UV y reticulación química. Pueden usarse agentes químicos tales como bórax (borohidrato de sodio), glutaraldehído, derivados epoxídicos y otros métodos conocidos en la técnica. Los métodos de reticulación por UV requieren un fotoiniciador que inicia el proceso de gelificación o reticulación tras la exposición de radiación UV.

El grado de reticulación depende de la cantidad de agente de reticulación añadida a la disolución y oscila entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 5% en peso con respecto al peso total de la disolución acuosa. Preferiblemente, el agente de reticulación es glutaraldehído.

- 15 En una realización particular, la disolución de galactomanano y el agente de reticulación se mantienen con agitación durante al menos 30 minutos. Posteriormente, la disolución se vierte en moldes, manteniéndose en los mismos hasta la formación del hidrogel. El agente de reticulación que no reacciona se elimina mediante varios lavados.

- 20 La incorporación de la N-acetil-cisteína, y curcumina cuando este principio activo está presente en la formulación del hidrogel, puede realizarse mediante la absorción del agente por la matriz. Alternativamente, el/los principio(s) activo(s) pueden añadirse a la disolución acuosa de galactomanano antes de la reticulación de la misma.

En un aspecto de la invención, la incorporación del/de los principio(o) activo(s) comprende las siguientes etapas:

- 1) secar el hidrogel obtenido en la etapa b) para formar un xerogel;
- 2) rehidratar el xerogel introduciéndolo en una disolución acuosa que comprende N-acetil-cisteína, y opcionalmente curcumina, para formar un hidrogel en el que se incorporan N-acetil-cisteína, y opcionalmente curcumina, en la matriz de glucomanano reticulada.
- 3) secar parcialmente el hidrogel obtenido en la etapa 2).

- 30 Puede obtenerse un xerogel seco o matriz de película a partir de un hidrogel mediante un método de secado por congelación o secado por convección según procesos conocidos por un experto en la técnica. En una realización preferida, el xerogel seco se forma a partir del hidrogel mediante un proceso de secado evaporativo, preferiblemente secado al aire, secado a vacío o secado por convección.

Posteriormente, el xerogel se rehidrata para formar un hidrogel que logra una cinética de liberación apropiada y, al mismo tiempo, se incorpora una alta concentración de principio(o) activo(s) en el lado de liberación de la matriz de galactomanano.

Finalmente, el hidrogel se seca parcialmente para su posterior aplicación al sitio de interés.

- 35 En una realización particular de la invención, el hidrogel comprende además células incorporadas en la matriz de galactomanano o en la superficie de la misma. La incorporación de células potencia la actividad regenerativa del hidrogel y el proceso de reparación tisular en aquellos tejidos sumamente dañados o sin la posibilidad de contribución celular *in situ* del paciente, puesto que este biomaterial contiene células sanas del mismo tipo que las presentes en el tejido dañado.

- 40 Preferiblemente, las células incorporadas en el hidrogel se seleccionan del grupo que consiste en fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células madre mesenquimales diferenciadas o no diferenciadas, células corneales, células epiteliales, células del sistema leucocitario, células del sistema hematopoyético, células madre diferenciadas o no diferenciadas, células condrogénicas, osteoblastos, miocitos, adipocitos y neuronas u otras células del sistema nervioso periférico y central.

5 En una realización particular de la invención, el hidrogel se incorpora en un apósito para heridas. Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a un apósito para heridas que comprende el hidrogel de la invención. El apósito para heridas tiene preferiblemente forma de lámina y comprende una capa activa del hidrogel según la invención. La capa activa sería normalmente la capa de contacto con la herida en uso, pero en algunas realizaciones podría estar separada de la herida mediante una lámina superior permeable a líquidos.

10 El apósito para heridas puede incluir otros componentes. Por ejemplo, con el fin de aumentar la permeabilidad del material de apósito para heridas, pueden añadirse agentes de control de la pérdida de agua. Una disminución en la permeabilidad del material de apósito para heridas controla la pérdida de fluidos a partir de la herida. Agentes de control de la pérdida de agua preferidos son glicolípidos, ceramidas, ácidos grasos libres, colesterol, triglicéridos, estearil ésteres y aceite de silicona.

Si se desea, puede añadirse también un plastificante al apósito para heridas. Los plastificantes actualmente preferidos son glicerol y agua, sin embargo, también pueden usarse propilenglicol y butanol.

15 Si se desea, puede añadirse también un agente de control de la hidratación al material de apósito para heridas. El agente de control de la hidratación preferido es alcohol isopropílico, sin embargo, también pueden usarse etanol, glicerol, butanol y propilenglicol.

20 Preferiblemente, el apósito para heridas comprende además una lámina de soporte que se extiende sobre la capa activa opuesta al lado que se orienta hacia la herida de la capa activa. Preferiblemente, la lámina de soporte es mayor que la capa activa de manera que una región marginal se extiende alrededor de capa activa para formar un denominado apósito de isla. En tales casos, la lámina de soporte está recubierta preferiblemente con un adhesivo de calidad médica sensible a la presión en al menos su región marginal.

Preferiblemente, la lámina de soporte es permeable al vapor de agua, pero no es permeable a agua líquida o exudado de la herida. Preferiblemente, la lámina de soporte es también impermeable a microorganismos. Esto permite que la herida bajo el material para apósito cicatrice en estados húmedos sin provocar que la piel que rodea a la herida se macere.

25 Los polímeros adecuados para formar la lámina de soporte incluyen poliuretanos y poli(acrilatos y metacrilatos de alcoxiálquilo) tales como los dados a conocer en el documento GB-A-1280631.

30 La capa adhesiva (cuando está presente) debe ser transmisora de vapor de humedad y/o estar diseñada para permitir el paso de vapor de agua a través de la misma. La capa adhesiva es preferiblemente una capa adhesiva sensible a la presión transmisora de vapor de humedad continua del tipo convencionalmente usado para apósitos para heridas de tipo isla, por ejemplo, un adhesivo sensible a la presión basado en copolímeros de éster de acrilato, polivinil etil éter y poliuretano tal como se describe por ejemplo en el documento GB-A-1280631.

35 La superficie del apósito que se orienta hacia la herida está protegida preferiblemente por una lámina de cubierta separable. La lámina de cubierta está formada normalmente por material termoplástico flexible. Los materiales adecuados incluyen poliésteres y poliolefinas. Preferiblemente, la superficie que se orienta hacia el adhesivo de la lámina de cubierta es una superficie de liberación. Es decir, una superficie que es sólo débilmente adherente a la capa activa y el adhesivo sobre la lámina de soporte, para ayudar a despegar la capa adhesiva de la lámina de cubierta. Por ejemplo, la lámina de cubierta puede estar formada por un plástico no adherente tal como un fluoropolímero, o puede estar dotada de un recubrimiento de liberación tal como un recubrimiento de liberación de fluoropolímero o silicona.

40 Normalmente, el apósito para heridas según la invención es estéril y está envasado en un recipiente impermeable a los microorganismos.

45 Por tanto, el hidrogel de la presente invención puede usarse sobre tejido lesionado y para drenajes de fluidos corporales en los que se desea el control y la gestión del fluido y las secreciones. La expresión "fluido corporal" incluye, pero no se limita a, saliva, secreciones gingivales, líquido cefalorraquídeo, líquido gastrointestinal, moco, secreciones urogenitales, líquido sinovial, sangre, suero, plasma, orina, líquido quístico, líquido linfático, ascitis, efusión pleural, líquido intersticial, líquido intracelular, líquidos oculares, líquido seminal, secreciones mamarias, humor vítreo y secreciones nasales.

En particular, el hidrogel puede aplicarse preferiblemente para su uso en heridas crónicas y agudas con exudación para controlar la humedad del exudado que se acumula, soportar el lecho de la herida y los tejidos circundantes.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el hidrogel según la presente invención para su uso en el tratamiento y/o la cicatrización de una enfermedad cutánea que se selecciona entre heridas traumáticas y quirúrgicas agudas, quemaduras, escaldaduras, fístulas, úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras de etiología mixta, y otras lesiones y trastornos inflamatorios y heridas crónicas o necróticas.

El hidrogel de la presente invención está destinado al tratamiento de heridas tanto infectadas como no infectadas (que es lo mismo que heridas que no muestran signos clínicos de infección). Preferiblemente, la herida es una herida crónica o necrótica. Más preferiblemente, la herida crónica se selecciona del grupo que consiste en úlceras de etiología venosa, arterial mixta, úlceras de decúbito o úlceras diabéticas. Preferiblemente, el hidrogel se usa como antioxidante para reducir el estrés oxidativo en el entorno de la herida y de ese modo promover la cicatrización de heridas.

En uso, el hidrogel, o el apósito para heridas que lo contiene, se coloca en contacto directo con el lecho de la herida. Si se requiere, puede sujetarse en la posición con el apósito para heridas tal como el descrito anteriormente. Si es necesario, el apósito para heridas y el hidrogel se retiran, mediante lo cual cualquier exudado y tejido necrótico acumulado se elimina. El hidrogel puede sustituirse por un hidrogel nuevo y otro apósito para heridas adecuado.

El hidrogel puede experimentar una acción de hinchamiento a medida que absorbe humedad del exudado, sin embargo, no se disolverá. La acción de hinchamiento desplaza el material necrótico de la superficie de la herida y fuerza al material al interior de la matriz del hidrogel. El contenido en humedad cargado y la retención de la humedad cerca del lecho de la herida por el hidrogel contribuyen a la estimulación del proceso de desbridamiento autolítico mediante el cual las propias enzimas del organismo rompen el tejido necrótico y los residuos celulares.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína, y curcumina.

La composición cosmética incluye cualquier composición líquida o cualquier composición que comprende la combinación de galactomanano, N-acetil-cisteína y curcumina y que está en forma de gel, crema, pomada o bálsamo para su administración tópica. Dichas composiciones se caracterizan porque tienen propiedades emolientes, protectoras y cicatrizantes incluso cuando no tienen ninguna molécula cosméticamente activa asociada.

En una variante de la invención, la composición cosmética puede incorporar también moléculas activas que, aunque no tienen ningún efecto terapéutico, tienen propiedades como agente cosmético. Entre las moléculas activas que pueden incorporarse en la composición antioxidante pueden mencionarse agentes emolientes, conservantes, sustancias de fragancia, agentes antiacné, agentes antifúngicos, antioxidantes, desodorantes, antiperspirantes, agentes anticapsa, despigmentantes, agentes antiseborreicos, colorantes, lociones de bronceado, absorbentes de luz UV, enzimas, sustancias de fragancia, entre otros.

La composición cosmética puede comprender además agentes de control del pH, tales como, por ejemplo, agentes tamponantes, que evitan que el pH de la composición se reduzca hasta valores por debajo de 5, así como conservantes que evitan cambios estructurales importantes en la composición. Un experto en la técnica puede determinar componentes adicionales que pueden usarse y si son necesarios, siendo muchos de ellos de uso común en composiciones cosméticas.

La composición cosmética de la invención que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y opcionalmente curcumina puede usarse para un daño de la piel relacionado con la edad.

El daño de la piel relacionado con la edad se refiere a cualquier estado o trastorno de la piel asociado con, provocado por, o afectado por, envejecimiento intrínseco y/o envejecimiento extrínseco que a menudo se atribuyen al daño provocado por radicales libres de oxígeno. Los radicales libres de oxígeno pueden dañar células y se cree que aceleran las enfermedades relacionadas con la edad. El daño de la piel relacionado con la edad puede estar provocado también por años de daño solar, mala nutrición, altos niveles de estrés, exposición a la contaminación medioambiental y ciertas elecciones del estilo de vida, tal como fumar y consumir drogas y alcohol.

Por ejemplo, el estado de la piel relacionado con el envejecimiento puede implicar arrugas, manchas por envejecimiento, daño solar (particularmente estrés oxidativo inducido por radiación UV), defectos, piel hiperpigmentada, aumento del grosor de la piel, pérdida de elasticidad de la piel y del contenido en colágeno y/o piel seca.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición cosmética que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y opcionalmente curcumina para su uso en la protección frente a la radiación UV.

Ejemplos

Ejemplo 1. Estimación de las concentraciones límite de NAC y cúrcuma

- 5 N-acetil-cisteína (NAC), goma de algarrobo (LBG) y curcumina (cúrcuma o Cur) fueron suministrados por Sigma.
- Se establecieron las concentraciones límite en el uso de NAC y cúrcuma tras ensayos de proliferación y citotoxicidad *in vitro* en fibroblastos humanos dentro de un intervalo de desde 0,5 mM hasta 20 mM para NAC y desde 0,5 μ M hasta 50 μ M para cúrcuma.
- 10 Se llevó a cabo el ensayo de proliferación usando el ensayo colorimétrico de MTT (Roche 11465007001). MTT es una sal de tetrazolio amarilla que forma cristales de formazán en células activas. Los cristales de formazán se solubilizan y el color resultante se cuantifica por medio de espectrofotometría a 550 nm.
- Se sembraron fibroblastos en una placa de 96 pocillos a una densidad de 4000 células por pocillo. Se mantuvieron las células a 37°C en una estufa de incubación. Al siguiente día, se añadieron los tratamientos de NAC y cúrcuma al cultivo celular usando un volumen de 200 μ l por pocillo. Se dejó incubar el cultivo celular durante 24, 48 y 72 horas.
- 15 Tras cada tiempo de incubación, se añadieron 20 μ l de MTT (una concentración final de 0,5 mg/ml) a cada pocillo. Se mantuvo la placa durante 4 horas en la estufa de incubación con el fin de permitir la formación de cristales de formazán. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de solubilizante a cada pocillo y se dejó la placa en la estufa de incubación hasta el siguiente día. Entonces, se midieron los datos de absorbancia a 550 nm.
- 20 Las figuras 1a y 2a muestran los resultados de los ensayos de proliferación y citotoxicidad por medio del ensayo colorimétrico de MTT, usando diferentes concentraciones de NAC y cúrcuma.
- Se estableció la CI_{50} de cada componente, es decir, la concentración que provoca una disminución de células del 50% con respecto al control, como límite de toxicidad (figuras 1b y 2b).
- Para el caso de NAC, ninguna de las concentraciones estudiadas alcanzó la CI_{50} a las 72 horas, aunque concentraciones de 10 y 20 mM redujeron progresivamente la proliferación celular con respecto al control. El límite máximo de concentración de NAC podía establecerse a 10 mM. Basándose en los resultados obtenidos en los experimentos, se seleccionaron concentraciones de 1 y 5 mM de NAC puesto que dieron como resultado una mejora de la tasa de proliferación de los fibroblastos.
- 25 En el caso del estudio del límite máximo de concentración de cúrcuma, se observó cómo las concentraciones de 20 y 50 μ M tuvieron toxicidad desde las primeras 24 horas, superando el límite de CI_{50} . La concentración de 10 μ M supera el límite a las 72 horas y la concentración de 7,5 μ M alcanza la CI_{50} a las 72 horas. Por tanto, puede establecerse la concentración de 7,5 μ M como el límite máximo de uso de cúrcuma en la mezcla.
- 30 Se seleccionaron concentraciones de 1 y 5 μ M de cúrcuma para los experimentos puesto que no se observaron efectos tóxicos.

Ejemplo 2. Efecto de los componentes de la composición de la invención y la combinación de los mismos sobre la viabilidad de fibroblastos humanos

- El objetivo del ensayo es determinar el efecto provocado por LBG, NAC, cúrcuma y combinaciones de los mismos sobre la capacidad de supervivencia de las células en un entorno adverso, tal como el que hay en el lecho de una herida.
- 40 Para este fin, se sometieron fibroblastos a un entorno oxidativo usando peróxido de hidrógeno durante 1 hora y se pusieron en contacto con LBG, NAC, cúrcuma y combinaciones de los mismos. Se analizó la viabilidad celular de los fibroblastos en cultivo por medio del ensayo colorimétrico de MTT tal como se definió anteriormente.

Siembra de células para el ensayo

El día antes del ensayo, se sembraron los fibroblastos en una placa de 96 pocillos a una densidad de 11500 células por pocillo. Se realizaron todos los ensayos por triplicado.

Ensayo

5 Se prepararon los tratamientos en el día del experimento y se añadió el peróxido de hidrógeno justo antes del ensayo.

Preparación de la goma de algarrobo al 1% en medio de crecimiento celular normal

10 Se preparó una disolución de goma de algarrobo del 1% en agua destilada y se calentó a más de 100°C hasta que se completó la disolución de la goma. Entonces se centrifugó la disolución durante 20 minutos a 4000 rpm para eliminar las impurezas de la mezcla. Se liofilizó la disolución de la goma de algarrobo. Se disolvió el liofilizado en medio de crecimiento celular (DMEM+10% de FBS) a una concentración del 1%.

Preparación de los tratamientos de NAC y curcumina y de peróxido de hidrógeno

Se prepararon los tratamientos de NAC y curcumina y el peróxido de hidrógeno justo antes de comenzar el ensayo. Para preparar la disolución madre de cúrcuma, es necesario conocer la pureza del lote de cúrcuma disponible y volver a ajustar el cálculo para añadir la concentración necesaria.

15 Se añadieron los tratamientos y el peróxido de hidrógeno a la vez y se dejaron incubar durante 1 hora.

Tras la incubación, se eliminaron los tratamientos de las células y se añadieron medio de crecimiento normal y 10% de MTT. Se añadió el solubilizante a las 4 horas.

Entonces, se midieron los datos de absorbancia a 550 nm.

20 Para estudiar el efecto sinérgico o aditivo de la combinación de los componentes, se analizaron los resultados por medio de la aplicación de las fórmulas diseñadas específicamente para estudiar estos parámetros:

A. Fórmula adaptada del factor de modificación de la dosis (FMD), denominado factor de combinación (FC).

La fórmula original analiza el factor de modificación de la dosis tomando como datos el porcentaje de inhibición celular producido por dos fármacos administrados solos y en combinación (Thrall BD *et al.* Differential sensitivities of murine melanocytes and melanoma cells to buthionine sulfoximine and anticancer drugs. Cell. Res. 1991; 4: 237-9).

25 Dicha fórmula se ha usado y publicado en artículos internacionales posteriores de nuestro grupo de investigación.

La fórmula presentada en el presente documento está adaptada a partir de la indicada anteriormente, tomando como referencia el aumento en el porcentaje de células supervivientes con respecto al control oxidado, y es tal como sigue:

$$FC = \frac{\% \text{ de protección de LBG + NAC}}{(\% \text{ de protección de LBG}) + (\% \text{ de protección de NAC})}$$

30

$$\% \text{ de protección} = \left\{ \frac{\text{Valor tratado}}{\text{Valor control oxidado}} \times 100 \right\} - 100$$

B. Fórmula original denominada índice combinado (IC)

La fórmula presentada en el presente documento es una fórmula original de uno de los autores de la patente (T. Palomares) que analiza el porcentaje de células supervivientes en presencia de un agente, solo o en combinación con otros, con respecto al número de células originales restando el número de células supervivientes del control

oxidado. Por tanto, se analiza el aumento en el número de células supervivientes con respecto a las células que no se tratan y exponen al oxidante. La fórmula es tal como sigue:

$$IC = \frac{(\% Cs LBG + NAC) - (\% Cs Cox)}{(\% Cs LBG - \% Cs Cox) + (\% Cs NAC - \% Cs Cox)}$$

Cox: control oxidado

5 Cs: células supervivientes con respecto al control inicial sin oxidación

En ambas fórmulas, un valor > 1 indica un efecto sinérgico (con mayor significación cuanto mayor es dicho valor) y < 1 indica un efecto aditivo con un valor mayor cuanto más próximo a 1 es.

Una vez que se han realizado las verificaciones numéricas apropiadas, se obtienen resultados idénticos con ambas fórmulas.

10 Los resultados correspondientes al análisis de los experimentos en los que se sometieron las células a un entorno oxidativo (1 mM H₂O₂) y se trataron con LBG al 1%, NAC 1 mM, cúrcuma 1 mM y combinaciones de los mismos se muestran en la figura 3. Se obtuvieron los datos experimentales 1 hora tras la oxidación. Estos datos indican que la combinación triple LBG+NAC+Cur produce el mejor efecto de protección, alcanzado los niveles de control. La combinación de LBG+NAC aumenta también la viabilidad celular con respecto al control oxidado y con respecto a los tratamientos con LBG, NAC, Cur, LBG+Cur y NAC+Cur.

La tabla I muestra el porcentaje de viabilidad de las células sometidas a estrés oxidativo con respecto al grupo control no oxidado.

Oxidación H ₂ O ₂ 1 mM		
TRATAMIENTOS	Absorb.	% de viabilidad
Control	0,18	100
Control con oxidación	0,09	48,8
LBG al 1%	0,1	56,59
1 mM NAC	0,1	57,14
1%LBG + 1 mM NAC	0,14	77,77
1 μm Cúrcuma	0,12	63,18
1 mM NAC + 1 μm Cúrcuma	0,12	64,28
1%LBG + 1 mM NAC + 1 μm cúrcuma	0,2	100

20 La tabla II muestra los índices obtenidos por medio de la aplicación de las fórmulas A y B en la que se concluye que existe es un efecto sinérgico en las combinaciones de LBG + NAC y la combinación triple de LBG + NAC + cúrcuma.

Tratamiento	Valor	Efecto
1%LBG + 1 mM NAC	1,69	Sinérgico
1%LBG + 1 μM Cur	0,75	Aditivo
1 mM NAC + 1 μM Cur	0,67	Aditivo
1% LBG + 1 mM NAC + 1 μM Cur	1,85	Sinérgico

25 Los resultados han señalado que las combinaciones de LBG, o bien con NAC o bien con NAC + Cur, producen un efecto sinérgico en el aumento de viabilidad celular en una situación de estrés oxidativo. Sin embargo, la combinación de LBG + Cur y NAC + Cur produce el efecto aditivo esperado.

El análisis de los efectos de protección más pronunciados muestra que la combinación de los tres agentes da como resultado el mayor efecto protector (100% de células supervivientes). La combinación de los tres agentes muestra un efecto que es 1,3 veces mayor que el tratamiento con LBG + NAC (77.77%).

5 Ejemplo 3. Efecto de los componentes de la composición de la invención, solos o en combinación, sobre la disminución de los metabolitos reactivos de oxígeno generados en los fibroblastos humanos sometidos a un entorno oxidativo

10 El aumento de metabolitos reactivos de oxígeno (MRO) es una de las principales causas que dificultan la cicatrización de una herida. Este efecto contribuye a la pérdida de capacidad proliferativa de las células y del aumento en la expresión de metaloproteasas, lo que degrada la nueva matriz dérmica formada e impide la cicatrización.

Para cuantificar la capacidad antioxidante o de disminución de MRO de LBG, NAC y cúrcuma, se midió la producción de los MRO generados con la oxidación de un cultivo de fibroblastos con una alta concentración de peróxido de hidrógeno.

15 Se cuantificaron los MRO intracelulares por medio del marcaje de los mismos con la sonda fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (Molecular Probes D399). Esta sonda puede emitir fluorescencia a 538 nm cuando se oxida con metabolitos reactivos de oxígeno. Se llevó a cabo la oxidación celular con peróxido de hidrógeno 1 mM.

Siembra de células para el ensayo

El día antes del ensayo, se sembraron los fibroblastos en una placa de 96 pocillos a una densidad de 11500 células por pocillo. Se realizaron todos los ensayos por triplicado.

20 Ensayo

Se prepararon los tratamientos el día del experimento y se añadió el peróxido de hidrógeno justo antes del ensayo.

Preparación de la goma de algarrobo al 1% en medio de crecimiento celular normal

Se preparó una disolución de goma de algarrobo del 1% en agua destilada y se calentó a más de 100°C hasta que se completó la disolución de la goma.

25 Entonces se centrifugó la disolución durante 20 minutos a 4000 rpm para eliminar las impurezas de la mezcla. Se liofilizó la disolución de la goma de algarrobo. Se disolvió el liofilizado en medio de crecimiento celular (DMEM+10% de FBS) a una concentración del 1%.

Marcaje de las células con la sonda fluorescente

30 Antes de añadir los tratamientos y el peróxido de hidrógeno, se marcaron las células con la sonda fluorescente a una concentración de 50 µM durante 30 minutos en la oscuridad.

Preparación de los tratamientos con NAC y cúrcuma y de peróxido de hidrógeno

Se prepararon los tratamientos con NAC y cúrcuma y el peróxido de hidrógeno justo antes de comenzar el ensayo. Para preparar la disolución madre de cúrcuma, es necesario conocer la pureza del lote de cúrcuma disponible y reajustar el cálculo para añadir la concentración necesaria.

35 Tras marcar las células, se añadieron los tratamientos antioxidantes y el peróxido de hidrógeno.

Se recogió la fluorescencia emitida a 538 nm por la sonda 20 minutos tras el comienzo de la oxidación.

40 La figura 4 muestra los niveles de MRO intracelulares de los fibroblastos sometidos a un entorno oxidativo usando 1 mM de H₂O₂, por medio de las unidades de fluorescencia obtenidas en el marcaje con la sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína y también cuando se ponen en contacto los fibroblastos con LBG al 1%, NAC 5 mM, cúrcuma 5 µM y combinaciones de los mismos.

La tabla III muestra los datos del porcentaje de disminución de los MRO con respecto al control oxidado, cuando se sometieron las células a 1 mM de peróxido de hidrógeno y en contacto con los componentes de la composición de la invención.

	H ₂ O ₂ 1 mM	
	U.F.	% de disminución de ERO
CONTROL	0,157	
CONTROL OXIDADO	12,47	
LBG	1,74	86
NAC	1,82	85
Cur	2,31	81
NAC+Cur	0,97	92
LBG+Cur	1	91
LBG+NAC	0,307	97
LBG+NAC+Cur	0,157	99

- 5 Tal como puede observarse, existe una disminución significativa de los niveles de MRO intracelulares en las células que están en contacto con LBG, NAC, cúrcuma y combinaciones de los mismos.

La adición de NAC a la disolución de LBG provoca una disminución significativa de los niveles de MRO intracelulares con respecto a la LBG sola.

- 10 Sin embargo, la combinación triple LBG + NAC + Cur produce el mayor beneficio en cuanto a la disminución de los niveles de MRO intracelulares, que son similares a los del grupo control (sin oxidación).

Para verificar el efecto sinérgico o aditivo de la combinación de los diferentes componentes, se analizaron los resultados aplicando las fórmulas A y B mencionadas en el ejemplo 2. Sin embargo, en este caso, la disminución en los niveles de MRO intracelulares se tomó como referencia con respecto al control oxidado.

Los resultados se muestran en la tabla IV:

15

Tratamientos	Valor	Efecto
LBG + NAC	3.29	Sinérgico
LBG + Cur	0.65	Aditivo
NAC + Cur	0.68	Aditivo
1% LBG + 1 mM NAC + 1 μM Cur	3.30	Sinérgico

20

La aplicación de las fórmulas A y B muestra claramente un efecto sinérgico producido por las combinaciones LBG+NAC y LBG+NAC+Cur, mientras que las combinaciones LBG+NAC y NAC+Cur producen un efecto aditivo, con respecto a la reducción de ERO intracelular.

Ejemplo 4. Preparación de un hidrogel de goma de algarrobo con N-acetil-cisteína incorporada en el mismo.

5 Se dispersó una cantidad pesada de goma de algarrobo en agua destilada para formar una disolución que contiene el 1-5% en peso de dicha goma. Para favorecer la síntesis del hidrogel, se añadió ácido sulfúrico a la disolución hasta obtener un pH de 2, con el objetivo de protonar los grupos hidroxilo de la goma de algarrobo. Se agitó la disolución a temperatura ambiente durante 2-3 horas y, posteriormente, se elevó la temperatura hasta 100-120°C. A esta temperatura, se agita la disolución durante al menos 30 minutos.

10 Se centrifugó la disolución a 4000 rpm durante 20 minutos con el fin de eliminar las impurezas en la mezcla, por tanto, la disolución de goma de algarrobo pura está en el sobrenadante y las impurezas se depositan en el sedimento.

15 Se sometió la disolución de goma de algarrobo a una etapa de reticulación química usando glutaraldehído como agente de reticulación. Para este fin, se añadió glutaraldehído a la disolución de goma de algarrobo mientras se agita durante al menos 30 minutos. La cantidad de glutaraldehído depende de las características finales deseadas del hidrogel. Si se requiere una administración rápida de la N-acetil-cisteína, se añaden menores cantidades de agente de reticulación a la disolución de goma de algarrobo con el fin de obtener un bajo grado de reticulación. Por el contrario, si se requiere un tiempo de administración aumentado de la N-acetil-cisteína, se añaden grandes cantidades de agente de reticulación a la disolución de goma de algarrobo con el fin de obtener un alto grado de reticulación. Las figuras 5a-5d corresponden a fotografías tomadas del microscopio electrónico de barrido (MEB) que muestran el aumento en el grado de porosidad de un hidrogel de goma de algarrobo al 3% en peso cuando se aumenta la concentración del agente de reticulación desde el 0 hasta el 2,5% en peso.

Se colocó la mezcla de goma de algarrobo y glutaraldehído sobre placas Petri. Se llevó a cabo la reacción de reticulación a 37°C.

25 Una vez que se formó el hidrogel, se lavó con bisulfato de sodio (Sigma 13438) al 5% y luego con agua destilada, con el fin de eliminar el glutaraldehído sin reaccionar. Posteriormente, se secó el hidrogel en un horno a 65°C para formar un xerogel.

30 Con el fin de incorporar la N-acetil-cisteína en la estructura de la goma de algarrobo, se rehidrató el xerogel introduciéndolo en una disolución saturada de N-acetil-cisteína y PBS. Finalmente, se secó parcialmente el hidrogel obtenido para su uso posterior.

Ejemplo 5. Evaluación del efecto de un hidrogel que contiene LBG, LBG + NAC y LBG + NAC + Cur sobre el proceso de cicatrización de heridas en la piel de cerdo.

Se seleccionaron cuatro cerdos macho de 25-35 kg de peso corporal. Antes de comenzar el procedimiento, se sometieron los animales a un periodo de aclimatación de 1 semana.

35 De manera preoperatoria, se sedaron los animales con azaperona por vía intramuscular (4 mg/kg) + ketamina (10 mg/kg) y se intubaron por vía traqueal y se indujo analgesia con buprenorfina intravenosa (0,01 mg/kg). Se indujo anestesia y se mantuvo con propofol (4 mg/kg), isoflurano (al 1,5-2%, oxígeno). Se realizó una terapia con antibióticos quirúrgica con cefalotina intravenosa (22 mg/kg).

40 Se generaron quirúrgicamente cuatro lesiones cutáneas en la zona dorsal de cada cerdo. Se aplicaron tres combinaciones de matrices de biomateriales (LBG, LBG+NAC y LBG+NAC+Cur) en tres de las cuatro lesiones y se aplicó solución salina en la lesión de control. Se sustituyeron los apósitos cada 3 días cuando se limpiaron las heridas y se cambiaron los apósitos.

45 En el periodo posoperatorio, se realizó una evaluación macroscópica de la cicatrización del tejido durante todo el experimento. Se obtuvieron biopsias para la evaluación histológica a los 5, 10 y 15 días tras la generación de las lesiones. Todas las muestras de biopsia de piel se fijaron en formalina tamponada neutra al 10%, se procesaron de manera rutinaria y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el estudio histopatológico. Se realizó la evaluación histopatológica en las zonas tratadas y de control. Se evaluaron parámetros tales como reepitelización de la epidermis, presencia de inflamación dérmica y fase de maduración y formación de tejido de granulación.

Los resultados muestran la evolución más rápida desde los días iniciales, principalmente en las lesiones tratadas con LBG+NAC y LBG+NAC+Cur. Además, el análisis microscópico mostró una mejora en la formación de tejido de granulación y en la maduración de este tejido con respecto a la lesión de control.

5 La figura 6 muestra una vista macroscópica de una biopsia de 10 días de evolución, en la que puede observarse un aumento en la formación de nuevo tejido en los grupos tratados, pero particularmente en el grupo tratado con LBG+NAC+Cur.

Cuando se realizaron cálculos de la superficie de herida en los tres grupos, se mostró una mejora en la capacidad de cierre de heridas en los tres grupos. Sin embargo, este efecto aumentó en el grupo de LBG+NAC y se observó el mayor efecto en el grupo de LBG+NAC+Cur.

10 La tabla V muestra el área de lesión estimada en los diferentes grupos tratados y el índice que indica la capacidad de reducción de heridas presentada por estos grupos. El índice también indica que se logró el mayor efecto mediante el tratamiento con LBG+NAC+Cur.

	Área de lesión (cm ²)	Índice de reducción del área de lesión (con relación al grupo control)
Control	7	1
LBG	5,88	1,2
LBG+NAC	4,62	1,5
LBG+NAC+Cur	3,78	1,85

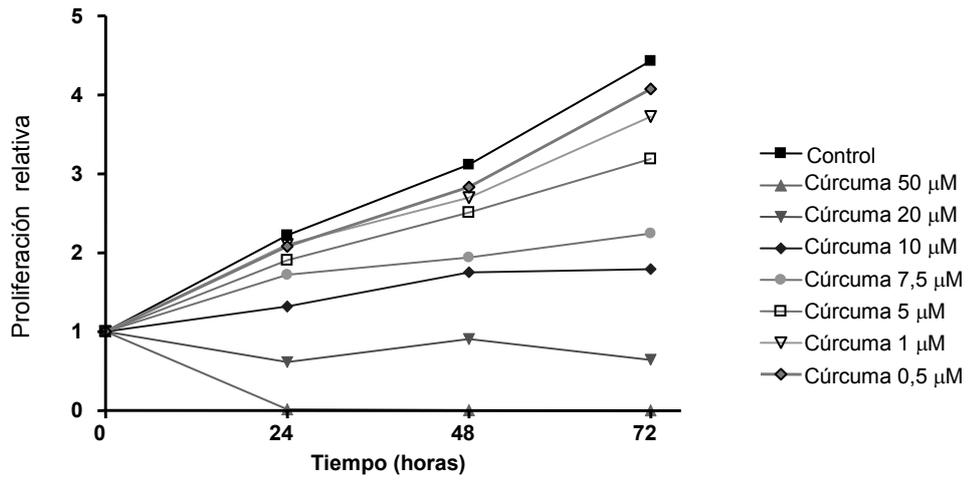
15 La figura 7 muestra una fotografía de la evolución durante tres días en la que se compararon los tratamientos con LBG+NAC y LBG+NAC+Cur con un tratamiento establecido con colágeno. Tal como puede observarse, existe una reducción en la zona de lesión en ambos grupos de LBG+NAC y LBG+NAC+Cur con respecto al grupo control y tratado con colágeno, y de nuevo el de LBG+NAC+Cur presentó la mayor reducción de área y el proceso de cicatrización de mejor calidad.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición antioxidante que comprende galactomanano y N-acetil-cisteína para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad o un estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto o de una enfermedad o un estado cutáneo que implica la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto.
- 10 2. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la producción de especies reactivas de oxígeno resulta de la exposición del sujeto a la radiación de la luz solar, agentes químicos, radioterapia o quimioterapia, y en la que la enfermedad o el estado cutáneo que resulta de la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto se selecciona de quemadura solar, fotosensibilidad, inmunosupresión, envejecimiento prematuro, psoriasis, cáncer de piel seleccionado de cáncer de células basales, cáncer de células escamosas y melanoma maligno, una enfermedad inmunológica, una inflamación localizada o extendida, una infección bacteriana o fúngica, erupciones cutáneas, estreses oxidativos sistémicos y queratosis actínica.
- 15 3. Composición para su uso según la reivindicación 1, en la que la enfermedad o el estado cutáneo que implica la producción de especies reactivas de oxígeno en la piel de un sujeto se selecciona de heridas traumáticas y quirúrgicas agudas, quemaduras, escaldaduras, fistulas, úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras de etiología mixta, y otras lesiones y trastornos inflamatorios y heridas crónicas o necróticas.
- 20 4. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende curcumina como componente antioxidante adicional.
- 5 5. Una composición antioxidante que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y curcumina.
6. Una composición antioxidante según se define en la reivindicación 5, para su uso como medicamento.
7. Un hidrogel que comprende galactomanano y N-acetil-cisteína, en el que el galactomanano está en forma de una matriz reticulada y se incorpora N-acetil-cisteína en dicha matriz reticulada de galactomanano.
- 25 8. Hidrogel según la reivindicación 7, en el que la matriz de galactomanano comprende además curcumina incorporada en la misma.
- 30 9. Hidrogel según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, que comprende además células que se seleccionan del grupo que consiste en fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células madre mesenquimatosas diferenciadas o no diferenciadas, células corneales, células epiteliales, células del sistema leucocitario, células del sistema hematopoyético, células madre diferenciadas o no diferenciadas, células condrogénicas, osteoblastos, miocitos, adipocitos y neuronas u otras células del sistema nervioso periférico y central.
10. Un hidrogel según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso como medicamento.
- 35 11. Un hidrogel según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso en el tratamiento y/o la cicatrización de heridas traumáticas y quirúrgicas agudas, quemaduras, escaldaduras, fistulas, úlceras venosas, úlceras arteriales, úlceras por presión, úlceras diabéticas, úlceras de etiología mixta, y otras lesiones y trastornos inflamatorios y heridas crónicas o necróticas.
12. Un apósito para heridas que comprende un hidrogel según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
13. Una composición cosmética que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y curcumina.
- 40 14. Uso no terapéutico de una composición cosmética que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y opcionalmente curcumina, para un daño de la piel relacionado con la edad.
15. Una composición que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y opcionalmente curcumina, para su uso en el tratamiento del daño de la piel relacionado con la edad.
16. Una composición que comprende galactomanano, N-acetil-cisteína y opcionalmente curcumina, para su uso en la protección frente a la radiación UV.

Figura 1



(a)

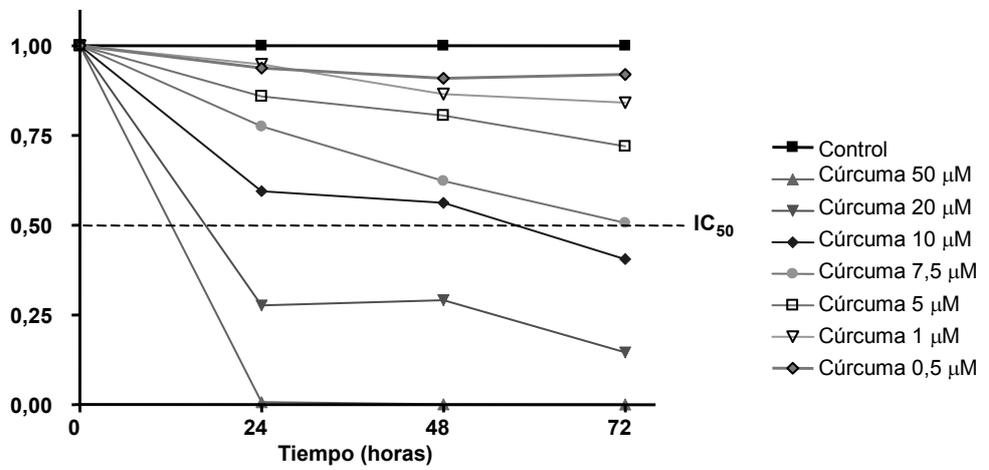
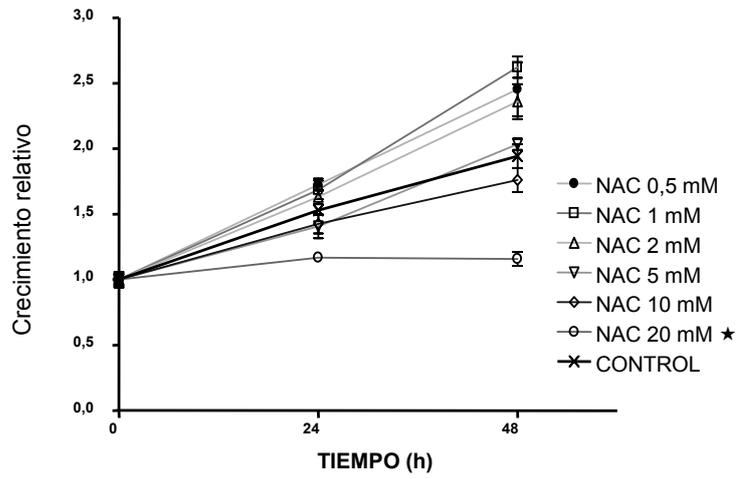
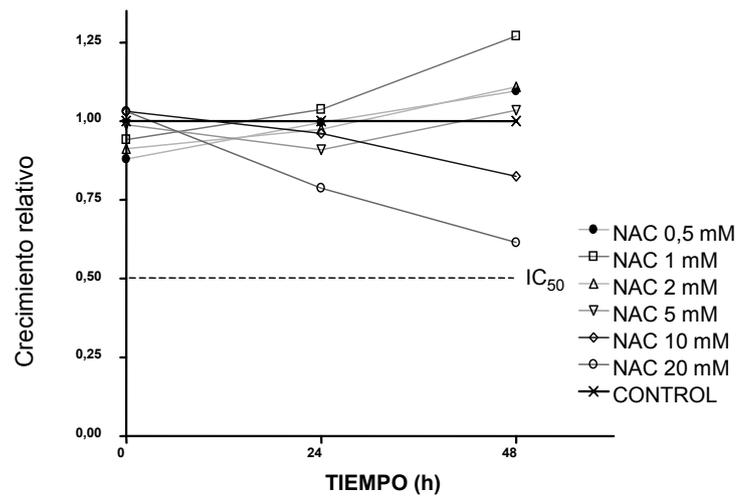


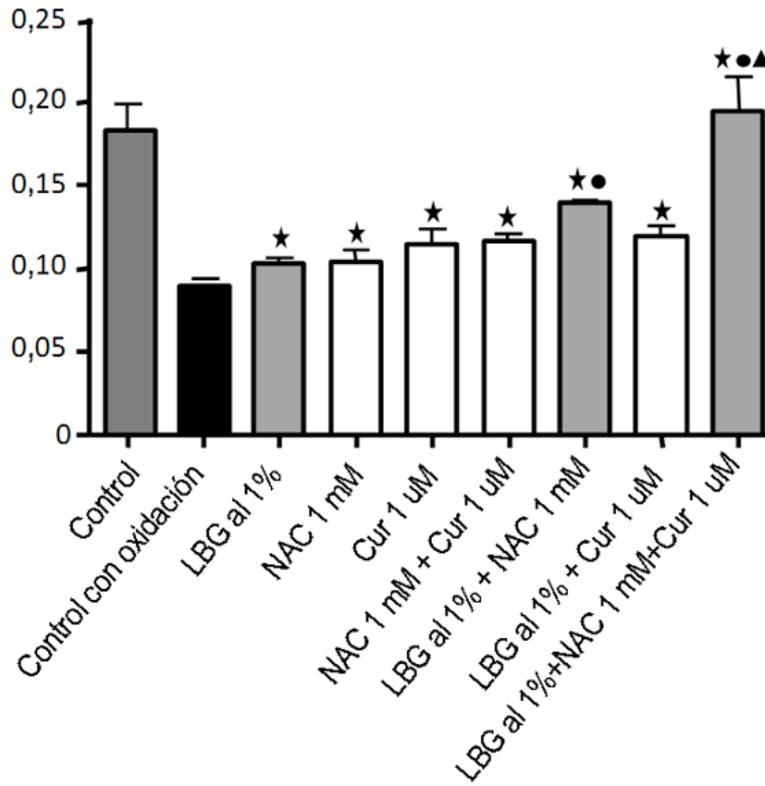
Figura 2



(a)



(b)



- ★ Diferencias significativas con respecto al control con oxidación
- Diferencias significativas con respecto a los tratamientos con NAC, Cur, nAC+Cur y LBG+Cur
- ▲ Diferencias significativas con respecto a cualquiera de los tratamientos

Figura 3

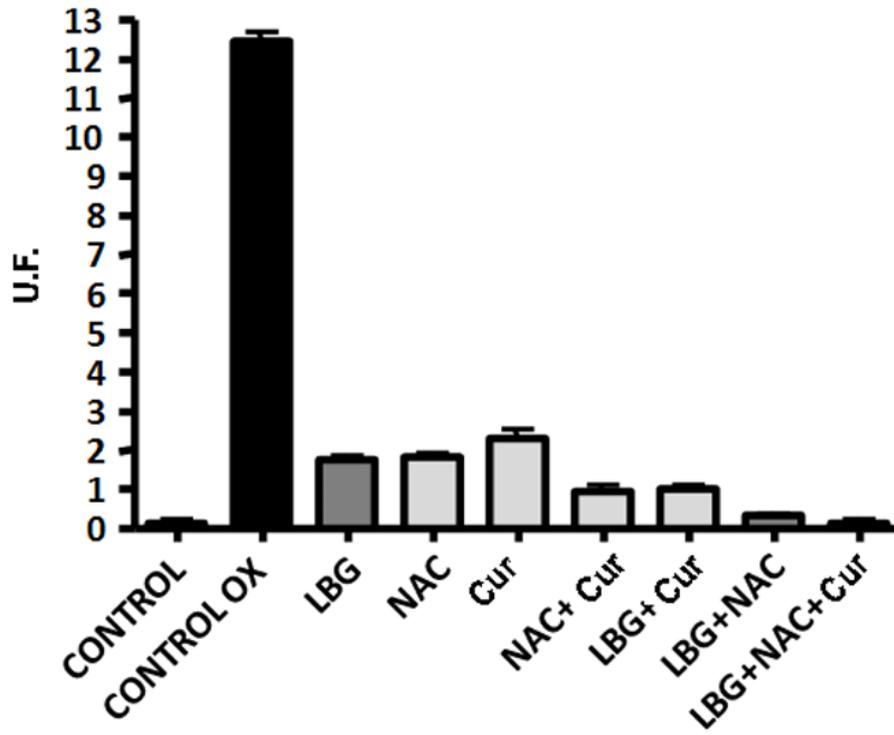
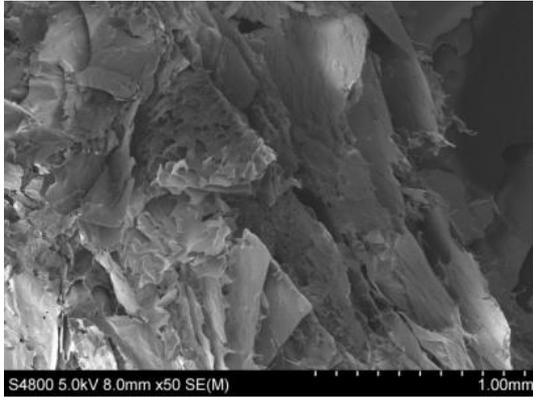
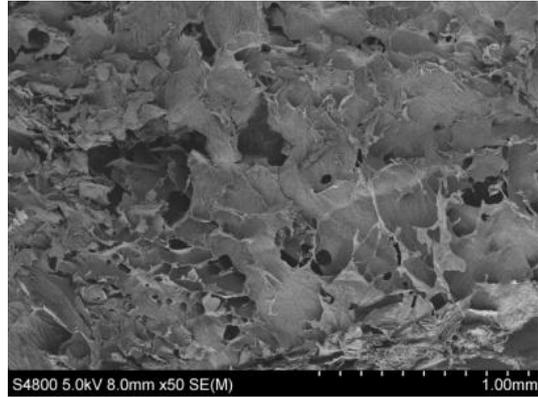


Figura 4

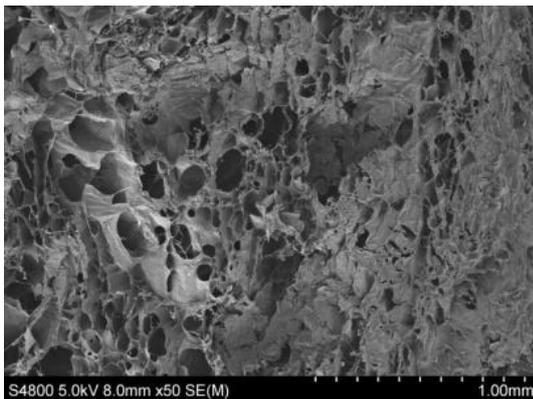
Figura 5



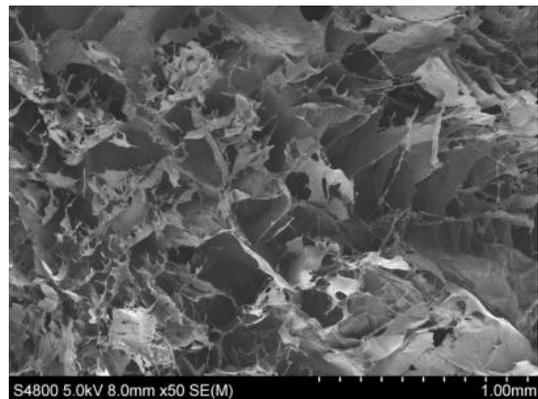
(a)



(b)



(c)



(d)

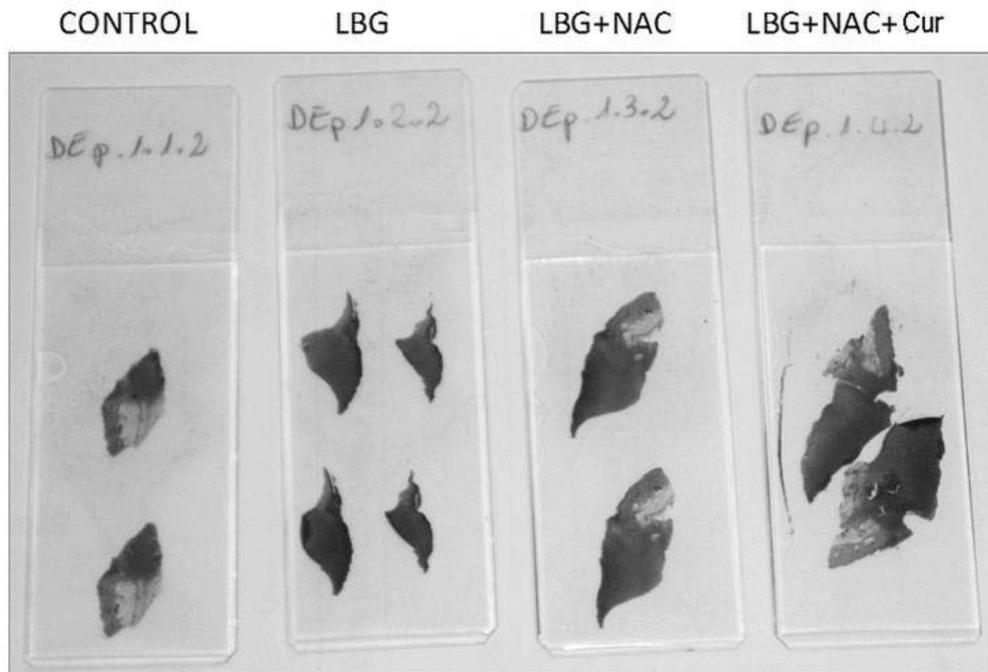


Figura 6

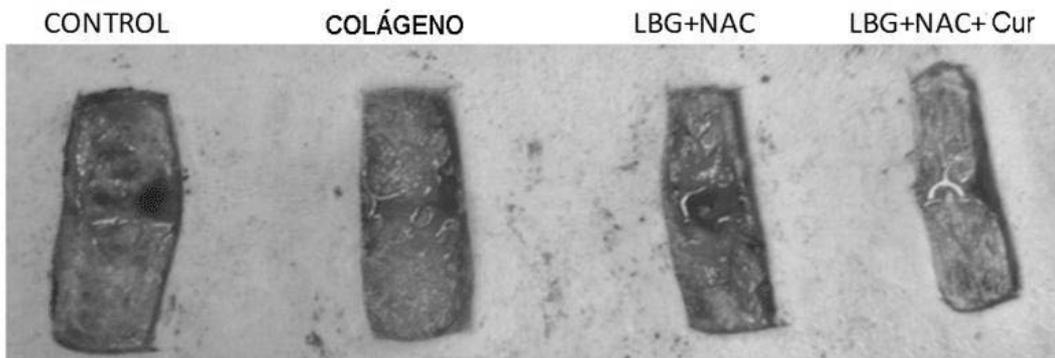


Figura 7