

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 338**

51 Int. Cl.:

A61K 9/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2009 E 09702422 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2252260**

54 Título: **Método para la estabilización de S-nitrosoglutatión y composición preparada por el mismo**

30 Prioridad:

16.01.2008 HU 0800031

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

19.06.2015

73 Titular/es:

**PHARMAGENIX AG (100.0%)
Limmatquai 1
8001 Zurich, CH**

72 Inventor/es:

**LACZA, ZSOMBOR y
HORNÝÁK, ISTVÁN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 538 338 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

Método para la estabilización de S-nitrosoglutatión y composición preparada por el mismo

Campo de la invención

5 La invención se refiere principalmente a composiciones farmacéuticas que tienen pH alcalino que comprenden S-nitrosoglutatión (GSNO) como ingrediente activo junto con aditivos usuales, opcionalmente con uno o más polímeros de tipo polisacárido. La invención se basa en el descubrimiento inesperado de que el GSNO producido con un buen rendimiento en condiciones ácidas es más estable en condiciones alcalinas, especialmente en presencia de polímeros estabilizantes.

Estado actual de la técnica

10 La vasoconstricción que se desarrolla durante alteraciones microcirculatorias incrementando la susceptibilidad a la trombosis y la acumulación de radicales libres que han sido liberados en ciertos problemas metabólicos causa un daño tisular complejo que lleva a una disminución en el potencial de cicatrización de las heridas y a la ulceración crónica en varios casos [Greenman et al., 2005, Lancet, 366, 1711-7; Sigauo-Roussel et al, 2004, Diabetes, 53, 1564-9; Veves et al, 1998, Diabetes, 47, 457-63; Hile and Veves, 2003, Curr. Diab. Rep, 3, 446-51; Nikolovska et al., 15 2005, Acta Dermatovenerol Croat, 13, 242-6]. Hay disponibles numerosos medicamentos dermatológicos para el tratamiento de las alteraciones microcirculatorias que se desarrollan, por ejemplo, en la diabetes o en la vasoconstricción. De manera característica, estas composiciones contienen aceites esenciales (por ejemplo, romero) y otros ingredientes activos no específicos que tienen una eficacia no verificada clínicamente. De acuerdo con resultados experimentales, el óxido nítrico (NO) puede afectar de manera beneficiosa a las alteraciones microcirculatorias [Cals-Grierson and Ormerod, 2004, Nitric Oxide, 10, 179-93]. El NO es un compuesto gaseoso que reacciona rápidamente, que tiene - entre otros - un efecto relajante del músculo liso, que se utiliza como un 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 el tratamiento de las úlceras que no cicatrizan [Miller et al., 20 2004, J. Cutan. Med. Surg., 8, 233-8]. Alternativamente, mediante el uso de compuestos donadores de NO, tales como nitroprusiato de sodio, se pueden transferir a la epidermis cantidades terapéuticamente eficaces de NO. Sin embargo, la administración de estos compuestos va acompañada de varios problemas nuevos que hacen difícil su aplicación. Concretamente, la mayoría de los donadores de NO no liberan solamente 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, y en consecuencia las composiciones que aumentan la corriente sanguínea que tienen una estabilidad adecuada y un efecto vasodilatador local predecible no son óptimas. En tercer lugar, mediante la absorción a través de la piel, las composiciones de donadores de NO que se degradan lentamente tales como la nitroglicerina alcanzan la circulación sistémica y ejercen su efecto en tejidos lejos del área tratada, lo que no es preferible. Los parches para la piel que contienen nitrato son ampliamente utilizados en medicina, y sus efectos se basan en parte en su característica de donadores 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 expuesta directamente. El efecto deseado de un donador de NO para el tratamiento de las alteraciones microcirculatorias es justo lo contrario: debería generar vasodilatación local, sin ejercer efectos sistémicos significativos.

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

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

55 Se conocen varias realizaciones en las que una matriz a base de polímero comprende monóxido de nitrógeno unido físicamente o químicamente. La patente de Estados Unidos 5.994.444 describe que un polímero biológicamente degradable (preferiblemente poli-ácido-L-láctico) se impregna con el compuesto donador de óxido de nitrógeno,

preferiblemente con un compuesto de nitrito inorgánico. La patente de Estados Unidos 5.770.645 2 describe polímeros que son derivatizados con el grupo -NO_x que es capaz después de liberar NO.

Los laboratorios NOLabs (Helsinborg, Suecia) presentaron varias solicitudes (WO2006/084911-14) en las que se utiliza el monóxido de nitrógeno para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo úlcera y neuropatía diabéticas. En estas enfermedades se utilizan polímeros que liberan el NO para obtener la liberación de NO deseada. Preferiblemente, se utiliza un derivado de NO de polietilenoimina 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 solamente como un soporte inerte para los polímeros que liberan NO (por ejemplo, el documento WO 2006/084912, pp. 11-12).

Estudios de investigación verifican que un compuesto de nitrosotiol endógeno, el GSNO, que es un donador natural de NO, 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 generan NO y glutatión reducido, con conocidos efectos antioxidantes. Debido a sus efectos vasodilatadores e inhibidores de la agregación plaquetaria, el NO que ha penetrado en la circulación local mejora la circulación sanguínea en la piel e inhibe la formación de trombosis [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 ya que en soluciones acuosas la semivida de este compuesto es muy corta, sólo 5,5 horas.

La estabilidad del GSNO podría ser mejorada significativamente utilizando vehículos farmacéuticamente conocidos. El poli(etilenglicol), la poli(vinil-pirrolidona), o el poli(alcohol vinílico) son todos adecuados para disminuir la velocidad de degradación del GSNO, principalmente mediante la formación de puentes de hidrógeno [A. B. Seabra et al., May 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, ya que la semivida del agente a temperatura ambiente o a 4 °C sólo se podría prolongar durante unos días.

El papel de los puentes de hidrógeno estabilizantes también se pone de relieve en la patente de Estados Unidos 7.015.347 B2, en la que se reivindican compuestos que tienen grupos OH o SH intramoleculares capaces de estabilizar el grupo S-NO.

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

En base a la presente investigación se puede afirmar que ciertos polisacáridos (preferiblemente el quitosán y polímeros naturales similares) son capaces de estabilizar el GSNO. Se supone que pueden hacerlo a través de la interacción de los grupos hidroxilo de las macromoléculas.

Sólo una publicación describe que se administraron hidrogeles que comprendían GSNO a voluntarios sanos y se observó en el estudio 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 comunicaron efectos secundarios durante el estudio. En el estudio, se utilizaron como vehículos, hidrogeles Synperonic F127 basados en poli(óxido de etileno)/poli(óxido de propileno) (Uniquema, Bélgica). Sin embargo, la composición de hidrogel utilizada en el estudio no es adecuada para la aplicación clínica, puesto que desacelera la descomposición del GSNO, de ahí que se deba preparar recientemente para cada administración.

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

El objeto de la invención es la mejora de la estabilidad del GSNO y en consecuencia el desarrollo de una composición vasodilatadora adecuada para aplicación dermatológica que sea suficientemente estable en las condiciones de almacenamiento en la farmacia, así como en los hogares. Debido a su contenido en GSNO la composición de la invención es capaz de producir un aumento clínicamente significativo en el flujo sanguíneo, por lo tanto, se puede utilizar preferiblemente para el tratamiento y la prevención de úlcera, neuropatía, tal como la neuropatía diabética periférica, y el síndrome del pie diabético.

Sumario de la invención

En la búsqueda de solución a los problemas indicados anteriormente, los inventores llevaron a cabo estudios extensivos y descubrieron que la velocidad metabólica del GSNO se puede disminuir significativamente en

condiciones alcalinas. Este resultado experimental es también inesperado ya que el GSNO se produce en condiciones ácidas para obtener un rendimiento máximo (véase la descripción de GSNO a continuación y la Figura 1).

5 Inesperadamente, se encontró que la estabilidad del GSNO tiene un máximo tipo meseta dentro del intervalo de pH de aproximadamente 8 a 9, en cuyo caso la molécula tiene una configuración más estable. Además, se descubrió también que el GSNO muestra capacidad tamponadora dentro de este intervalo (véase la Figura 2).

10 En una realización preferible de la invención se observa muy buena estabilidad a un valor de pH de aproximadamente 8,6 en comparación, por ejemplo con el pH de 4,26 aplicado convencionalmente (véase la Figura 3). Cabe señalar que a un valor de pH de aproximadamente 4.26 el GSNO se comporta también como un tampón, por lo tanto, hasta ahora, posteriormente a la preparación ácida convencional, el GSNO ha sido conservado en una solución que tiene aproximadamente el pH anterior.

De manera interesante, el metabolismo del GSNO se acelera cuando las condiciones se vuelven más alcalinas (véase la curva de pH 12).

15 Basándose en los resultados experimentales anteriores, la invención proporciona principalmente una composición que comprende un GSNO alcalino (que tiene un valor de pH de aproximadamente 8 a aproximadamente 9) que permanece adecuadamente estable durante el almacenamiento, después de ser puesta sobre la piel (alternativamente, después de una neutralización que precede a la aplicación) la composición ejerce importantes efectos vasodilatadores locales y de aumento de la corriente sanguínea, por lo que se puede utilizar en la prevención y tratamiento de las enfermedades mencionadas antes.

20 Los inventores han descubierto también que se puede obtener una composición especialmente estable cuando se utilizan también en la composición uno o más polímeros adecuados. Se encontró que el efecto estabilizante de los polímeros (por ejemplo, PVA, PEG) capaz de estabilizar el GSNO se puede mejorar significativamente cuando el valor de pH de la composición está dentro del intervalo alcalino.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a las siguientes cuestiones:

25 1. Composición farmacéutica que comprende GSNO como ingrediente activo junto con aditivos usuales, y con uno o más polímeros farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo de polisacáridos, PVA, PVP, PEG, ácido algínico y sus sales, donde el valor de pH de la composición es aproximadamente 8-9.

2. Composición farmacéutica según el punto 1, caracterizada porque la composición es un gel acuoso y contiene polímeros PVA y PEG como polímeros farmacéuticamente aceptables, opcionalmente junto con un polisacárido.

30 3. Composición farmacéutica según el punto 1 o el punto 2, caracterizada porque está en una forma sólida preparada por secado, preferiblemente por liofilización de una composición según los puntos 1 o 2.

4. El uso de una solución acuosa alcalina que tiene un pH de alrededor de 8-9 para reducir la velocidad de descomposición del GSNO.

Descripción detallada de la invención

35 Definiciones

GSNO

40 El GSNO (S-nitrosoglutatión) es un compuesto endógeno que tiene un papel importante en el metabolismo del NO. El glutatión reducido como un tripéptido capturador de radicales libres que se encuentra en las células y en 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 se libera el NO, por lo tanto el GSNO no es sólo una molécula captadora 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, por ejemplo, en la sangre, por lo tanto su función fisiológica es la contribución al transporte del NO y al mantenimiento de un nivel constante de NO en la sangre.

45 Se conocen varios esquemas de reacción para sintetizar el GSNO. Según una reacción conocida, se añade nitrito de sodio y después acetona a soluciones acuosas de glutatión ácidas y frías, preferiblemente en alícuotas múltiples y con agitación. Después de la separación y el lavado del precipitado resultante, se obtiene S-nitrosoglutatión adecuadamente puro [Tetrahedron Letters, Vol. 26, N° 16, 2013-2016, 1985]. Otros métodos de preparación se describen en Acc. Chem. Res. 1999, 32, 869-876; J. Chem. Soc. Perkin Trans. I., 1994, donde también se describe la factibilidad de llevar a cabo la reacción en medio ácido.

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, ya que no se produce ningún cambio en ellas durante el proceso de descomposición del GSNO. Estas características permiten hacer un seguimiento de la concentración de GSNO espectrofotométricamente.

Polímeros farmacéuticamente aceptables

La composición puede contener uno o más compuestos tipo polímeros farmacéuticamente aceptables tales como poli(alcohol vinílico) [PVA], polietilenglicol [PEG], poli(vinilpirrolidona) [PVP], polímero basado en ácido acrílico (por ejemplo, polímero de ácido poliacrílico comercializado como "carbómero"), celulosa, ácido alginico y sus sales y ésteres (por ejemplo, polímero basado en alginato).

El término "polisacárido" significa carbohidratos macromoleculares en los que los monómeros se unen unos a otros mediante enlaces glucosídicos (glucanos). Incluye biopolímeros importantes, tales como el almidón, el glucógeno y la celulosa (considerados como productos de policondensación de dextrano y glucosa), la inulina (el producto de policondensación de fructosa), quitina, ácido alginico etc. Puesto que los polisacáridos mencionados antes son productos de policondensación de un sacárido específico, podrían ser considerados como homopolímeros. Por supuesto, los polisacáridos que comprenden diferentes monómeros (heteroglucanos, tales como hemicelulosas, heparina, ácido hialurónico, mureína) también se pueden utilizar en la realización de la invención. Se pueden utilizar también en la realización de la invención varios polisacáridos derivatizados conocidos (por ejemplo desacilados, sulfonados, etc.). Los polisacáridos utilizados en la invención son preferiblemente estables en condiciones alcalinas (tal como ácido alginico, sus sales y ésteres). Sin embargo, también se pueden usar polisacáridos que tienen la estabilidad más alta en condiciones de pH ligeramente ácido, pero que también tienen estabilidad suficiente en condiciones neutras o alcalinas, tales como quitosán [β -1,4-poli-D-glucosamina que se puede considerar como un derivado desacilado de quitina (β -1,4-poli-N-acetil-D-glucosamina)].

Aditivos farmacéuticamente aceptables

Además, la composición puede contener cualquier aditivo usual que sea necesario para la optimización de las características físicas de la composición. Por tanto, puede contener vehículos inertes, agentes gelificantes, mejoradores de la viscosidad, colorantes, agentes tampón, odorantes, conservantes, estabilizantes, etc.

Las composiciones según la invención son preferiblemente hidrogeles o aquellas composiciones secas que se pueden transformar en hidrogel para uso en medicación poniéndolas en contacto con agua.

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

Método para la preparación de la composición

Las composiciones de la invención se preparan por un método conocido *per se*. Preferiblemente, se prepara un gel acuoso a partir de uno o más polímeros adecuados (preferiblemente, PAG, PVA, alginato, polisacárido), después se mezcla el GSNO con el gel en la concentración deseada.

Opcionalmente, el gel alcalino obtenido se liofiliza. Para un almacenamiento a largo plazo, es posible mantener la composición liofilizada en un refrigerador. De forma factible, la composición liofilizada se regenera con agua, preferiblemente con agua destilada, preferiblemente en condiciones alcalinas, justo antes de la aplicación.

Ajuste del pH

El ajuste del pH de la composición se puede realizar por:

a) ajustando el valor de pH después de mezclar los componentes;

b) ajustando el valor de pH de la solución inicial de GSNO hasta el nivel deseado, después se comprueba el valor de pH después de la adición de los otros componentes y, si es necesario, se ajusta hasta el valor deseado mediante la adición de álcali o ácido.

La alcalinización o acidificación se pueden realizar utilizando álcalis farmacéuticamente aceptados (tales como, hidróxidos de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, por ejemplo hidróxido de sodio) o ácidos farmacéuticamente aceptados (tales como halogenuros de hidrógeno, por ejemplo cloruro de hidrógeno, ácidos orgánicos comunes, por ejemplo, ácido láctico, etc.). Los valores de pH se miden como es usual (utilizando electrodos de medida de pH, valoración etc.).

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la producción de GSNO a diferentes valores de pH. Los valores de absorbancia medidos son proporcionales a las concentraciones de GSNO obtenidas. En el eje de las X se dan los valores de pH y en el eje de las Y los valores de la absorbancia.

- 5 La Figura 2 muestra la curva de valoración alcalina (realizada con NaOH) de GSNO. Se puede observar que la capacidad tamponadora se ejerce a pH 8-10.

La Figura 3 muestra los resultados del metabolismo de GSNO obtenido a diferentes valores de pH. En el eje de las X se da el tiempo (expresado en días) y en el eje de las Y los valores de la absorbancia.

Los símbolos indican los siguientes valores de pH:

- 10 *: pH = 0,3;
 ◆: pH = 4,26;
 □: pH = 7,4;
 ●: pH = 8,6;
 ○: pH = 12,6.
- 15 La Figura 4 muestra los resultados de las medidas realizadas según el ejemplo 3. En el eje de las X se da el número de la solución y en el eje de las Y se dan los valores de la absorbancia relativa (la absorbancia de la solución de partida se considera 100). Se observó descomposición de cada solución el día 36.

Ejemplos

La lista de materiales utilizados en los ejemplos es como sigue:

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

Medida del GNSO

- 30 Se hizo un seguimiento de la descomposición del GSNO espectrofotométricamente, ya que el espectro de absorción de GSNO sufre cambios y el cambio de tamaño del pico a 540 nm es linealmente proporcional a la concentración de GSNO. Las longitudes de onda en el IR lejano se utilizaron como absorción de fondo, puesto que no se produce ningún cambio en ellas durante la descomposición de GSNO.

1. Ejemplo 1

35 Preparación de GSNO

Método A

- 40 Se disolvieron 1,53 g (5 mmol) de L-glutación (GSH) en una mezcla de 5,5 mL de agua y 2,5 mL de solución acuosa de HCl (2 N) enfriada en baño de hielo, después se añadieron 0,345 g (mmol) de nitrito de sodio. Se agitó la mezcla durante 40 min a 5 °C, después se añadieron 10 mL de acetona y se agitó la solución durante otros 10 min. Se filtró el depósito marrón precipitado y posteriormente se lavó con agua enfriada en hielo (5 x 1 mL), acetona (3 x 10 mL) y éter (3 x 10 mL). De este modo se obtuvieron 1,29 g (3,8 mmol) de S-nitrosoglutación (76 % de rendimiento).

Método B

En primer lugar se añadieron 0.204 g (0.666 mmol) de GSH y después una cantidad equimolar de NaNO_2 a 8 mL de agua desionizada y se mantuvo la mezcla sobre hielo y se agitó durante 10 min más en la oscuridad. La concentración calculada de la solución recién obtenida es de 2,726 % en peso.

- 5 En experimentos posteriores se utilizó la solución recientemente preparada de GSNO según el método B anterior.

Ejemplo 2

Método general de preparación de las soluciones estudiadas

- 10 Los geles de PVA y chitosán previamente preparados se mezclaron con la solución de GSNO del ejemplo 1B en una cantidad que diluía 3 veces la solución original de GSNO. Se pipetearon alícuotas de 200 μL a los pocillos de una placa de 96 pocillos en duplicados. Se taparon las placas y se almacenaron a 4 °C en la oscuridad. Puesto que durante el almacenamiento las preparaciones perdieron diferentes cantidades de agua, después de terminar el experimento se hizo necesario completarlas con agua hasta el volumen original. La concentración de GSNO se expresó como el % de disminución de la densidad óptica medida espectrofotométricamente al principio y al final del experimento.

- 15 3. Ejemplo 3

Datos de estabilidad a los 36 días

Se realizaron los experimentos de forma análoga a la descrita en el ejemplo 2 utilizando los siguientes geles. Las medidas se realizaron después de 36 días.

1-2. soluciones 1-12:

- 20 Solución stock: 0,2 g de PVA y 0,6 g de PEG disueltos en 4 mL de agua (Millipore Milli-Q). Las siguientes soluciones se prepararon a partir de la solución stock:

1. Solución 1: 800 μL de solución stock, pH 5.
2. Solución 2: 800 μL de solución stock que tiene un valor de pH ajustado a 9 con NaOH.

3-4. Solución 3-4:

- 25 Solución stock: 0,15 g de PVA y 0,65 g de PEG disueltos en 4 mL de agua (Millipore Milli-Q).

3. Solución 3: 800 μL de solución stock, pH 5.
4. Solución 4: 800 μL de solución stock que tiene un valor de pH ajustado a 9 con NaOH.

5-6. soluciones 5-6:

Solución stock: 0,1 g de PVA y 0,7 g de PEG disueltos en 4 mL de agua (Millipore Milli-Q).

- 30 5. Solución 5: 800 μL de solución stock, pH 5.
6. Solución 6: 800 μL de solución stock que tiene un valor de pH ajustado a 9 con NaOH.

7-8. soluciones 7-8:

Solución stock: 0,05 g de PVA y 0,75 g de PEG disueltos en 4 mL de agua (Millipore Milli-Q).

7. solución 7: 800 μL de solución stock, pH 5.
35 8. solución 8: 800 μL de solución stock que tiene un valor de pH ajustado a 9 con NaOH.

9-10. soluciones 9-10:

Solución stock: 0,8 g de PEG disuelto en 4 mL de agua (Millipore Milli-Q). (solución exenta de PVA).

9. solución 9: 800 μL de solución stock, pH 5.
10. solución 10: 800 μL de solución stock que tiene un valor de pH ajustado a 9 con NaOH.

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos. Es evidente que después de 36 días la descomposición de GSNO es significativamente menor en las soluciones poliméricas alcalinas.

5 La comparación de las figuras 3 y 4 también muestra que la mejora de la estabilidad de GSNO encontrada en condiciones alcalinas se puede aumentar más utilizando polímeros con efecto estabilizante. Los polímeros por sí mismos mejoran la estabilidad de GSNO puesto que incluso el día 36 se observa un valor de absorbancia relativa de alrededor de 30 con las soluciones ácidas que contienen el polímero. Sorprendentemente, el efecto estabilizante de los polímeros se puede mejorar significativamente cuando se utilizan los polímeros en condiciones alcalinas - con las soluciones 6 y 8 los valores de absorbancia relativas son superiores a 60, esto es, se encuentra en efecto un aumento de aproximadamente el 80 %

10

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende GSNO como ingrediente activo junto con aditivos usuales y con uno o más polímeros farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo de polisacáridos, PVA, PVP, PEG, ácido algínico y sus sales, donde el valor de pH de la composición es aproximadamente 8-9.

5 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque la composición es un gel acuoso y contiene polímeros de PVA y PEG como polímeros farmacéuticamente aceptables, opcionalmente junto con un polisacárido.

3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizada porque está en una forma sólida preparada por secado, preferiblemente por liofilización de una composición según las reivindicaciones 1 o 2.

10

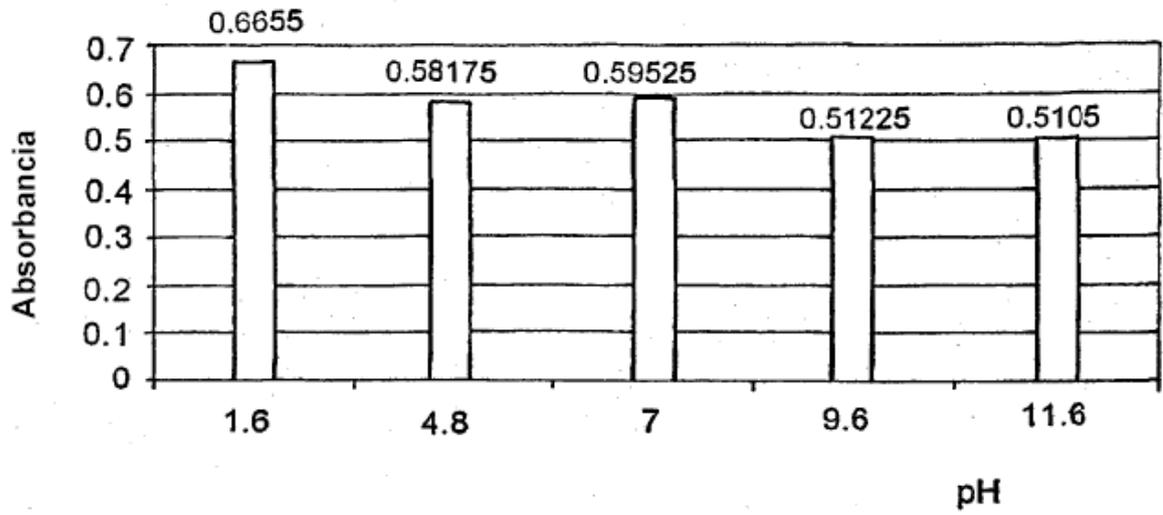


Fig.1

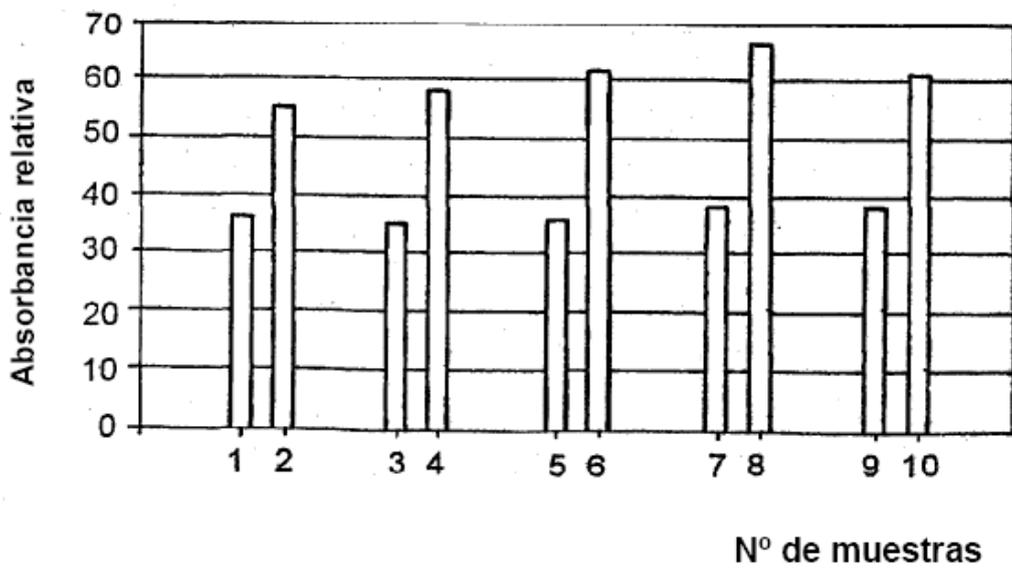


Fig. 4

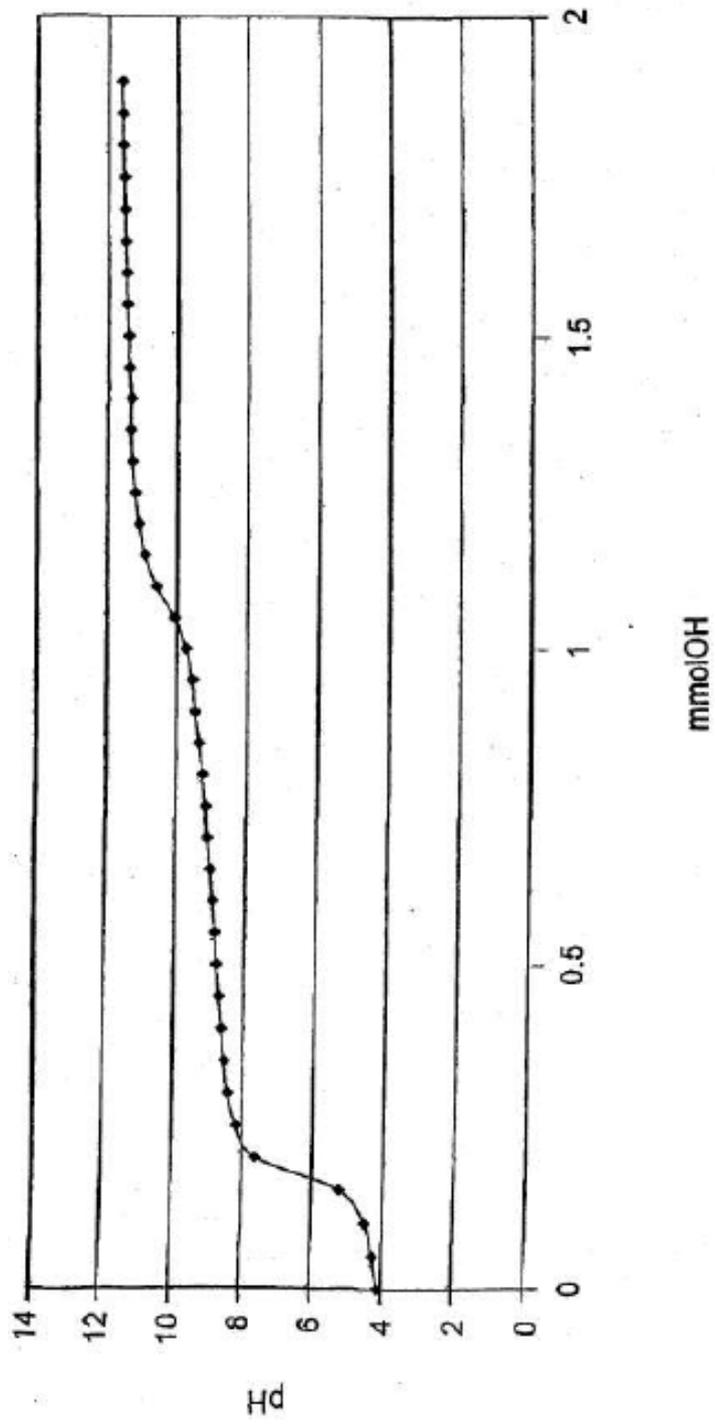


Fig.2

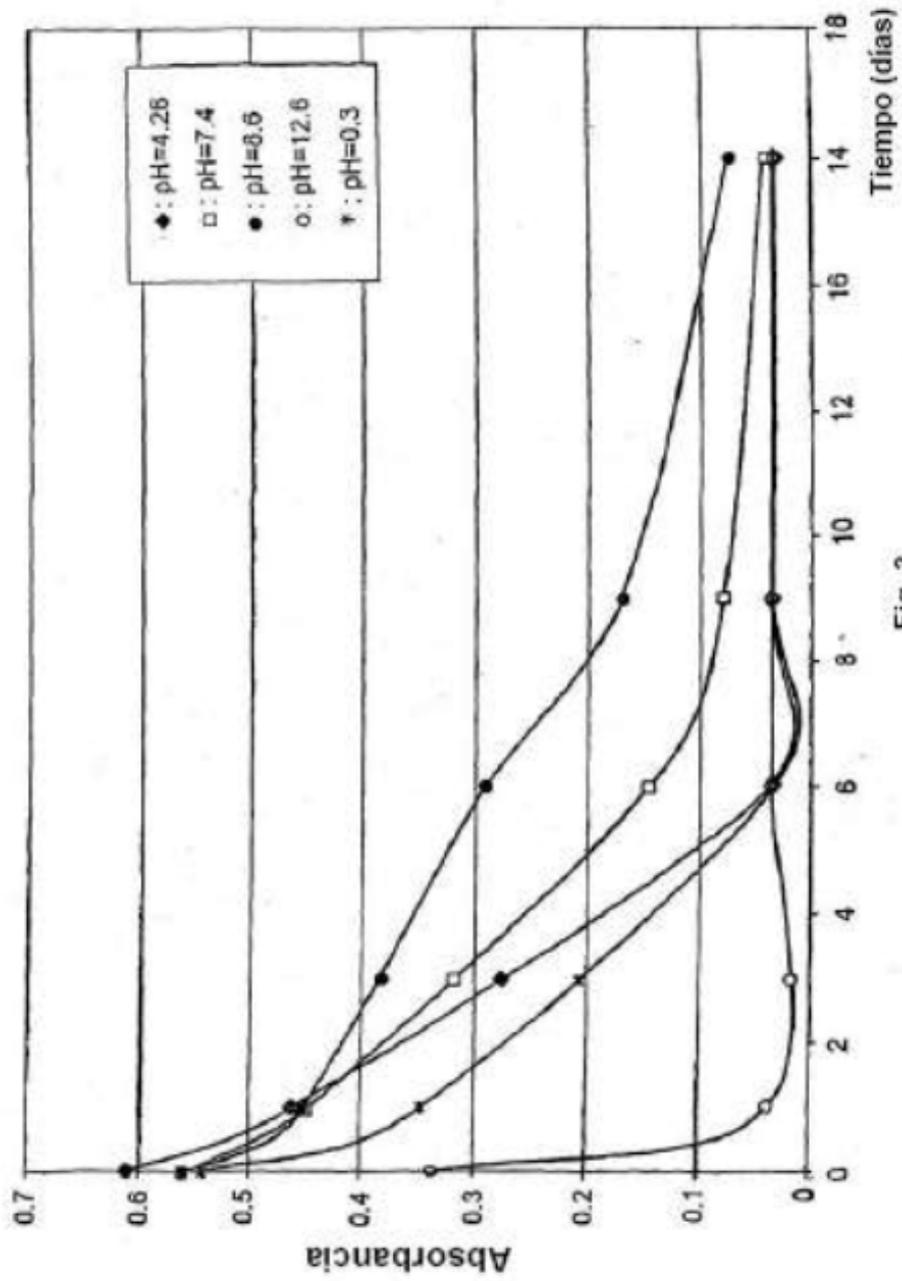


Fig.3