

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 492**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61K 47/10** (2007.01)

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61K 31/21** (2006.01)

**A61K 47/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2014 PCT/EP2014/076020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.06.2015 WO15079049**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2014 E 14805887 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 3074045**

54 Título: **Composición acuosa pulverizable que comprende trinitrato de glicerilo**

30 Prioridad:

**29.11.2013 EP 13005562**

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

**26.01.2018**

73 Titular/es:

**G. POHL-BOSKAMP GMBH & CO. KG (100.0%)  
Kieler Strasse 11  
25551 Hohenlockstedt, DE**

72 Inventor/es:

**GERBER, ANDREAS;  
GORATH, MICHAELA y  
ZIMMECK, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 651 492 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 acuosa pulverizable que comprende trinitrato de glicerilo

5 La invención se refiere a preparaciones farmacéuticas con la sustancia activa trinitrato de glicerilo en forma de una disolución acuosa que comprende un polímero soluble en agua, al uso de la preparación farmacéutica, a un procedimiento para la preparación de la preparación farmacéutica y a un kit que comprende la preparación farmacéutica.

10 El trinitrato de glicerilo (nitroglicerina, abreviado GTN) es una sustancia farmacéutica activa que se usa, entre otras, para tratar los ataques de angina de pecho. Es especialmente útil en situaciones de emergencia, cuando la forma farmacéutica debe garantizar un inicio de acción rápido. Los pulverizadores sublinguales han demostrado ser altamente eficaces porque pulverizar la formulación en la boca representa un procedimiento directo y rápido para aplicar la dosis en una gran parte de la mucosa. El GTN se absorbe rápidamente de la mucosa y puede actuar en cuestión de segundos.

15 Los pulverizadores que contienen GTN se pueden formular con o sin la adición de un propulsor. Los pulverizadores de propulsor se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 3.155.574, en la solicitud de patente europea EP 0 461 505 y la solicitud alemana DE 32 460 81. Se describen formulaciones que contienen GTN sin propulsor para uso como pulverizadores de bomba en las solicitudes de patente europea EP 0 448 961, EP 0 471 161 y en la solicitud de patente alemana DE 39 22 650.

20 El GTN es un líquido de polaridad media con solubilidad en agua limitada, pero se disuelve fácilmente en una pluralidad de otros disolventes. Las formulaciones de pulverización también pueden estar basadas en sustancias lipófilas no acuosas, en disolventes no acuosos que son miscibles con agua o en sistemas disolventes que contienen agua. Por ejemplo, la patente EP 0 448 961 describe una preparación bastante lipófila con un contenido preferido de triglicéridos de 80% y etanol como codisolvente en una concentración de 20%. La formulación de propulsor según las enseñanzas de la solicitud de patente EP 0 927 032 que contiene aproximadamente 30% de triglicéridos además del propulsor también se puede caracterizar como altamente lipófilo. Por el contrario, la pulverización de propulsor según el documento US 3.155.574 con 25% de etanol pertenece al segundo grupo de formulaciones. Además, el documento DE 3 922 650 A1 describe una formulación de pulverización libre de propulsor que no contiene agua: el GTN se disuelve en una pluralidad de disolventes polares. En la solicitud de patente europea EP 0 471 161 se describe un pulverizador de bomba que contiene etanol, 1,2-propanodiol y 42% de agua como disolventes. La concentración de pulverizadores de GTN comercializados está usualmente por debajo del 1%, porque la dosis terapéuticamente efectiva para tratar un ataque de angina de pecho está por debajo de 1 mg.

35 La solubilidad de la nitroglicerina en agua es de aproximadamente 1 mg/ml. En la patente europea EP 0 108 248B1 se proponen para infusión disoluciones de GTN en un intervalo de concentración de 0,08 a 0,11 por ciento en peso. Esta baja concentración es suficiente para que una disolución para infusión intravenosa consiga efectos terapéuticos, porque se puede aplicar un volumen comparativamente grande de la disolución. Sin embargo, para una forma farmacéutica tópica, esto no es cierto. Cuando se aplica un volumen de más de 100 µl sublingualmente, hay un riesgo notable de tragar el fármaco. La sustancia activa se reabsorbe desde el tracto gastrointestinal mucho más lentamente que a través de la mucosa oral y la concentración en sangre se reduce adicionalmente mediante un efecto prominente de primer paso. Por lo tanto, los niveles en plasma necesarios para un tratamiento rápido y efectivo en una situación de emergencia no se pueden alcanzar de esta manera. De una manera similar, también hay un límite superior para la aplicación dérmica de una disolución de pulverización, porque cuando se aplican cantidades mayores, por ejemplo, más de 100 µl, se pueden perder por goteo o fuga. Para alcanzar niveles en plasma eficaces, la concentración de la sustancia activa en una disolución tópica que contiene GTN necesita ser más alta de 1 mg/ml, por ejemplo, no menos de 1,5 mg/ml.

45 La patente de EE.UU. 5.698.589 describe una crema tópica con una concentración de GTN entre 0,2 y 1,5 por ciento en peso. La sustancia activa está formulada en una emulsión. Esta forma galénica no es apropiada para la aplicación sublingual u oral debido a dificultades de dosificación y de cumplimiento del paciente. En general, tales preparaciones no son pulverizables debido a su alta viscosidad. En consecuencia, no se pueden pulverizar sobre la piel o dentro de la cavidad oral. El paciente debería sacarlo de su recipiente, ponerlo, por ejemplo, en un dedo y luego aplicarlo sobre la piel o la mucosa oral. Por lo tanto, una crema tópica no es apropiada. Además, las emulsiones contienen emulsionantes y otros excipientes para aplicación tópica que pueden no ser aceptables para preparaciones orales debido a su mal sabor o propiedades toxicológicas. Finalmente, la sustancia activa necesita ser liberada de la emulsión, antes de que pueda ser absorbida. Esta liberación se ve obstaculizada debido al contenido de componentes aceitosos o grasos en la fase aceitosa de la emulsión y espesantes en la fase acuosa. Este aspecto es también un grave inconveniente para la aplicación dérmica.

55 Tomados en conjunto, sigue habiendo una necesidad considerable de preparaciones de GTN pulverizables. Deben ser bien toleradas después de la aplicación tópica y garantizar una captación suficiente de la sustancia activa en el cuerpo. Las preparaciones deben ser fáciles de fabricar y aplicar.

El objetivo de la presente invención es suministrar una preparación farmacéutica estable en forma de una disolución

acuosa que contenga no menos de 0,15 por ciento en peso de GTN.

Este objetivo se resuelve por medio de una preparación farmacéutica que comprende:

(a) de 0,15 a 3 por ciento en peso de trinitrato de glicerilo,

(b) de 40 a 95 por ciento en peso de agua, y

5 (c1) de 2 a 10 por ciento en peso de por lo menos un polímero soluble en agua,

o

(c2) de 1 a 10 por ciento en peso de por lo menos un polímero soluble en agua y de 5 a 20 por ciento en peso de etanol.

10 Según la presente invención, la expresión "porcentaje en peso" siempre se refiere al peso de la preparación farmacéutica. En otras palabras, una preparación farmacéutica según la invención siempre comprende 100 por ciento en peso.

15 En el contexto de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que mediante el uso de polímeros solubles en agua, la sustancia activa GTN permanece en disolución sin un incremento intolerable de la viscosidad de la disolución que, por ejemplo, comprometería la pulverizabilidad de una realización pulverizable de la invención. Por lo tanto, dicha preparación farmacéutica caracterizada por baja viscosidad como se define aquí se puede preparar cuando, aparte de los excipientes habituales, está presente por lo menos un polímero soluble en agua que mejora la insolubilidad típica y bien documentada de la sustancia activa, GTN. Esto se ilustra mediante preparaciones representativas que contienen GTN descritas aquí en los ejemplos 1 a 4. Los hallazgos documentados aquí son contrarios a los enfoques utilizados hasta ahora por los químicos de formulación que trabajan para preparar líquidos que contienen GTN mejorados, clínicamente útiles. En primer lugar, el contenido de agua de la presente invención es sustancialmente superior al que se entiende actualmente que es posible cuando se trabaja con GTN. En segundo lugar, la combinación de alto contenido de agua y un polímero soluble en agua que da como resultado una formulación acuosa que contiene GTN clínica y comercialmente útil es inesperada en vista del estado de la técnica. Y, en tercer lugar, las propiedades viscosas de la presente invención que son compatibles con una realización pulverizable de la presente invención también son inesperadas.

25 "Baja viscosidad" en el contexto de esta invención quiere decir que la viscosidad medida a 20°C con un viscosímetro rotacional a una velocidad de cizalladura de 1.800/s no es más de 50 mPa \* s; en una realización preferida no es más de 40 mPa \* s, lo más preferido no más de 30 mPa \* s.

30 "Soluble en agua" en el sentido de esta invención quiere decir que la solubilidad de los polímeros en agua a 20°C no es menos de 0,5 por ciento en peso, preferentemente no menos de 1 por ciento en peso y lo más preferentemente no menos de 2 por ciento en peso relativo a la composición total. La solubilidad se mide agitando la cantidad respectiva de polímero en 100 ml de agua durante 24 horas y a continuación juzgando visualmente la transparencia de la disolución.

35 "Estable" en el sentido de esta invención quiere decir estabilidad tanto física como química: la preparación farmacéutica preferentemente permanece homogénea durante el almacenamiento a temperaturas elevadas (hasta 50°C) y cuando está refrigerada (5°C), preferentemente no muestra ninguna pérdida relevante del componente activo cuando se almacena a 25°C durante dos años. En realizaciones especialmente preferidas, la preparación se puede congelar a -20°C y da como resultado una disolución transparente después de descongelar y agitar el recipiente.

40 La preparación farmacéutica de la presente invención comprende de 0,15 a 3 por ciento en peso de GTN.

La concentración de GTN está preferentemente en el intervalo de 0,15 a 2 por ciento en peso, lo más preferido son concentraciones de 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 1,0, 1,2 y 1,5 por ciento en peso.

45 Debido a sus propiedades explosivas, el GTN para su uso en productos farmacéuticos está preferentemente flegmatizado por el productor de GTN. "Flegmatizado" quiere decir que está incorporado en una matriz que reduce las características peligrosas. Se pueden usar como flegmatizadores compuestos tanto líquidos como sólidos. Por ejemplo, se puede comprar GTN en forma de una disolución al 5% en propilenglicol, en forma de una trituración al 10% en lactosa monohidrato o en dilución al 2,25% en glucosa. Cuando estos productos concentrados que contienen GTN se usan directamente para producir preparaciones según la invención, los flegmatizadores también están presentes en la preparación farmacéutica. Una realización preferida de la invención usa GTN en propilenglicol. Lo más preferentemente, se usa una disolución al 5% de GTN en propilenglicol.

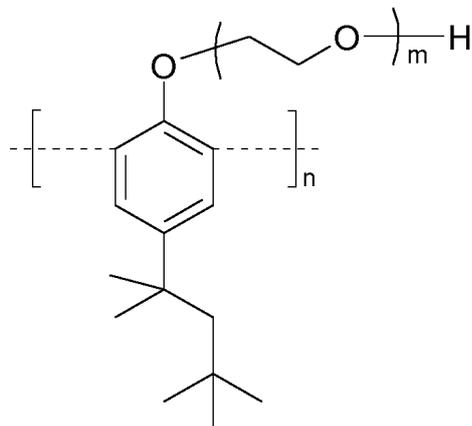
50 La preparación farmacéutica según esta invención comprende de 40 a 95 por ciento en peso de agua. Preferentemente, la preparación farmacéutica comprende de 60 a 90 por ciento en peso de agua. Los contenidos de agua preferidos son 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 por ciento en peso.

La preparación farmacéutica comprende por lo menos un polímero soluble en agua.

El polímero soluble en agua es preferentemente un polímero no iónico soluble en agua.

En una realización preferida, el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en tiloxapol y poloxámero.

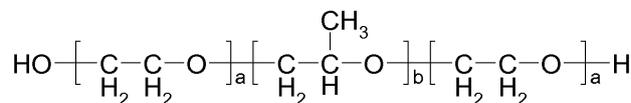
5 El tiloxapol es un alquil-aril-poliéter-alcohol no iónico que comprende la siguiente fórmula (I):



(I)

en la que m es preferentemente de 6 a 8 y n es preferentemente menos de 6. El tiloxapol está disponible en, por ejemplo, Pressure Chemicals, Pittsburgh, Pa., Estados Unidos de América.

El poloxámero es un copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno y comprende la siguiente fórmula (II):



10 (II) en la que a y b son preferentemente como se define a continuación.

El poloxámero puede ser poloxámero 124, poloxámero 188, poloxámero 237, poloxámero 338 o poloxámero 407.

En el poloxámero 124, a es de 10 a 15 y b es de 18 a 23. El contenido de oxietileno es de 44,8% a 48,6% y la masa molecular relativa promedio es de 2.090 a 2.360.

15 En el poloxámero 188, a es de 75 a 85 y b es de 25 a 30. El contenido de oxietileno es de 79,9% a 83,7% y la masa molecular relativa promedio es de 7.680 a 9.510.

En poloxámero 237, a es de 60 a 68 y b es de 35 a 40. El contenido de oxietileno es de 70,5% a 74,3% y la masa molecular relativa promedio es de 6.840 a 8.830.

20 En poloxámero 338, a es de 137 a 146 y b es de 42 a 47. El contenido de oxietileno es de 81,4% a 84,9% y la masa molecular relativa promedio es de 12.700 a 17.400.

En poloxámero 407, a es de 95 a 105 y b es de 54 a 60. El contenido de oxietileno es de 71,5% a 74,9% y la masa molecular relativa promedio es de 9.840 a 14.600.

El poloxámero 407 está disponible, por ejemplo, con la marca comercial Kolliphor® P407 de BASF, Ludwigshafen, Alemania.

25 En una realización preferida, el polímero soluble en agua es tiloxapol.

En una realización preferida adicional, el polímero soluble en agua es poloxámero 407.

En una realización preferida adicional, el polímero soluble en agua es una mezcla de tiloxapol y por lo menos un poloxámero.

30 El polímero soluble en agua se usa en una concentración entre 2 y 10 por ciento en peso, por ejemplo, en una concentración de 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 por ciento en peso. La concentración se escoge tan baja como sea posible, porque con una cantidad creciente de polímero, la viscosidad de la preparación se incrementa de una

manera desproporcionada.

5 La invención también incluye una preparación farmacéutica que comprende de 1,0 a 10 por ciento en peso de por lo menos un polímero soluble en agua y de 5 a 20 por ciento en peso de etanol. El polímero soluble en agua está, por ejemplo, en una concentración de 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 por ciento en peso y el etanol está preferentemente en una concentración de 10, 12, 15, 18 o 20 por ciento en peso.

En realizaciones preferidas, la preparación farmacéutica comprende:

de 1 a 5 por ciento en peso de por lo menos un polímero soluble en agua y de 10 a 20 por ciento en peso de etanol,

de 2 a 4 por ciento en peso de por lo menos un polímero soluble en agua y de 12 a 18 por ciento en peso de etanol,  
o

10 de 2 a 3 por ciento en peso de por lo menos un polímero soluble en agua y 15 por ciento en peso de etanol.

Las preparaciones farmacéuticas según la invención pueden comprender adicionalmente otros excipientes farmacéuticamente aceptables. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser por lo menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en conservantes, componentes de sabor, componentes de aroma, edulcorantes, ácidos y bases para ajustar el pH y sustancias tampón.

15 En una realización de la invención, la preparación farmacéutica comprende de 0 a 50 por ciento en peso de por lo menos un aditivo. En una realización preferida, la preparación farmacéutica comprende de 30 a 50 por ciento en peso de por lo menos un aditivo. En una realización más preferida, la preparación farmacéutica comprende de 30 a 45 por ciento en peso de por lo menos un aditivo.

20 En una realización preferida adicional de la invención, la preparación farmacéutica comprende de 0 a 1 por ciento en peso de por lo menos un aditivo como se definió anteriormente.

En una realización preferida, la preparación farmacéutica comprende el alcohol de azúcar xilitol como componente de sabor.

25 Es deseable que la preparación cause una percepción de sabor significativa en el paciente para asegurarse de que, por ejemplo, el chorro de pulverización se ha accionado correctamente y ha alcanzado el área objetivo, por ejemplo, debajo de la lengua. El xilitol es un sustituto del azúcar "que no daña los dientes". Por consiguiente, es apropiado usarlo en la preparación farmacéutica para provocar la sensación de sabor deseada.

30 En una realización preferida, la preparación farmacéutica se puede aplicar como un chorro de pulverización que puede ser tan pequeño como 50  $\mu$ l. Por lo tanto, serían necesarias concentraciones comparativamente altas de xilitol. Las concentraciones preferidas de xilitol en la preparación farmacéutica están, por lo tanto, en el intervalo de 5 a 50 por ciento en peso, más preferentemente de 30 a 45 por ciento en peso.

35 La preparación farmacéutica puede comprender adicionalmente por lo menos un conservante. Los conservantes previenen el deterioro microbiano de la preparación farmacéutica. Se pueden usar en concentraciones de 0,01 a 1 por ciento en peso. Los ejemplos son ácido benzoico, ácido sórbico y el éster metílico, etílico y propílico del ácido 4-hidroxibenzoico. Además de estos conservantes, el etanol también se puede usar como conservante. La cantidad necesaria de etanol está en el intervalo de 5 a 20 por ciento en peso, preferentemente de 10 a 20 por ciento en peso.

En una realización de la invención, la preparación farmacéutica no comprende etanol.

40 La estabilidad del GTN en disolución acuosa exhibe un óptimo en el intervalo de pH débilmente ácido. Por lo tanto, la sustancia tampón que opcionalmente puede estar presente en la preparación según esta invención se escogerá del grupo de sustancias que poseen una buena capacidad de tampón, preferentemente en el intervalo de pH de 3,0 a 7,0.

45 En una realización preferida de la presente invención, estas sustancias tampón son ácidos orgánicos y sus sales fisiológicamente aceptables o ácidos inorgánicos y sus sales fisiológicamente aceptables. Los ejemplos de sustancias tampón son ácido láctico / lactato de sodio, ácido cítrico / citrato de sodio, ácido glucónico / gluconato de sodio, ácido fosfórico / fosfato de potasio dibásico y monobásico. La concentración tampón se elige preferentemente de una manera que evite cambios de pH en el transcurso de un almacenamiento de dos años a 25°C de más de 0,5 unidades de pH. Preferentemente está entre 0,1 y 1 por ciento en peso.

En otra realización preferida, la preparación farmacéutica comprende además propilenglicol. La cantidad de propilenglicol puede estar en el intervalo de 0 a 40 por ciento en peso.

50 La viscosidad de la preparación farmacéutica es preferentemente  $\leq 50$  mPa \* s y más preferentemente  $\leq 30$  mPa \* s.

En un aspecto adicional de la invención, la preparación farmacéutica se usa en un método para la prevención o el

tratamiento de una insuficiencia arterial.

Según la presente invención, el término "tratamiento" o "prevención" quiere decir que no solo se alivian los síntomas de la enfermedad sino que también se trata o previene la enfermedad en sí misma. En una realización preferida, el término "tratamiento" quiere decir mejorar la prognosis de dicha enfermedad.

5 Según la invención, la expresión "insuficiencia arterial" se refiere a cualquier suministro insuficiente de sangre u oxígeno o cualquier otro suministro insuficiente de un tejido que es proporcionado por una arteria. Este suministro insuficiente se puede superar mediante los métodos y usos de la presente invención en la que se usa una composición farmacéutica para incrementar el suministro de un tejido dado. La insuficiencia arterial puede ocurrir tanto durante el descanso físico como durante un ejercicio.

10 En una realización preferida de la presente invención, la insuficiencia arterial se debe a un suministro insuficiente de oxígeno o sangre de un tejido suministrado por la arteria o un bypass o derivación durante el reposo físico o el ejercicio.

Según una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial se debe a una demanda incrementada de oxígeno o flujo sanguíneo de un tejido suministrado por la arteria o un bypass o derivación.

15 Esta incrementada demanda de oxígeno o flujo sanguíneo se puede deber a varias razones, que incluyen pero no están limitadas a la actividad física o deportiva incrementada, y actividad mental incrementada o una enfermedad que requiere una demanda incrementada de oxígeno o flujo sanguíneo.

20 Según una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial se caracteriza por una oclusión parcial (estenosis) o completa de un vaso arterial. En el contexto de la presente invención, la expresión "oclusión parcial" es equivalente a una estenosis.

25 La oclusión parcial o completa de un vaso arterial es un fenómeno bien conocido. Puede tener varias causas, entre otras, la deposición de material en los vasos sanguíneos (incluyendo las estenosis no revascularizables), la compresión de un tejido externo o líquido próximo al vaso (incluyendo la alteración de la relajación miocárdica diastólica), espasmo vascular, disfunción del endotelio del vaso que da como resultado una vasoconstricción paradójica durante el ejercicio o deterioro microvascular debido a la disfunción endotelial o anomalías de las células musculares lisas.

En una realización preferida, la insuficiencia arterial se debe a la deposición de material en los vasos sanguíneos.

La deposición de materiales en los vasos sanguíneos es un fenómeno bien conocido que da como resultado, por ejemplo, aterosclerosis.

30 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial se debe a una compresión externa o interna de una arteria.

35 Una compresión interna de una arteria se puede deber a un edema, pero también a un tumor que ejerce presión sobre la arteria. Además, esto incluye una constricción vasoespástica de la arteria como, por ejemplo, en la angina de Prinzmetal. Además, esto también incluye la vasoconstricción paradójica que, por ejemplo, ocurren a veces en una disfunción endotelial o vasos arteriales pequeños oprimidos debido a la disfunción endotelial o de células del músculo liso.

Una compresión externa se puede deber a un accidente o a cualquier fuerza externa que pueda ejercer presión sobre una arteria.

En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una enfermedad vascular.

40 Según una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en aterosclerosis, una enfermedad isquémica y una enfermedad arterial crónica adicional.

En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial coronaria.

45 En una realización preferida, la insuficiencia coronaria es una insuficiencia arterial coronaria aterosclerótica, en particular enfermedad de la arteria coronaria (cardiopatía coronaria o cardiopatía isquémica), angina de pecho estable, angina de pecho inestable, isquemia miocárdica o isquemia miocárdica crónica, síndrome coronario agudo, infarto de miocardio (ataque cardíaco o infarto de miocardio isquémico) o insuficiencia cardíaca inducida por isquemia.

En una realización preferida adicional, la insuficiencia coronaria es una enfermedad microvascular coronaria en particular no aterosclerótica (enfermedad de vasos pequeños) o síndrome X cardíaco, o angina de Prinzmetal.

50 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial cerebral (intra- o extra-cranial).

- 5 En una realización preferida, la insuficiencia arterial cerebral es una insuficiencia arterial cerebral aterosclerótica, en particular isquemia cerebral, enfermedad de la arteria carótida extracraneal, enfermedad de la arteria vertebral extracraneal, ataque isquémico transitorio (mini-accidente cerebrovascular o pre-accidente cerebrovascular), accidente cerebrovascular, demencia vascular, enfermedades cerebrales isquémicas o enfermedad cerebrovascular isquémica.
- La insuficiencia arterial cerebral también puede ser enfermedad cerebral microvascular isquémica, demencia vascular de vasos pequeños, encefalopatía arteriosclerótica subcortical (enfermedad de Binswanger), enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.
- En una realización preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial periférica.
- 10 En una realización preferida, la insuficiencia arterial periférica es una insuficiencia arterial periférica aterosclerótica, en particular enfermedad vascular periférica (enfermedad de la arteria periférica (PAD) o enfermedad oclusiva de la arteria periférica (PAOD), que incluye enfermedad arterial de la extremidad inferior y superior), deterioro de la marcha o distancia recorrida limitada, claudicación o claudicación intermitente, síntomas isquémicos de las extremidades que incluyen dolor, debilidad, entumecimiento o calambres en los músculos debido a la disminución del flujo sanguíneo, dolor isquémico en reposo, índice de presión en el tobillo-brazo anormal, lesiones isquémicas de las extremidades (cambios en el color de la piel, sequedad de las heridas, úlceras o heridas que se curan lentamente o no se curan, necrosis, gangrena), isquemia crítica crónica de las extremidades o la necesidad de amputación de extremidades.
- 15 En una realización preferida, la insuficiencia arterial periférica es una insuficiencia arterial periférica no aterosclerótica, en particular el síndrome de Raynaud (vasospasmático), trombangitis obliterante (endangitis obliterante o enfermedad de Buerger), inflamación progresiva recurrente y trombosis (coagulación) de arterias y venas pequeñas y medianas de manos y pies), enfermedad vascular inflamatoria (vasculitis) o síndromes compartimentales.
- 20 En una realización preferida, la insuficiencia arterial es inducida por diabetes, en particular trastornos de isquemia diabética, que incluyen síndrome del pie isquémico diabético, neuropatía diabética, retinopatía diabética y maculopatía, o edema macular diabético.
- En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial puede ser una insuficiencia arterial intestinal, en particular una insuficiencia arterial intestinal aterosclerótica, en particular enfermedad intestinal isquémica, isquemia mesentérica o infarto mesentérico.
- 30 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial puede ser una insuficiencia arterial urogenital, en particular una insuficiencia arterial urogenital aterosclerótica, en particular disfunción eréctil, enfermedad arterial renal, isquemia renal o infarto renal.
- En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial puede ser una insuficiencia arterial nerviosa, en particular tinnitus o neuropatía diabética.
- 35 Además, la insuficiencia arterial puede estar en el contexto de la esclerodermia (esclerosis sistémica).
- Además, la insuficiencia arterial puede estar en el contexto de la displasia fibromuscular.
- En una realización preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia de la arteria central de la retina, en particular una insuficiencia de la arteria retiniana central aterosclerótica, en particular insuficiencia arterial ocular.
- 40 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial se caracteriza por la ausencia de una disfunción endotelial.
- La disfunción endotelial es un estado patológico sistémico bien conocido del endotelio y se puede definir ampliamente como un desequilibrio entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras producidas por el endotelio o que actúan sobre el mismo.
- 45 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial crónica. En el contexto de la presente invención, la expresión "insuficiencia arterial crónica" quiere decir que el curso de la insuficiencia arterial es crónico y a menudo progrediente.
- 50 Según una realización adicional, la insuficiencia arterial crónica incluye disfunción endotelial, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria (cardiopatía coronaria o cardiopatía isquémica), angina de pecho estable, enfermedad microvascular coronaria (enfermedad de vasos pequeños) o síndrome X cardíaco, angina de Prinzmetal, demencia vascular, enfermedades isquémicas del cerebro o enfermedad cerebrovascular isquémica, enfermedad cerebral microvascular isquémica, demencia vascular de vasos pequeños, encefalopatía aterosclerótica subcortical (enfermedad de Binswanger), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad vascular periférica (enfermedad arterial periférica (PAD) o enfermedad oclusiva arterial periférica (PAOD), trombangitis

obliterante (endangeitis obliterante o enfermedad de Buerger), enfermedad vascular inflamatoria (vasculitis), displasia fibromuscular, trastornos isquémicos diabéticos, neuropatía diabética, enfermedad isquémica intestinal, disfunción eréctil, enfermedad arterial renal, tinnitus y esclerodermia (esclerosis sistémica).

5 En una realización preferida, la insuficiencia arterial es una enfermedad y/o su síntoma seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, disfunción endotelial, disfunción microvascular, enfermedad vasoespástica, una enfermedad isquémica, una enfermedad arterial aguda o crónica adicional, una enfermedad de microvasos, una insuficiencia arterial intestinal, una insuficiencia arterial urogenital, una insuficiencia arterial nerviosa, esclerodermia o insuficiencia de la arteria central de la retina.

10 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial coronaria seleccionada preferentemente del grupo que consiste en enfermedad de la arteria coronaria (cardiopatía coronaria), cardiopatía isquémica, angina de pecho estable e inestable, síndrome coronario agudo, isquemia miocárdica, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca inducida por isquemia, enfermedad microvascular coronaria (enfermedad de vasos pequeños) o síndrome X cardíaco, espasmos coronarios o angina de Prinzmetal.

15 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial cerebral intra- o extracranial seleccionada preferentemente del grupo que consiste en isquemia cerebral, enfermedad de la arteria carótida extracranial, enfermedad de la arteria vertebral extracranial, ataque isquémico transitorio (mini-accidente cerebrovascular o pre-accidente cerebrovascular), accidente cerebrovascular, demencia vascular, enfermedades cerebrales isquémicas o enfermedad cerebrovascular isquémica.

20 En una realización más preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial periférica, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Raynaud, trastornos de isquemia diabética, incluyendo síndrome de pie isquémico diabético o neuropatía diabética, tromboangeítis obliterante (endangeitis obliterante o enfermedad de Buerger), enfermedad vascular inflamatoria (vasculitis), síndromes compartimentales, arteriopatía periférica (enfermedad oclusiva de la arteria periférica), deterioro de la marcha o distancia recorrida limitada, claudicación o claudicación intermitente, síntomas de extremidades isquémicas (dolor, debilidad, entumecimiento o calambres en los músculos debido a la disminución del flujo sanguíneo), dolor isquémico en reposo, índice de presión tobillo-brazo anormal, lesiones isquémicas de las extremidades (cambio de color de la piel, sequedad de la piel, heridas o úlceras que cicatrizan lentamente o no cicatrizan, necrosis, gangrena), isquemia crítica crónica de las extremidades o la necesidad de amputación de extremidades.

30 La preparación farmacéutica según la presente invención es particularmente apropiada para promover la circulación colateral. Esto se podría explicar por la dilatación a corto plazo del vaso colateral inducido por la preparación farmacéutica que, a su vez, tiene un efecto significativamente mejorado sobre la arteriogénesis. Una arteriogénesis, por ejemplo, puede funcionar como una buena profilaxis de la isquemia tisular en general o de eventos asociados a enfermedad grave como, por ejemplo, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, fallo cardíaco isquémico, como fallo cardíaco postinfarto o amputación de extremidades en el caso de enfermedad arterial periférica. La arteriogénesis puede tener una influencia positiva en el pronóstico de la enfermedad y prevenir el desarrollo progresivo de la enfermedad.

40 Según la invención, la preparación farmacéutica se administra en una cantidad capaz de inducir la arteriogénesis. La persona experta apreciará que esta cantidad dependerá del sujeto al que se administra la preparación farmacéutica. Generalmente, la cantidad de sustancia activa a administrar puede ser de 0,05 a 50 mg por día, pero esta puede variar debido al peso del sujeto, su respuesta hemodinámica a la preparación farmacéutica y/o la gravedad de la enfermedad.

La cantidad a administrar también puede variar dependiendo de la forma de administración. Por ejemplo, cuando se administra sublingualmente, por inhalación o bucalmente, la cantidad preferida de GTN puede ser de 0,1 a 8 mg por día. Por ejemplo, cuando se administra dérmicamente, la cantidad preferida puede ser de 0,1 a 30 mg

45 Por consiguiente, la cantidad de la preparación farmacéutica a administrar puede ser de 0,1 a 15 ml por día, o, alternativamente, de 0,02 a 3 ml por día, dependiendo de la naturaleza de la preparación farmacéutica y/o de su forma de administración.

50 En una realización preferida, se puede administrar una cantidad de 0,05 a 1,6 mg de GTN por aplicación única lingualmente, sublingualmente, bucalmente u oromucosalmente. Esta cantidad se puede administrar de 1 a 5 veces como máximo, lo que da como resultado una dosis máxima de sustancia activa de 8 mg por día.

En una realización preferida, se aplica una cantidad de 0,025 a 1,0 ml (0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 1,0) de la preparación farmacéutica por lo menos de 1 hasta 5 veces al día como máximo, lo que da como resultado una dosis máxima de principio activo de 3,2 mg por día.

55 Según la invención, la expresión "administración de la preparación farmacéutica" quiere decir que se administra una dosificación dada de la preparación farmacéutica. Dependiendo de la forma de administración, la persona experta apreciará que la administración puede tardar algún tiempo. En una realización preferida, la preparación farmacéutica

- se administra en forma de una pulverización, disolución pulverizable o inyectable, o aerosol inhalable, lo que quiere decir que la administración se puede completar en segundos. Sin embargo, la administración de la preparación farmacéutica también puede tardar más tiempo, por ejemplo, si la preparación farmacéutica se administra al paciente por medio de infusión. Los modos de administración de la preparación farmacéutica se discuten adicionalmente a continuación.
- Además, según la invención, la preparación farmacéutica se administra de una manera capaz de inducir la arteriogénesis.
- Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que una preparación farmacéutica según la invención es capaz de inducir la arteriogénesis cuando se administra de una manera intermitente.
- Según la invención, la expresión "manera intermitente" quiere decir que la preparación farmacéutica se administra de una manera que sus niveles en plasma o tejido son elevados solamente un corto periodo después de la administración de la preparación farmacéutica pero a continuación disminuyen de nuevo. Esto se puede conseguir, por ejemplo, si la preparación farmacéutica tiene una composición como se define anteriormente y la administración de la preparación farmacéutica va seguida de un período de tiempo sin administración y a continuación la preparación farmacéutica se administra de nuevo al sujeto. Además, este modo de administración evita que el sujeto desarrolle tolerancias frente a la preparación farmacéutica y que el sujeto desarrolle una disfunción endotelial.
- La inducción de la disfunción endotelial es un parámetro que tiene una importancia pronóstica en pacientes con enfermedad arterial coronaria. El desarrollo de tolerancias así como la inducción de la disfunción endotelial son desventajas bien conocidas provocadas por la exposición sostenida a largo plazo a donantes de NO (Uxa A. et al., Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2010, 56 (4): 354-359)
- Además, la administración de una preparación farmacéutica según la invención de una manera intermitente tiene el efecto de que imita la situación fisiológica del organismo como, por ejemplo, comparable a la liberación endógena de NO en el entrenamiento físico. En otras palabras, la preparación farmacéutica de la presente invención actúa como un biomimético cuando se aplica de una manera intermitente.
- En una realización preferida, los niveles en plasma o tejido del compuesto activo de la preparación farmacéutica son elevados durante no más de 240, 180, 120 o 60 minutos, o durante no más de 50, 40, 30, 15, 10 o 5 minutos.
- Además, esto también implica que la preparación farmacéutica se puede administrar de manera crónica, es decir, sin tener en cuenta los desarrollos de la enfermedad que implican un tratamiento agudo con la preparación farmacéutica. Además, también implica que se puede establecer un plan de terapia sin tener en cuenta los desarrollos de la enfermedad que implican un tratamiento agudo con la preparación farmacéutica.
- La preparación farmacéutica se usa para conseguir un alivio o prevención aguda (es decir, inmediata) de los síntomas de una enfermedad correspondiente. Estos síntomas, por ejemplo, incluyen dolor y/o disnea en el caso de una enfermedad cardiovascular, y el alivio o la prevención aguda de los síntomas se logró mediante la vasodilatación y el alivio del dolor y/o disnea resultante.
- En el contexto de la presente invención, el término "intermitentemente" también quiere decir que la preparación farmacéutica no se administra de forma continua, por ejemplo, mediante infusión intravenosa a largo plazo o con la ayuda de una bomba implantada que suministra constantemente la preparación farmacéutica al sujeto. Por el contrario, este término también quiere decir que hay un intervalo entre dos administraciones de la preparación farmacéutica, y que la preparación farmacéutica se administra varias veces, por ejemplo, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12 o 16 veces al día.
- Como apreciará la persona experta, una administración de la preparación farmacéutica puede incluir una administración en una o más formas de dosificación, por ejemplo, descargas (inhalaciones) en caso de una pulverización. Por ejemplo, una administración puede incluir la administración de una a tres descargas (inhalaciones).
- En cuanto al plan de administración, la persona experta apreciará que hay muchas formas de conseguir esta administración intermitente. Por ejemplo, es posible administrar la preparación farmacéutica por lo menos una vez al día y por lo menos un día a la semana durante por lo menos dos semanas. Sin embargo, es igualmente posible administrar la preparación farmacéutica durante solo una semana si la preparación farmacéutica se administra varias veces durante esta semana.
- Preferentemente, la preparación farmacéutica se administra una vez, dos veces o tres veces al día, en la que es aún más preferido que el período de tiempo entre dos administraciones de la preparación farmacéutica es por lo menos 4 horas, en particular 8 horas, en particular por lo menos 10 horas o 12 horas.
- Aunque es posible, no es necesario que los períodos de tiempo entre dos administraciones de las preparaciones farmacéuticas sean los mismos. Por el contrario, se prefiere que estos períodos de tiempo difieran, dependiendo del plan de administración individual.

En una realización, la preparación farmacéutica se administra por lo menos un día a la semana. Sin embargo, la preparación farmacéutica también se puede administrar en 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días a la semana. En una realización especialmente preferida, la preparación farmacéutica se administra por lo menos 3 o 4 días a la semana.

5 Según la invención, es posible administrar la preparación farmacéutica durante un período de varias semanas o meses. Esto es particularmente preferido para inducir la arteriogénesis eficientemente, aunque también es posible una administración más corta de una de dos semanas.

En una realización, la preparación farmacéutica se administra durante 2 a 8 semanas. Igualmente, se prefiere administrar la preparación farmacéutica durante de 3 a 6, de 3 a 8, de 3 a 10 o de 4 a 8, de 4 a 10 o de 4 a 12 semanas. Estos números son solo ejemplos y pueden variar según el plan individual del sujeto.

10 En una realización, la preparación farmacéutica se toma por lo menos una vez a la semana durante por lo menos 8 semanas, en particular durante por lo menos 12 semanas.

En una realización preferida adicional, la preparación farmacéutica se toma no más de 6, 8 o 12 meses. Sin embargo, también es posible tomar la preparación farmacéutica durante 2, 3 o incluso más años. Además, también es posible que la preparación farmacéutica se administre durante décadas o incluso durante toda la vida del sujeto.

15 En el contexto de tales administraciones a largo plazo, se prefiere que la preparación farmacéutica se administre una o dos veces por semana o por lo menos una o dos veces por semana.

Se ha descrito anteriormente que una estimulación exógena de fuerzas de cizalladura pulsátiles en un individuo puede dar como resultado arteriogénesis. Además, se ha descrito cómo se pueden medir las fuerzas de cizalladura pulsátiles (WO 2010/072416).

20 En consecuencia, en una realización preferida, la preparación farmacéutica se administra junto con una estimulación exógena de las fuerzas de cizalladura pulsátiles en la arteria.

En una realización preferida adicional, la preparación farmacéutica se administra cuando el sujeto está en reposo.

25 Con respecto a dicha realización de la invención, la preparación farmacéutica se debe administrar de forma que esté activa en el cuerpo del sujeto cuando se aplica la estimulación exógena. En este contexto, activa quiere decir que la liberación de NO aún no ha finalizado o que el NO liberado de la sustancia activa GTN todavía está presente y activo. Dependiendo de la semivida fisiológica de la sustancia activa en el sujeto y de su formulación, la persona experta será capaz de determinar cuándo se debe administrar la preparación farmacéutica al sujeto con el fin de asegurar que sea activa tras la estimulación exógena.

30 En el caso de GTN, la semivida y su persistencia en el cuerpo del sujeto se ha estudiado intensamente, por ejemplo, después de la aplicación intravenosa o sublingual, en la que está de 2 a 5 minutos en el plasma sanguíneo, véase, por ejemplo, Armstrong P. W. et al., *Circulation*, 1979, 59: 585-588 o Armstrong P. W. et al., *Circulation*, 1980, 62: 160-166.

En general, la semivida del GTN en el plasma sanguíneo es de 2 a 5 minutos.

35 Se debe entender que, en el contexto de la presente invención, el término "semivida" se refiere a la semivida y/o al tiempo de semivida del GTN en el cuerpo del sujeto, en particular en el plasma sanguíneo del sujeto.

En una realización, la preparación farmacéutica se administra en el período de tiempo desde 30 minutos antes del inicio de la estimulación exógena hasta 30 minutos después de la terminación de la estimulación exógena.

40 Más preferentemente, la preparación farmacéutica se administra en el período de tiempo desde 15 minutos, preferentemente 5 minutos, más preferentemente 2 minutos antes de la estimulación exógena hasta 30, preferentemente 15, más preferentemente 5 minutos después del inicio de la estimulación exógena.

En una realización preferida adicional, la preparación farmacéutica se administra una vez al día, cinco veces a la semana durante 6 semanas 2-5 minutos antes de la estimulación exógena.

45 La estimulación exógena de las fuerzas de cizalladura pulsátiles se puede conseguir de cualquier modo conocido. Esto incluye una estimulación con la ayuda de medicamentos como medicamentos que aumentan la presión sanguínea.

En una realización preferida, dicha estimulación se consigue mediante ejercicio físico o la aplicación de una fuerza endógena al vaso arterial.

50 Según la invención, la expresión "ejercicio físico" quiere decir cualquier entrenamiento del sujeto, que incluye, pero no se limita a, entrenamiento en salas de ejercicio, trote, marcha, marcha nórdica, natación, baile, ciclismo y senderismo. La persona experta apreciará que cualquier ejercicio será útil en el contexto de la invención, con tal de que se realice junto con la administración de la preparación farmacéutica. Preferentemente, la expresión "ejercicio

físico" no incluye movimientos de rutina no prescritos sin supervisar, como la marcha relajada o el trabajo doméstico.

5 Como se discutió anteriormente, se ha encontrado en el contexto de la presente invención que la preparación farmacéutica es capaz de inducir la arteriogénesis. Esto permite no solo el tratamiento de una enfermedad ya existente. Más bien, en el contexto de la presente invención, también es posible prevenir la enfermedad. En consecuencia, en una realización preferida de la presente invención, el método tiene como objetivo la prevención de dicha insuficiencia arterial.

10 En el contexto de la presente invención, ha sido posible reducir el tamaño del infarto en el caso de una oclusión ya existente. Además, ha sido posible reducir las arritmias en los sujetos. En consecuencia, en una realización preferida de la presente invención, el método da como resultado una reducción del tamaño del infarto, arritmias reducidas o en una elevación del segmento ST disminuida.

La preparación farmacéutica se puede administrar de cualquier modo apropiado para que se pueda incorporar en el sujeto. Este incluye una administración oral, parenteral o intravenosa, así como la inyección de la preparación farmacéutica en el cuerpo del sujeto, pero también una administración a una membrana mucosa o la piel del sujeto.

15 En una realización más preferida de la presente invención, la preparación farmacéutica se administra oralmente o sublingualmente.

En una realización preferida de la presente invención, la preparación farmacéutica se administra tópicamente, lingualmente, sublingualmente, por inhalación, bucalmente, mucosalmente, transmucosalmente u oromucosalmente, dérmicamente o cutáneamente, transdérmicamente o percutáneamente.

20 El término "mucosalmente" según la presente invención quiere decir que la preparación farmacéutica se aplica sobre la mucosa.

El término "transmucosalmente" según la presente invención quiere decir que la preparación farmacéutica, especialmente la sustancia activa, pasa la mucosa.

El término "oromucosalmente" según la presente invención quiere decir que la preparación farmacéutica, especialmente la sustancia activa, se aplica en la cavidad oral y/o la garganta.

25 Los términos "dérmicamente" y "cutáneamente" así como "transdérmicamente" y "percutáneamente" se pueden usar indistintamente en la presente invención.

30 En el caso de una administración lingual, sublingual u oromucosal, se prefiere que la preparación farmacéutica se administre con la ayuda de una pulverización, disolución pulverizable o inyectable, o mediante un dispositivo inhalador, del que la preparación farmacéutica se puede inhalar y adsorber fácilmente. Igualmente, se prefiere que la preparación farmacéutica se administre en forma de un gas o aerosol inhalable.

La preparación farmacéutica se puede formular de cualquier manera apropiada para los modos de administración mencionados anteriormente. Tales formulaciones son conocidas por la persona experta en la técnica e incluyen la formulación en tampones apropiados o en forma de un aerosol.

35 En una realización preferida, la preparación farmacéutica se formula de una manera que permite una liberación rápida de la sustancia activa de la formulación. Esto incluye, por ejemplo, formulaciones que no retienen la sustancia activa durante un período de tiempo más largo, pero que liberan la sustancia activa en, por ejemplo, 45, 30 o 15, 10, 5 minutos o 1 minuto.

En la invención, se prefiere que el sujeto al que se aplica la preparación farmacéutica sea un sujeto humano.

40 En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a una preparación farmacéutica para uso en un método para la prevención o el tratamiento de una insuficiencia arterial, en la que la preparación farmacéutica se administra en una cantidad y manera efectiva para la inducción de arteriogénesis.

Todas las características y realizaciones preferidas discutidas anteriormente para el método de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial también se aplican a la preparación farmacéutica para uso según este aspecto de la invención.

45 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un método de supresión de efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que es antiarteriogénica o que inhibe la arteriogénesis, que comprende administrar a un sujeto sometido a dicho tratamiento una preparación farmacéutica en una cantidad y manera efectiva para la inducción de la arteriogénesis.

50 En una realización preferida, dicho tratamiento es un tratamiento con ácido acetilsalicílico (ASA), antagonistas de glicoproteína IIb/IIIa, o etanercept (receptor alfa del factor de necrosis tumoral soluble).

Se sabe en la técnica que el ASA es un inhibidor de la arteriogénesis (Singer E. et al., Vasa, 2006, 35 (3): 174-177).

- En consecuencia, el tratamiento con ASA de enfermedades cardiovasculares, aunque es una terapia estándar, tiene importantes efectos secundarios y desventajas. En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que las preparaciones farmacéuticas son capaces de superar los efectos negativos asociados a un tratamiento con ASA (véase la sección de ejemplos). En base a estos hallazgos, los inventores concluyen que también los efectos secundarios negativos asociados a otros medicamentos como los antagonistas de la glicoproteína IIb/IIIa o el tratamiento con etanercept también pueden verse disminuidos.
- Además, la presente invención también se refiere a una preparación farmacéutica para uso en un método de supresión de efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que sea antiarteriogénica o que inhiba la arteriogénesis, en la que la preparación farmacéutica se administra a un sujeto sometido a dicho tratamiento en una cantidad y manera efectivas para la inducción de la arteriogénesis.
- En una realización preferida, dicho tratamiento es un tratamiento con ácido acetilsalicílico (ASA), antagonistas de glicoproteína IIb/IIIa, o etanercept (receptor alfa del factor de necrosis tumoral soluble).
- Todas las características y realizaciones preferidas discutidas anteriormente para el método de tratar o prevenir una insuficiencia arterial también se aplican al método para la supresión de efectos negativos según este aspecto de la invención o a dicha preparación farmacéutica para uso según este aspecto de la invención.
- En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un método para la prevención o tratamiento de una arritmia cardíaca, en el que una preparación farmacéutica según la invención se administra a un sujeto en una cantidad y manera eficaz para el tratamiento de dicha arritmia cardíaca. Además, la presente invención también se refiere a una preparación farmacéutica para uso en un método para la prevención o el tratamiento de una arritmia cardíaca, en la que la preparación farmacéutica se administra a un sujeto en una cantidad y manera eficaz para el tratamiento de dicha arritmia cardíaca.
- En el contexto de la presente invención, los inventores han encontrado que las preparaciones farmacéuticas según la invención son capaces de prevenir y tratar arritmias.
- Todas las características y realizaciones definidas anteriormente con respecto a la preparación farmacéutica y su formulación y administración también se aplican a este método o preparación farmacéutica para uso según la invención.
- La presente invención también se refiere a un método para promover la circulación colateral que comprende la etapa de exponer a un sujeto a una cantidad terapéuticamente efectiva de una preparación farmacéutica según la invención en la que la cantidad terapéuticamente efectiva de la preparación farmacéutica promueve la arteriogénesis lo suficiente para aumentar la circulación colateral en un estado fisiológico o patológico.
- La expresión "circulación colateral" describe la circulación de la sangre a través de los denominados vasos colaterales. Estos vasos son pequeñas arteriolas, que forman parte de una red que interconecta territorios de perfusión de ramas arteriales. En el caso de que la arteria principal en sí no sea capaz de suministrar suficientemente a un tejido, por ejemplo, debido a una oclusión arterial, estos vasos colaterales son reclutados y se pueden transformar en arterias de gran conductancia, para circunvalar el sitio de una oclusión arterial y/o compensar el flujo sanguíneo a territorios isquémicos suministrados por la arteria o arteria insuficiente. En el contexto de la presente invención, la promoción de la circulación colateral ocurre vía arteriogénesis.
- Según la invención, la expresión "estado fisiológico" indica cualquier estado del sujeto que no está relacionado con ninguna enfermedad.
- Según la invención, la expresión "estado patológico" denota cualquier estado del sujeto que está relacionado con una enfermedad.
- Preferentemente, el sujeto padece una insuficiencia arterial.
- Todas las características y realizaciones preferidas discutidas anteriormente para el método de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial también se aplican al método para promover la circulación colateral.
- Con respecto a los aspectos definidos anteriormente en los que la preparación farmacéutica se administra de una manera suficiente para inducir la arteriogénesis, esta manera es preferentemente de manera intermitente como se define anteriormente.
- Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de una preparación farmacéutica, que comprende mezclar los componentes (a) y (c1) en agua o mezclar los componentes (a) y (c2) en agua.
- El procedimiento de producción de las preparaciones farmacéuticas según esta invención es directo. Generalmente, todos los compuestos solubles en agua se disuelven en agua, por lo que puede ser apropiado disolver el polímero soluble en agua en una primera etapa separada. A continuación, se agrega el GTN, preferentemente en forma de un concentrado, y la mezcla se agita vigorosamente hasta que se forma una disolución homogénea.

Otro aspecto de la presente invención es un kit que comprende la preparación farmacéutica según la invención, en la que el kit es una pulverización. Este kit puede consistir en recipiente y bomba de pulverización. El recipiente puede ser una botella de vidrio o plástico.

Las realizaciones preferidas de las preparaciones farmacéuticas y para preparar las mismas son:

5 En una primera realización, de 2 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 se disuelve en agua. A continuación, se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y se agita durante 15 minutos. Opcionalmente, se añade una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo.

10 En una segunda realización, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol y de 2 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 se disuelven en agua. A continuación, se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y se agita durante 15 minutos. Opcionalmente, se añade una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo.

15 En otra realización, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol y de 1,5 a 5 por ciento en peso de tiloxapol se disuelven en agua. A continuación, se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y se agita durante 15 minutos. Opcionalmente, se añade una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo.

En otra realización más, se disuelve en agua 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 1 a 5 por ciento en peso de tiloxapol y de 1 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407. A continuación, se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y se agita durante 15 minutos. Opcionalmente, se añade una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo.

20 En una realización, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol y de 1 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 se disuelven en agua. A continuación, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) se diluye en de 10 a 20 por ciento en peso de etanol. Ambas disoluciones se combinan y agitan durante 15 minutos. Alternativamente, el xilitol se puede omitir.

25 Se puede conseguir una preparación similar libre de propilenglicol disolviendo de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol y de 1 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 en agua, añadiendo de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en etanol (5%) y de 8 a 16 por ciento en peso etanol, y agitando durante 15 minutos.

30 En una realización adicional, de 2 a 10 por ciento en peso de poloxámero 407 se disuelve en agua. A continuación, se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y se agita durante 15 minutos. Opcionalmente, se añade una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante.

En otra realización, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol y de 2 a 10 por ciento en peso de poloxámero 407 se disuelven en agua. A continuación, se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y se agita durante 15 minutos. Opcionalmente, se añade una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante.

35 En una realización, de 1,5 a 7 por ciento en peso de tiloxapol se disuelve en agua. A continuación se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s) y la mezcla se agita durante 15 minutos.

40 En otra realización, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol y de 1,5 a 7 por ciento en peso de tiloxapol se disuelven en agua. A continuación, se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y se agita durante 15 minutos. Opcionalmente, se añade una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

45 En una realización adicional, de 1 a 5 por ciento en peso de tiloxapol y de 1 al 10 por ciento en peso de poloxámero 407 se disuelven en agua. A continuación se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s) y la mezcla se agita durante 15 minutos.

50 En otra realización más, se disuelve en agua de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 1 a 5 por ciento en peso de tiloxapol y de 1 a 10 por ciento en peso de poloxámero 407. A continuación, se añade de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y se agita durante 15 minutos. Opcionalmente, se añade una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

En general, las fórmulas que contienen xilitol son más apropiadas para la aplicación oral o sublingual, mientras que las que no contienen ningún alcohol de azúcar son mejores para la aplicación dérmica.

Una primera realización comprende de 2 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 4 a 12 por

ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

5 Una segunda realización comprende de 2 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

10 Otra realización comprende de 1,5 a 5 por ciento en peso de tiloxapol disuelto en agua, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

Otra realización más comprende de 1 a 5 por ciento en peso de tiloxapol y de 1 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

15 Realizaciones adicionales comprenden de 1 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y de 10 a 20 por ciento en peso de etanol. Alternativamente, el xilitol se puede omitir.

20 Una realización adicional comprende de 2 a 10 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

Otra realización comprende de 2 a 10 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08 % de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

25 Una realización comprende de 1,5 a 7 por ciento en peso de tiloxapol disuelto en agua, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% ácido benzoico como conservante(s).

30 Otra realización comprende de 1,5 a 7 por ciento en peso de tiloxapol disuelto en agua, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

35 Una realización adicional comprende de 1 a 5 por ciento en peso de tiloxapol y de 1 a 10 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

Otra realización más comprende de 1 a 5 por ciento en peso de tiloxapol y de 1 a 10 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y opcionalmente una mezcla de 0,02% de 4-hidroxibenzoato de propilo y 0,08% de 4-hidroxibenzoato de metilo o 0,1% de ácido benzoico como conservante(s).

40 Realizaciones adicionales comprenden de 1 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en propilenglicol (5%) y de 10 a 20 por ciento en peso de etanol. Alternativamente, el xilitol se puede omitir.

45 Las realizaciones libres de propilenglicol comprenden de 30 a 50 por ciento en peso de xilitol y de 1 a 5 por ciento en peso de poloxámero 407 disuelto en agua, de 4 a 12 por ciento en peso de GTN en etanol (5%) y de 8 a 16 por ciento en peso de etanol. También en estas realizaciones, el xilitol se puede omitir preferentemente cuando la preparación se diseña para una aplicación dérmica.

La invención se describe además mediante las figuras y ejemplos adjuntos, que están destinados a ilustrar, pero no a limitar, la invención.

#### Breve descripción de las figuras

50 Figura 1: vaso de precipitados que comprende una composición según el ejemplo comparativo 1.

Figura 2: vaso de precipitados que comprende una composición según el ejemplo comparativo 3.

Figura 3: cuso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (= oclusión final para inducir infarto) de

grupos de control de 5 y 10 días. El gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8: 0,104 \pm 0,016$  mV; el gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS SHAM PBS,  $n = 8: 0,134 \pm 0,034$  mV; el gráfico de ECG en gris claro indica 10 DÍAS RIP PBS,  $n = 7: 0,055 \pm 0,033$  mV; el gráfico de ECG en gris oscuro indica 10 DÍAS SHAM PBS,  $n = 7: 0,124 \pm 0,039$  mV.

- 5 El ECG se registró 90 minutos después de la FPO. El curso de la elevación del segmento ST por latido en los primeros 1.200 latidos no reveló diferencias entre los grupos de 5 y 10 DÍAS SHAM y el grupo 5 DÍAS RIP. Solo en el grupo de 10 DÍAS RIP se observó una menor elevación del segmento ST.

Figura 4: elevación del segmento ST de grupos de control de 5 y 10 días. La columna 1 muestra la elevación del segmento ST del grupo 5 DÍAS SHAM PBS; la columna 2 muestra la elevación del segmento ST del grupo 5 DÍAS RIP PBS; la columna 3 muestra la elevación del segmento ST del grupo 10 DÍAS SHAM PBS; la columna 4 muestra la elevación del segmento ST del grupo 10 DÍAS RIP PBS; la desviación estándar se indica en barras de error; el asterisco indica significativo comparado con 10 DÍAS SHAM PBS (valor de  $p$  nominal  $<0,025$ ); el doble asterisco indica significativo en comparación con 5 DÍAS RIP PBS (valor de  $p$  nominal  $<0,025$ ).

El diagrama muestra la media del máximo de elevación del segmento ST por grupo. Después de 5 días no había diferencias significativas entre RIP y SHAM. Después de 10 días en el grupo de RIP, el máximo de elevación del segmento ST era significativamente menor en comparación con el SHAM (\*) y el control 5 DÍAS RIP (\*\*) (\*, \*\* valor de  $p$  nominal  $<0,025$ ).

Figura 5: curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (módulo 1: operación simulada sin RIP). El gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS SHAM PBS,  $n = 8: 0,134 \pm 0,034$  mV; el gráfico de ECG en gris claro indica 5 DÍAS SHAM NTG,  $n = 7: 0,124 \pm 0,058$  mV; el gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO,  $n = 6: 0,131 \pm 0,043$  mV.

El curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO no reveló diferencias entre el control de SHAM y los grupos tratados después de 5 días.

Figura 6: elevación del segmento ST (módulo 1: operación simulada sin RIP). La columna 1 muestra 5 DÍAS SHAM PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS SHAM NTG-Placebo; la columna 3 muestra 5 DÍAS SHAM NTG; la desviación estándar está indicada por barras de error.

El diagrama muestra la media del máximo de elevación del segmento ST por grupo. No se encontró diferencia en el máximo de elevación del segmento ST entre el control de SHAM y los grupos tratados.

Figura 7: curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (módulo 2: NO intermitente (NTG)). El gráfico de ECG en gris claro indica 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8: 0,104 \pm 0,016$  mV; el gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS NTG-PLACEBO,  $n = 6: 0,096 \pm 0,061$  mV; el gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS RIP NTG,  $n = 7: 0,052 \pm 0,030$  mV.

Comparado con el tratamiento de control con PBS o NTG-Placebo, se detectó un curso de elevación del segmento ST inferior después del tratamiento con NTG 5 días después del RIP.

- 35 En el grupo de NTG ("5 DÍAS RIP NTG") la elevación del segmento ST se reduce significativamente en comparación con el grupo de PBS y NTG-Placebo. No es significativa entre PBS y el grupo NTG-PLACEBO.

Figura 8: elevación del segmento ST (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS NTG-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG; la desviación estándar está indicada por barras de error, el asterisco indica una disminución significativa de la elevación del segmento ST en comparación con PBS y el grupo NTG-Placebo (valor de  $p$  nominal  $<0,017$ ).

El diagrama muestra la media del máximo de elevación del segmento ST por grupo. Después del tratamiento con NTG, el máximo de elevación del segmento ST disminuyó significativamente en comparación con el tratamiento con PBS y NTG-Placebo 5 días después del RIP (valor de  $p$  nominal  $<0,017$ ).

Figura 9: curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). El gráfico de ECG en gris claro indica 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8: 0,104 \pm 0,016$  mV; el gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS ISDN-PLACEBO,  $n = 7: 0,110 \pm 0,069$  mV; el gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS RIP ISDN,  $n = 7: 0,062 \pm 0,027$  mV.

Comparado con el tratamiento de control con PBS o ISDN-Placebo, se detectó un curso de elevación del segmento ST inferior después del tratamiento con ISDN 5 días después del RIP.

- 50 La elevación del segmento ST en el grupo de ISDN ("5 DÍAS RIP ISDN") se reduce en comparación con el grupo de PBS, pero no es significativa así como entre el PBS y el grupo ISDN-PLACEBO.

Figura 10: elevación del segmento ST (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP

PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ISDN-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP ISDN; la desviación estándar está indicada por barras de error.

5 El diagrama muestra la media del máximo de elevación del segmento ST por grupo. Después del tratamiento con ISDN, el máximo de elevación del segmento ST no disminuyó significativamente en comparación con el tratamiento con PBS e ISDN-Placebo 5 días después del RIP.

10 Figura 11: Curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (módulo 4: NO intermitente más ASA). El gráfico de ECG en gris claro indica 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ ;  $0,104 \pm 0,016$  mV; el gráfico de ECG en gris medio indica 5 DÍAS RIP ASA + PBS,  $n = 7$ ;  $0,138 \pm 0,098$  mV; el gráfico de ECG en gris oscuro indica 5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO,  $n = 6$ ;  $0,144 \pm 0,091$  mV; el gráfico de ECG en negro indica 5 DÍAS RIP NTG + ASA,  $n = 7$ ;  $0,088 \pm 0,071$  mV.

El tratamiento con NTG + ASA se comparó con PBS + ASA, NTG-Placebo + ASA y PBS. En general, todas las curvas se superponen en el mismo intervalo.

15 La elevación del segmento ST en el grupo tratado con PBS y ASA es mayor en comparación con el grupo de control de PBS, pero no es significativa, así como entre el grupo ASA + NTG-PLACEBO. En el grupo ASA + NTG, la elevación del segmento ST disminuye en comparación con el grupo tratado con ASA y PBS.

Figura 12: elevación del segmento ST (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP PBS + ASA; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO; la columna 4 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO + ASA; la columna 5 muestra 5 DÍAS RIP NTG; la columna 6 muestra 5 DÍAS RIP NTG + ASA; la desviación estándar está indicada por barras de error.

20 El diagrama muestra la media del máximo de elevación del segmento ST por grupo. El tratamiento con NTG + ASA se comparó con PBS + ASA, NTG-Placebo + ASA y PBS. Además, todos los grupos de ASA (PBS + ASA, NTG-Placebo + ASA, NTG + ASA) se compararon con sus controles (PBS, NTG-Placebo, NTG). No se detectaron diferencias significativas.

25 Figura 13: arritmias durante la FPO (módulo 1: operación simulada (sin el RIP)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS SHAM PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 DÍAS SHAM NTG.

Según la clasificación de Lown, todos los grupos sham se clasificaron predominantemente en el grado IVb.

30 En el grupo "5 DÍAS SHAM PBS", el 87,5% de las ratas tienen arritmias de clase IVb y el 12,5% de clase IVa. En el grupo "5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO" el 83,3% tienen arritmias IVb y el 16,7% de clase IVa y en el grupo "5 DÍAS SHAM NTG" el 85,7% tienen arritmias IVb y el 14,3% arritmias de clase IIIa.

Figura 14: arritmias durante la FPO (módulo 2: NO intermitente (NTG)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG.

35 Mientras que las arritmias en ambos grupos de control, PBS y NTG-Placebo, se clasificaron predominantemente en el grado IVb, el grupo tratado con NTG se clasificó más a menudo en el grado 0.

En el grupo "5 DÍAS RIP PBS", el 75,0% de las ratas tienen arritmias de clase IVb, el 12,5% de IVa y el 12,5% de clase 0. Con respecto al grupo "5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO", el 50,0% de las ratas mostraron arritmias de clase IVb, el 16,7% de IVa, el 16,7% de clase IIIb y el 16,7% de clase 0. Curiosamente, el grupo "5 DÍAS RIP NTG" muestra un 42,9% de arritmias de clase IVb y un 57,1% de arritmias de clase 0.

40 FIGURA 15: arritmias durante la FPO (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). El número de columnas se da en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ISDN-PLACEBO; La columna 3 muestra 5 DÍAS RIP ISDN.

En todos los grupos, las arritmias similarmente se clasificaron más a menudo en el grado IVb.

45 En el grupo "5 DÍAS ISDN-PLACEBO", el 57,1% de las ratas tienen arritmias de clase IVb, el 14,3% de clase IVa y el 28,6% de clase IIIb. El grupo "5 DÍAS RIP ISDN" muestra arritmias menos graves con 57,1% de clase IVb, 28,6% de clase IIIb y 14,3% de arritmias de clase 0.

Figura 16: arritmias durante la FPO (módulo 4: NO intermitente más ASA). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP ASA + PBS; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP ASA + NTG.

50 Las arritmias similarmente se clasificaron más en el grado IVb en todos los grupos.

En el grupo "5 DÍAS RIP ASA + PBS", en el grupo tratado con ASA + NTG-PLACEBO y en el grupo "5 DÍAS RIP

ASA + NTG" el 83,3% de las ratas tienen arritmias de clase IVb y el 16,7% de clase IIIa.

5 Figura 17: puntuación de VPB. La columna 1 muestra SHAM PBS; la columna 2 muestra SHAM NTG-Placebo; la columna 3 muestra SHAM NTG; la columna 4 muestra RIP PBS; la columna 5 muestra RIP NTG-Placebo; la columna 6 muestra RIP NTG; la columna 7 muestra RIP PBS; la columna 8 muestra RIP ISDN; la columna 9 muestra RIP ISDN; la columna 10 muestra RIP PBS + ASA; la columna 11 muestra RIP NTG-Placebo + ASA; la columna 12 muestra RIP NTG + ASA.

Con respecto al porcentaje de cada grado Lown de cada grupo, se puede determinar una puntuación de VBP. Cuantos más animales muestran un grado más alto, más alta es la puntuación de VBP.

10 La puntuación de VBP muestra el porcentaje de cada grado de Lown de cada grupo. Los grupos SHAM tienen puntuaciones de VBP más altas. Comparado con el grupo con un protocolo isquémico (grupo de control, tratado con PBS), más ratas muestran arritmias graves. El tratamiento con NTG reveló arritmias reducidas y, en consecuencia, una menor puntuación de VPB. La puntuación de VPB en grupos tratados con ASA solo o NTG + ASA es mayor en comparación con los controles (tratados con PBS).

15 Figura 18: tamaño del infarto de los grupos de control de 5 días y 10 días. La columna 1 muestra 5 DÍAS SHAM PBS,  $n = 8$ :  $13,36 \pm 5,22\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $11,05 \pm 5,12\%$ ; la columna 3 muestra 10 DÍAS SHAM PBS,  $n = 7$ :  $13,71 \pm 6,04\%$ ; la columna 4 muestra 10 DÍAS RIP PBS,  $n = 6$ :  $6,57 \pm 3,26\%$ ; la desviación estándar está indicada por barras de error; el asterisco indica significativo comparado con los SHAM (valor de  $p$  nominal  $< 0,013$ ).

20 Después de un protocolo isquémico de 5 días, no hay un tamaño de infarto significativamente más pequeño medible, pero después de un RIP de 10 días, el área infartada se reduce significativamente en comparación con los SHAM (valor de  $p$  nominal  $< 0,013$ ).

Después de 90 minutos de oclusión de la LAD y 20 minutos de reperfusión, se analizó el tamaño del infarto.

El grupo "10 DÍAS RIP PBS" tiene un área de infarto significativamente menor en comparación con el grupo "10 DÍAS SHAM PBS". No es significativo entre ambos grupos de 5 DÍAS.

25 Figura 19: tamaño del infarto (módulo 1: operación simulada (sin el RIP)). La columna 1 muestra 5 DÍAS SHAM PBS,  $n = 8$ :  $13,36 \pm 5,22\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO,  $n = 6$ :  $14,21 \pm 5,79\%$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS SHAM NTG,  $n = 7$ :  $14,09 \pm 5,18\%$ ; la desviación estándar está indicada por barras de error.

El tamaño del infarto no muestra diferencia entre los grupos SHAM.

No es significativo entre los tres grupos SHAM.

30 Figura 20: tamaño del infarto (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $11,05 \pm 5,12\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS NTG-PLACEBO:  $n = 6$ :  $9,80 \pm 6,79\%$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG,  $n = 7$ :  $3,61 \pm 2,08\%$ ; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica significativo en comparación con 5 DÍAS RIP PBS (valor de  $p$  nominal  $< 0,017$ ).

35 El tamaño del infarto es significativamente más pequeño después del tratamiento con NTG en comparación con los controles (tratados con PBS) (valor de  $p$  nominal  $< 0,033$ ).

Comparado con "5 DÍAS RIP PBS", se observa un área de infarto significativamente más pequeña en el grupo "5 DÍAS RIP NTG". No es significativo entre PBS y el grupo NTG-PLACEBO.

40 Figura 21: tamaño del infarto (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $11,05 \pm 5,12\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS ISDN-PLACEBO,  $n = 6$ :  $9,97 \pm 3,65\%$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP ISDN,  $n = 7$ :  $7,59 \pm 4,38\%$ ; la desviación estándar está indicada por barras de error.

El tamaño del infarto después del tratamiento con ISDN es más pequeño en comparación con los controles (tratados con PBS o ISDN-Placebo), pero no es significativo.

El tamaño del infarto en el grupo de ISDN ("5 DÍAS RIP ISDN") es más pequeño en comparación con el grupo de PBS, así como el grupo ISDN-PLACEBO.

45 Figura 22: tamaño del infarto (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $11,05 \pm 5,12\%$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP ASA + PBS,  $n = 6$ :  $12,51 \pm 3,05\%$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS NTG-PLACEBO:  $n = 6$ :  $9,80 \pm 6,79\%$ ; la columna 4 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO + ASA,  $n = 6$ :  $13,92 \pm 1,71\%$ ; la columna 5 muestra 5 DÍAS RIP NTG,  $n = 7$ :  $3,61 \pm 2,08\%$ ; la columna 6 muestra 5 DÍAS RIP NTG + ASA,  $n = 6$ :  $13,00 \pm 3,82\%$ ; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica significativo en comparación con 5 días de RIP NTG (valor de  $p$  nominal  $< 0,017$ ).

El tamaño del infarto después del tratamiento con NTG más ASA aumenta significativamente en comparación con el

tratamiento con NTG solo (valor de p nominal <0,017).

El tamaño del infarto en el grupo tratado con ASA ("5 DÍAS ASA + PBS") aumenta mínimamente en comparación con el grupo de control de PBS, así como con el grupo ASA + NTG-PLACEBO. No hay diferencia entre el grupo ASA + NTG y el grupo tratado con ASS y PBS. Sin embargo, el área de infarto en el grupo de NTG es significativamente más pequeña en comparación con el grupo ASA + NTG.

Figura 23: tinción con TTC. Las imágenes muestran cortes de tres niveles. El tejido infartado se tiñe de un blanco pálido dado que carece de las enzimas con las que reacciona el TTC. De este modo, las áreas de necrosis son claramente discernibles y cuantificables.

Figura 24: diámetros colaterales de la ROI (módulo 1: operación simulada (sin el RIP)). La columna 1 muestra 5 DÍAS SHAM PBS, n = 3:  $82,7 \pm 3,7 \mu\text{m}$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO, n = 3:  $89,6 \mu\text{m} \pm 10,6 \mu\text{m}$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS SHAM NTG, n = 3:  $86,8 \pm 9,0 \mu\text{m}$ ; la desviación estándar está indicada por barras de error.

No hay crecimiento de colaterales y no hay diferencias medibles entre los grupos SHAM.

No son significativos entre los tres grupos SHAM.

Figura 25: diámetros colaterales de la ROI (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ; la columna 2 muestra 5 DIAS RIP NTG-PLACEBO: n = 3:  $127,0 \pm 12,1 \mu\text{m}$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG, n = 3:  $158,4 \pm 9,2 \mu\text{m}$ ; la desviación estándar está indicada por barras de error, el asterisco indica significativo en comparación con 5 DÍAS RIP NTG (valor de p nominal <0,033). Los diámetros de las colaterales se incrementan significativamente mediante el tratamiento con NTG en comparación con los controles (tratados con PBS o NTG-Placebo) (valor de p nominal <0,033).

Comparado con el "5 DÍAS RIP PBS", los diámetros de las colaterales en la ROI en el grupo "5 DÍAS RIP NTG" se incrementan significativamente. No hay diferencia entre PBS y el grupo NTG-PLACEBO.

Figura 26: diámetros colaterales de la ROI (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS ISDN-PLACEBO, n = 3:  $133,0 \pm 11,5 \mu\text{m}$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP ISDN, n = 3:  $148,2 \pm 11,3 \mu\text{m}$ ; la desviación estándar está indicada por barras de error.

No se pueden medir diferencias en el diámetro de las colaterales después del tratamiento con ISDN o ISDN-Placebo.

Los diámetros de las colaterales en el grupo de ISDN ("5 DÍAS RIP ISDN") se mejoran en comparación con el grupo de PBS, así como en comparación con el grupo de ISDN-PLACEBO.

Figura 27: diámetro colateral de la ROI (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra 5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ; la columna 2 muestra 5 DÍAS RIP PBS + ASA, n = 3:  $102,5 \pm 8,0 \mu\text{m}$ ; la columna 3 muestra 5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO: n = 3:  $127,0 \pm 12,1 \mu\text{m}$ ; la columna 4 muestra 5 DÍAS NTG-PLACEBO + ASA, n = 3:  $97,1 \pm 8,6 \mu\text{m}$ ; la columna 5 muestra 5 DÍAS RIP NTG, n = 3:  $158,4 \pm 9,2 \mu\text{m}$ ; la columna 6 muestra 5 DÍAS RIP ASA + NTG, n = 3:  $124,4 \pm 5,6 \mu\text{m}$ ; la desviación estándar está indicada por barras de error, un asterisco indica significativo en comparación con 5 DÍAS RIP PBS (valor de p nominal <0,039); el doble asterisco indica significativo en comparación con 5 DÍAS RIP ASA + NTG (valor de p nominal <0,039).

Los diámetros de las colaterales son significativamente más pequeños después del tratamiento con ASA en comparación con el control (tratado con PBS) (valor de p nominal <0,039). Un tratamiento adicional con NTG abolió el efecto inhibitor de ASA, pero el tratamiento con NTG solo muestra un diámetro significativamente mayor en comparación con el tratamiento con NTG + ASA (\*\* significativo comparado con 5 DÍAS RIP ASA + NTG, valor de p nominal <0,039).

Los diámetros en el grupo tratado con PBS y ASA son significativamente más pequeños en comparación con el grupo de control de PBS, pero no es significativo en comparación con el grupo ASA + NTG-PLACEBO. En ASA + NTG, los diámetros aumentan significativamente en comparación con el grupo tratado con PBS y ASA.

Figura 28: imágenes de MicroCT de la "ROI": (A) "5 DÍAS SHAM PBS"; (B) "5 DÍAS SHAM NTG"; (C) "5 DÍAS RIP ISDN"; (D) "5 DÍAS RIP PBS"; (E) "5 DÍAS RIP NTG"; (F) "5 DÍAS RIP ASA + PBS"; (G) "5 DÍAS RIP ASA + NTG".

Las imágenes muestran el crecimiento del diámetro colateral en la región de interés por el protocolo isquémico tratado con PBS (D), NTG (E) o ISDN (C) en comparación con SHAM tratado con PBS (A) o NTG (B). La inhibición del crecimiento colateral por tratamiento con ASA (F) se elimina parcialmente mediante tratamiento adicional con NTG (G).

## Ejemplos

Ejemplo 1

## ES 2 651 492 T3

Se disuelven 450,2 g de xilitol y 45,0 g de tiloxapol en 937,6 g de agua purificada. Se añaden 67,8 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Se forma una disolución transparente que es estable tanto a temperatura ambiente como a 4°C. La viscosidad de esta disolución es de 10 mPa \* s.

- 5 Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,225% de GTN usando esta fórmula.

### Ejemplo 2

Se disuelven 45,0 g de xilitol y 3,0 g de poloxámero 407 en 46,0 g de agua purificada. Se añaden 5,99 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Se forma una disolución transparente que es estable tanto a temperatura ambiente como a 4°C. La viscosidad de esta disolución es de 17 mPa \* s.

10

Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,30% de GTN usando esta fórmula.

### Ejemplo 3

Se disuelven 35,5 g de xilitol y 1,0 g de poloxámero 407 en 44,0 g de agua purificada. Se disuelven 5,01 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol en 15,0 g de etanol. Ambas disoluciones se mezclan y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Se forma una disolución transparente que es estable tanto a temperatura ambiente como a 4°C. La viscosidad de esta disolución es de 12 mPa \* s.

15

Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,25% de GTN usando esta fórmula.

### Ejemplo 4

Se disuelven 35,1 g de xilitol y 1,0 g de tiloxapol en 44,0 g de agua purificada. Se disuelven 5,06 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol en 15,0 g de etanol. Ambas disoluciones se mezclan y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Se forma una disolución transparente que es estable tanto a temperatura ambiente como a 4°C. La viscosidad de esta disolución es de 10 mPa \* s.

20

Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,25% de GTN usando esta fórmula.

### Ejemplo 5

Se disuelven 1.125,0 g de xilitol y 125,1 g de poloxámero 407 en 1.100 g de agua purificada. Se añaden 150,0 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. El valor del pH de la disolución se ajusta a pH 4,5 con ácido láctico. Se forma una disolución transparente que es estable tanto a temperatura ambiente como a 4°C. Además, esta disolución se puede congelar a -20°C y da como resultado una disolución transparente después de la descongelación. La viscosidad de esta disolución es de 25 mPa \* s.

25

Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,30% de GTN usando esta fórmula. La estabilidad a largo plazo de esta disolución es excelente, como se puede ver en la siguiente tabla:

30

Estabilidad a 40°C	Inicio	3 meses	6 meses
Ensayo de GTN (HPLC)	0,296%	0,293%	0,287%

Estabilidad a 25°C	Inicio	6 meses	12
Ensayo de GTN (HPLC)	0,296%	0,293%	0,294%

### Ejemplo 9

Se disuelven 30,0 g de poloxámero 407 en 1.169 g de agua purificada. Se añaden 75,8 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y 225 g de etanol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. El valor del pH de la disolución se ajusta a pH 4,5 con ácido láctico. Se forma una disolución transparente que es estable a temperatura ambiente y a 4°C. Además, esta disolución se puede congelar a -20°C y da como resultado una disolución transparente después de la descongelación.

35

Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,25% de GTN usando esta fórmula. La estabilidad a largo plazo de esta disolución es excelente, como se puede ver en la siguiente tabla:

40

Estabilidad a 40°C	Inicio	3 meses	6 meses
Ensayo de GTN (HPLC)	0,252%	0,252%	0,245%

Estabilidad a 25°C	Inicio	6 meses
Ensayo de GTN (HPLC)	0,252%	0,246%

Ejemplo 10

- 5 Se disuelven 5,5 g de tiloxapol en 84,4 g de agua purificada. Se añaden 10,0 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y 0,10 g de ácido benzoico y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. El valor del pH de la disolución se ajusta a pH 4,1 con ácido láctico. Se forma una disolución transparente que es estable a temperatura ambiente y a 4°C. Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,5% de GTN usando esta fórmula.

Ejemplo 11

- 10 Se disuelven 0,10 g de ácido benzoico, 6,0 g de tiloxapol y 3,0 g de poloxámero en 50,8 g de agua purificada. Se añaden 30,0 g de xilitol y se disuelven mediante agitación. Se añaden 10,0 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. El valor del pH de la disolución se ajusta a pH 4,0 con ácido láctico. Se forma una disolución transparente que es estable a temperatura ambiente y a 4°C. Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,5% de GTN usando esta fórmula.

Ejemplo 12

- 15 Se disuelven 450,2 g de xilitol, 45,0 g de tiloxapol y 3,76 g de benzoato de sodio en 929,6 g de agua purificada. Se añaden 67,8 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. El valor del pH se ajusta a pH 4,0 con ácido láctico. Se forma una disolución transparente que es estable tanto a temperatura ambiente como a 4°C. La viscosidad de esta disolución es de 10 mPa \* s.

Se concluye que se puede preparar una disolución al 0,22% de GTN usando esta fórmula.

- 20 La estabilidad a largo plazo de esta disolución es excelente, como se puede ver en la siguiente tabla:

Estabilidad a 40°C	Inicio	3 meses	6 meses
Ensayo de GTN (HPLC)	0,219%	0,220%	0,221%

Estabilidad a 25°C	Inicio	6 meses	12
Ensayo de GTN (HPLC)	0,219%	0,222%	0,228%

Ejemplo 13

- 25 Se disuelven 10,1 g de tiloxapol en 158,0 g de agua purificada. Se añaden y se mezclan 20,0 g de una disolución al 5% de GTN en etanol y 11,6 g de etanol. El valor del pH se ajusta a pH 4,0 con ácido láctico. La mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Se forma una disolución transparente que es estable tanto a temperatura ambiente como a 4°C.

Se concluye que una se puede preparar disolución al 0,50% de GTN usando esta fórmula.

- 30 Ejemplo comparativo 1

Se disuelven 30,0 g de xilitol en 65,5 g de agua purificada. Se añaden 4,51 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Inmediatamente después de la producción, se observan gotas de GTN en el fondo del vaso de precipitados de vidrio (Figura 1).

Se concluye que no se puede preparar una disolución al 0,225% de GTN de esta manera.

- 35 Ejemplo Comparativo 2

Se disuelven 30,7 g de xilitol y 1,0 g de tiloxapol en 64,5 g de agua purificada. Se añaden 4,52 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Inmediatamente después de la producción, la disolución es turbia. Después de tres días de almacenamiento a temperatura ambiente, se observa una fase turbia en el fondo del vial de vidrio y una fase transparente superior.

- 5 Se concluye que el 1% de tiloxapol no es suficiente para disolver el 0,225% de GTN en esta fórmula.

Ejemplo comparativo 3

Se disuelven 45,0 g de xilitol en 49,0 g de agua purificada. Se añaden 6,03 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Inmediatamente después de la producción, se observan gotas de GTN en el fondo del vaso de precipitados de vidrio (Figura 2).

- 10 Se concluye que no se puede preparar una disolución de 0,30% de GTN de esta manera.

Ejemplo comparativo 4

Se disuelven 45,1 g de xilitol y 1,5 g de poloxámero 407 en 47,5 g de agua purificada. Se añaden 6,01 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Inmediatamente después de la producción, la disolución es ligeramente turbia. Después de tres días de almacenamiento a temperatura ambiente, se observa una fase turbia en el fondo del vial de vidrio y una fase opalescente superior.

- 15 Se concluye que 1,5% de poloxámero no es suficiente para disolver 0,30% de GTN en esta fórmula.

Se concluye que 1,5% de poloxámero no es suficiente para disolver 0,30% de GTN en esta fórmula.

Ejemplo comparativo 5

Se disuelven 35,0 g de xilitol en 45,0 g de agua purificada. Se disuelven 5,00 g de una disolución al 5% de GTN en propilenglicol en 15,0 g de etanol. Ambas disoluciones se mezclan y la mezcla se agita intensamente durante 15 minutos. Inmediatamente después de la producción, la mezcla es muy turbia, pero visualmente homogénea. Después de 3 días de almacenamiento a 5°C, se separan gotas de GTN de la disolución y se observan en el fondo del vial de vidrio.

- 20

Sorprendentemente, el exceso de 60 veces de etanol en comparación con la cantidad de GTN no es suficiente para producir una disolución estable. Se concluye que no se puede preparar una disolución de 0,25% de GTN de esta manera.

- 25

Los ejemplos demuestran claramente que solo se obtiene una disolución homogénea en presencia del polímero soluble en agua. Esto también es cierto, si se usa etanol como un conservante. Incluso si el etanol está presente en una concentración de 20 por ciento en peso, esta cantidad de etanol no es suficiente para solubilizar el GTN sin un polímero soluble en agua. Para la seguridad del paciente, se requiere que no se produzca separación de fases o acumulación de la sustancia activa durante el almacenamiento a temperaturas más bajas (por ejemplo, fuera de la casa en invierno). El GTN tiene una tendencia a acumularse en el fondo de la botella. El tubo de inmersión de un dispositivo de pulverización succionaría esta parte de la disolución primero y un paciente podría sufrir una sobredosis grave en este caso.

- 30

Ejemplo 6

- 35 Este ejemplo ha sido tomado del documento PCT/EP2013/061131 y se incluye aquí para demostrar las capacidades proarteriogénicas del GTN. Dado que el GTN es el componente activo de la composición farmacéutica de la invención, se concluye que la composición farmacéutica de la invención también es capaz de inducir arteriogénesis.

## Estudio preclínico

### 1. Introducción

- 40 Un mecanismo importante de arteriogénesis es la inducción del esfuerzo de cizalladura a través de las arterias colaterales reclutadas.

El NO juega un papel fundamental en este escenario, dado que regula la capacidad vasodilatadora de la arteria, así como los aspectos de proliferación terapéutica en las células del músculo liso de las arterias colaterales.

- 45 Aquí evaluamos los efectos de la pulverización Nitrolingual Akut® (G. Pohl-Boskamp GmbH & Co.KG, Hohenlockstedt, Alemania; nombre de la marca comercial estadounidense Nitrolingual® Pumpspray) en un modelo único de arteriogénesis de infarto no de miocardio. El crecimiento colateral en este modelo se induce vía la oclusión repetitiva de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAL). El tamaño del infarto en estos animales se midió como el punto final al final del experimento. De este modo, ninguna interferencia entre el infarto de miocardio y la arteriogénesis ha debilitado el experimento. Además, evaluamos el efecto del ácido acetilsalicílico (ASA) en este modelo de oclusión coronaria repetitiva como posible inhibidor de la arteriogénesis. Evaluamos si una aplicación concomitante de NO (uso intermitente de nitroglicerina) puede compensar este efecto negativo del ASA.
- 50

## 2. Materiales y métodos

### 1.1. Preparación de animales

Se usan ratas macho Sprague-Dawley (300 g de peso corporal al comienzo del estudio, n = 182) para experimentos. Para la cirugía (día 0), las ratas se premedicaron (ketamina 50 mg/ml más xilacina 4 mg/ml intraperitoneal) y se intubaron. La intubación oral (tubos de polietileno I4-G) se realiza bajo la observación directa de las cuerdas vocales con un otoscopio. La anestesia general se introduce y mantiene por la inhalación de isoflurano (de 1,0% a 2,0%, con oxígeno al 100%). La temperatura del cuerpo se controla a 37°C mediante una mesa de calentamiento eléctrica. La cirugía se realiza usando una técnica aséptica. El animal se coloca inicialmente sobre su lado dorsal y se fijan los clips cutáneos. Con un amplificador diferencial BioAmp acoplado a un sistema de adquisición de datos PowerLab (AD Instruments), los parámetros de ECG (frecuencia cardíaca) se monitorizan y registran durante la cirugía. El corazón se expone por toracotomía izquierda. Se implanta un lazo ocluser mini-neumático (véase la sección del lazo ocluser mini-neumático para obtener más detalles) alrededor de la arteria coronaria izquierda anterior descendente (LAD) de media a próxima. La confirmación de que el ocluser es funcional, es decir, que produce isquemia miocárdica, se determina inicialmente mediante la observación del blanqueado y la hipocinesia del ventrículo izquierdo (LV) y por la observación del electrocardiograma (elevación del ST) durante el inflado. Las ratas se dividen aleatoriamente en 4 módulos terapéuticos:

Módulo 1: operación simulada

Módulo 2: NO intermitente (nitroglicerina)

Módulo 3: NO continuo (preparación de liberación retardada de dinitrato de isosorbida)

20 Módulo 4: NO intermitente más ASA

Después de la instrumentación y las medidas, se cierra el pecho con presión respiratoria final positiva, y se evacúa el aire de la cavidad torácica. Los ocluseres se tunelizan subcutáneamente y se exteriorizan entre las escápulas. Estos catéteres están protegidos por una espiral de acero inoxidable conectada a un anillo que se fija subcutáneamente entre las escápulas. Después de la cirugía, se administran analgésicos (buprenorfina 0,05 mg/kg SC) y antibióticos (enrofloxacin 10 mg/kg SC). Las ratas se observan en una jaula de recuperación durante 2 horas y a continuación se transfieren a la instalación de cuidado de los animales donde se monitorizan continuamente por los técnicos. En el postoperatorio, se administra buprenorfina (0,5 mg/kg SC) para el dolor dos veces al día durante 8 y 13 respectivamente. El tercer día después de la cirugía (día 3), se inicia el protocolo de isquemia. Después de 5 y 10 días respectivamente (solo en el módulo 1A y 2A) del protocolo experimental (día 8 y día 13 respectivamente), las ratas son anestesiadas y el pecho se abre mediante una toracotomía media. En el grupo de micro-CT, los corazones se extirpan inmediatamente. Para la detección final del tamaño del infarto, la LAD se ocluye permanentemente (oclusión permanente final, FPO) y el tamaño del infarto se mide mediante tinción con TTC.

### 1.2. Lazo ocluser mini-neumático para corazón de rata

Se usa un lazo ocluser mini-neumático que consiste en un miniglobo, tubo de funda, sutura y catéter. El globo (7 mm de largo) está hecho de una membrana de látex blando y es lo suficientemente plegable para proporcionar una fuerza física insignificante en los vasos coronarios durante el vaciado del globo. El globo está montado dentro de una funda para paraguas (3,2 o 4,8 mm de diámetro, 12 mm de longitud, protege el globo de la infiltración fibrosa). Se pasa prolene (5-0) alrededor de la LAD y se une a la funda, asegurando el ocluser al corazón, de modo que la isquemia de miocardio se produce por inflado del balón. El volumen de inflado es pequeño (de 0,2 a 0,25 ml de aire), pero la oclusión se produce por dos acciones físicas: "pinzar" la LAD hacia arriba/afuera y comprimir la LAD por medio del globo/funda inflada. El globo está conectado a un catéter (PE-50) que se exterioriza. El llenado y vaciado del globo se controlan desde fuera de la jaula de la rata.

### 1.3. Medidas de los parámetros del ECG

En los cuatro módulos (1-4) al principio (día 3) y al final (día 8 y 13 respectivamente) del protocolo experimental (RIP) la oclusión coronaria se realiza durante 40 segundos (equivalente a una oclusión en el RIP; véase página 6) y durante la FPO durante 90 minutos (día 8 y 13 respectivamente) se miden los parámetros de ECG para examinar la frecuencia cardíaca y la elevación del ST. Además, se determinan las arritmias que se producen durante la FPO. Según la clasificación de Lown, cada animal muestra un cierto grado. Cuanto más alto es un grado, más graves son las arritmias. Para ilustrar la gravedad media de un grupo completo más descriptivo, se determina una puntuación de VPB. Para eso, cada grado de Lown se refiere a un factor particular (grado 0 = factor 0, grado I = factor 1, grado II = factor 2, grado IIIa = factor 3, grado IIIb = factor 4, grado VIa = factor 5, grado VIb = factor 6 y grado V = factor 7). Cada grupo tiene un porcentaje diferente de animales que presentan cada grado. El porcentaje de los grados respectivos se multiplica por el factor apropiado que conduce a resultados individuales que a continuación se suman a la puntuación de VPB de todo el grupo. En consecuencia, un grupo de animales con grados de Lown más altos tiene una puntuación de VPB correlativamente alta.

### 1.4. Obtención de imágenes microvasculares coronarias con micro-CT

Además, se usa Micro-CT como un punto final adicional para obtener imágenes colaterales. Un grupo de ratas (3 ratas de cada grupo en cada módulo, un total de 36 ratas) se prepara para la visualización vascular coronaria vía micro-CT. La circulación coronaria se llena con medio de contraste (microfil amarillo) mediante la modificación de la metodología para el estudio de micro-CT en ratas. La viscosidad del medio de contraste permite que se llene hasta el nivel arteriolar coronario con un llenado nulo o mínimo de los capilares. El corazón extirpado se canula inmediatamente por medio de una cánula aórtica, y la circulación coronaria se perfunde retrógradamente a 85 mm de Hg. Se usa un perfundido (disolución salina a de 25°C a 27°C con procaína al 2%) para evitar la contracción metabólica del miocardio y dilatar al máximo la vasculatura coronaria. Se inserta tubo de polietileno en el ventrículo izquierdo vía un apéndice izquierdo a través de la válvula mitral para descargar el ventrículo izquierdo. Se inyecta medio de contraste calentado (42°C) a una presión de 85 mmHg durante 3 minutos mientras se monitoriza la presión de perfusión. El corazón se enfría por inmersión en disolución salina fría (de 0°C a 4°C) hasta que el (microfil amarillo) se solidifique. A continuación, se retira el corazón y se fija en disolución de paraformaldehído al 4% (4°C) durante la noche. Los corazones enteros se usan para la obtención de imágenes de micro-CT del crecimiento colateral coronario. La vasculatura coronaria se visualiza con micro-CT. En resumen, todo el corazón se escanea en incrementos de 1° alrededor de 360° alrededor de su eje longitudinal de ápice a base. La resolución espacial seleccionada en el presente estudio tiene un tamaño de vóxel de 18 \* 18 \* 18 mm<sup>3</sup> para enfocar en el tamaño de los vasos colaterales y para minimizar las señales de los vasos más pequeños. Finalmente, los datos de CT se reconstruyen en forma de imágenes 3D. El principal propósito de estas imágenes es establecer la presencia o ausencia de conexiones anastomóticas arterial-arterial. Los vasos colaterales, es decir, las conexiones anastomóticas arterial-arterial, se miden por observadores independientes para los grupos. La morfología de la red arterial colateral se analiza con el software Amira 5.2.2 (Visage Imaging, Berlín, Alemania).

#### 1.5. Protocolo experimental

El protocolo de isquemia repetitiva (RIP) se introduce mediante el inflado automatizado del ocluser usando el siguiente protocolo: 40 segundos de oclusión cada 20 minutos durante 2 horas y 20 minutos, seguidos de un período de "reposo" (desinflado) durante 5 horas y 40 minutos. Este conjunto de 8 horas se repite 3 veces al día durante 5 y 10 días respectivamente (solo en el módulo 1A y 2A). La LAD se ocluye automáticamente mediante inflado o desinflado a distancia a través del catéter. En ratas sham (véase módulo 1), se implanta el globo, pero no se aplica el RIP. Las ratas bajo el protocolo RI se dividen aleatoriamente en los tres módulos 2, 3 y 4.

#### 1.6. Detección del tamaño del infarto

El tamaño del infarto se detecta mediante tinción con TTC después de la oclusión permanente final. Después de 5 y 10 días respectivamente (solo en el módulo 1A y 2A) del protocolo experimental, el ocluser se infla permanentemente durante 90 minutos. El tamaño del infarto se mide mediante tinción con TTC (n = 10/grupo). Por lo tanto, las ratas se anestesian y se someten de nuevo al registro del ECG para confirmar la oclusión (elevación del ST) y para calcular los parámetros del ECG y los números de arritmias. En animales sin colaterales, la oclusión coronaria causa deterioro de la hemodinámica sistémica y arritmias, que incluyen contracciones ventriculares prematuras, taquicardia ventricular y fibrilación ventricular; en animales con colaterales bien desarrollados, no se observan tales efectos adversos. Los parámetros del ECG se registraron y analizaron usando un programa computarizado (LabChart 7).

El pecho se abre por toracotomía media. El corazón se extirpa inmediatamente y se secciona desde el ápice hasta la base en cortes transversales de 2 mm de grosor paralelos al surco auriculoventricular. Los cortes se incuban con 0,09 mol/l de tampón de fosfato de sodio que contiene 1,0% de cloruro de trifeníltetrazolio (TTC) y 8% de dextrano durante 20 minutos a 37°C. Los cortes se fijan en formaldehído al 10% y a continuación se fotografían con una cámara digital montada en un estereomicroscopio. El tamaño infartado se cuantifica usando un programa planimétrico computarizado (Adobe Photoshop). El área infartada se identifica como el tejido TTC negativo y se expresa como un porcentaje del área del ventrículo izquierdo (LV).

#### 1.7. Detalles con respecto a los compuestos de ensayo

ASA Merck Chemicals

NO intermitente (NTG) disolución de nitroglicerina; Nitrolingual Akut® Spray, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Alemania

NO continuo (ISDN retard) pelets de dinitrato de isosorbida retard; Nitrosorbon® retard; G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Alemania

Compuesto vehículo para NO intermitente (NTG-Placebo) disolución placebo de Nitrolingual Akut® Spray, Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Alemania

Compuesto vehículo de NO continuo (ISDN-Placebo) pelets neutros de Nitrosorbon® retard; G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Alemania

Tampón de control PBS (disolución salina tamponada con fosfato)

1.8. Ruta, punto de tiempo y concentración de suministro a animales

Toda la medicación (ASA y NTG e ISDN retard) se administra por adelantado a un tiempo de oclusión siguiente del dispositivo. El tampón de control (PBS) se administra de la misma manera antes de las dos primeras oclusiones.

NO intermitente (NTG)

- 5 Se prepara una nueva disolución de ensayo todas las mañanas a las ocho en punto. La disolución se toma desde los viales mediante jeringas.

El NO intermitente (NTG) se administra dos veces al día con un intervalo de tiempo de 8 horas.

- 10 Debido a la instrumentación crónica de las ratas y para evitar un estrés adicional, el NTG se administra por aplicación vía bucal de 50 µl de la disolución de ensayo preparada diariamente que contiene 17,37 µg de nitroglicerina (equivalente a una dosis humana de 0,8 mg, calculada con la fórmula  $\text{dosis/animal [mg]} = \text{peso corporal metabólico [kg} \cdot 0,75] \cdot \text{dosis humana [mg/kg]} \cdot \text{factor de recálculo [kg/kg} \cdot 0,75]$  según Loscher, W., Ungemach, FR, Kroker, R., 1998, Blackwell Science, 3ª edición) se administra por aplicación bucal en el módulo 1, 2 y 4. El punto de tiempo de aplicación es directamente por adelantado al inflado del globo a las 9 a.m. y a las 5 p.m., de este modo con efectos máximos en las arterias colaterales reclutadas.

- 15 Esta concentración se toma de los viales de reacción mencionados anteriormente justo antes de la administración.

La disolución de compuesto vehículo sirvió como una disolución patrón para la preparación de la disolución de ensayo.

Compuesto vehículo para NO intermitente (NTG-Placebo)

El compuesto vehículo se administra de una manera idéntica al NO intermitente.

- 20 NO continuo (ISDN retard)

El medicamento para la administración prolongada de NO (preparación de dinitrato de isosorbida de liberación retardada = nitrato de acción prolongada ISDN) se administra en forma de pellets de liberación retardada 1x por día.

- 25 Para la preparación de liberación retardada se elige ISDN en una dosis de 2,6 mg de ISDN/rata. Por lo tanto, los pellets de 13 mg se suspenden en 0,5 ml de agua potable y se aplican por sonda nasogástrica a las 9 a.m. todas las mañanas (equivalente a una dosis humana de 2 mg/kg/peso corporal).

Compuesto vehículo para NO continuo (ISDN-Placebo)

El compuesto vehículo se administra de una manera idéntica al NO continuo.

NO intermitente más ASA (Ácido acetilsalicílico)

- 30 Todas las mañanas a las 9,30 a.m. se administran 2,22 mg de ASA por rata disueltos en 0,5 ml de agua potable por sonda nasogástrica directamente en el estómago.

La concentración de ASA de 2,22 mg de ASA por rata (6,34 mg/kg de peso corporal) se correlaciona con la dosis humana de 100 mg/día.

1.9. Animales y grupos

10 ratas por grupo (FPO = oclusión permanente final para inducir infartos)

- 35 Grupo d: 3 animales adicionales se tratan con la misma medicación y el mismo esquema de ligación que los grupos a, b y c correspondientes, pero sin FPO. Estos 9 animales por módulo se usan para imágenes de micro-CT.

Módulo 1: operación simulada (sin el RIP):

A. Tampón de control (disolución salina tamponada con fosfato PBS) con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 20

- 40 1. n = 10: "5 DÍAS SHAM PBS"

2. n = 10 "10 DÍAS SHAM PBS"

B. Compuesto vehículo sin NO más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

n = 10: "5 DIAS SHAM NTG-PLACEBO"

C. NTG con FPO funcional para detección del tamaño del infarto

n = 10: "5 DÍAS SHAM NTG"

D. A1.) n=3 A2.) n=3 B) n = 3 C) n=3 para imágenes de micro-CT

n = 12

5 total: n = 52

Módulo 2: NO intermitente:

A. Tampón de control intermitente con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

n = 20

1. n = 10: "5 DÍAS RIP PBS"

10 2. n = 10: "10 DÍAS RIP PBS"

B. Compuesto vehículo intermitente más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

n = 10: "5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO"

C. NTG intermitente con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

n = 10: "5 DÍAS RIP NTG"

15 D. A1.) n=3 A2.) n=3 B) n=3 C) n=3 para imágenes de micro-CT

n = 12

total: n = 52

Módulo 3: NO continuo:

20 A. Tampón de control continuo (agua potable) con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto (n = 10): "5 DÍAS RIP DW"

B. Compuesto vehículo continuo más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n=10: "5 DÍAS RIP ISDN-PLACEBO"

C. NO continuo FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n=10: "5 DÍAS RIP ISDN"

D. A.) n=3 B.) n=3 C.) n=3 para imágenes de micro-CT

25 n = 9

total: n = (39)

Módulo 4: NO Intermitente más ASA:

A. Tampón de control intermitente más ASA con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 10: "5 DÍAS RIP PBS + ASA"

30 B. Compuesto vehículo de NO intermitente más ASA más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n=10: "5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO + ASA"

C. NTG intermitente más ASA con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

n = 10: "5 DÍAS RIP NTG + ASA"

D. A.) n=3 B.) n=3 C.) n=3 para imágenes de micro-CT

35 n = 9

total: n = 39

## 2. Análisis estadístico

Todos los datos se dan como media  $\pm$  SD. Los gráficos se muestran como media  $\pm$  SEM.

Los resultados obtenidos midiendo la elevación del segmento ST, el tamaño del infarto y los diámetros de los vasos se analizan para determinar la significación estadística mediante el uso del paquete de software SPSS 20 (IBM SPSS Statistics, NY, EE.UU.). Se usa ANOVA con una corrección de la tasa de descubrimientos falsos, FDR. Los valores de  $p$  se ajustan para ensayos múltiples usando un procedimiento de FDR para lograr una significancia de  $p \leq 0,05$  para todo el experimento. La FDR tiene en cuenta el número de hipótesis nulas rechazadas y se ha demostrado que aumenta la potencia estadística en comparación con la corrección de Bonferroni.

### 3. Resultados

#### 3.1 Oclusión permanente final

La oclusión de la LAD permitió un estudio prospectivo de la función de los vasos colaterales. Tales vasos pueden proteger el tejido del miocardio con riesgo de isquemia después de la oclusión coronaria.

Al final del protocolo de RI, la oclusión permanente de la LAD se realiza en un subgrupo de todos los grupos y se miden los parámetros del ECG para examinar la elevación del segmento ST y las arritmias ventriculares. Después de 90 minutos de oclusión permanente, se determina el área infartada.

#### 3.2 Análisis del ECG

Las manifestaciones electrocardiográficas de la isquemia iniciada por la oclusión de la LAD son menos pronunciadas cuando los vasos colaterales están presentes.

#### 3.3 Elevación del segmento ST

Durante la oclusión de la LAD hay una correlación inversa entre la magnitud de la elevación del segmento ST y la magnitud del suministro colateral.

La función colateral es un determinante importante de la dirección de la respuesta del segmento ST a la isquemia durante la oclusión coronaria aguda. La elevación reversible del segmento ST durante la oclusión aguda de la LAD se relaciona con una función arterial colateral inapropiada. En pacientes con depresión reversible del segmento ST, la función colateral coronaria parece ser mejor y, en consecuencia, muestra menos resultados de isquemia.

Durante la oclusión de 90 minutos, la elevación del segmento ST en el "10 DÍAS SHAM PBS" es significativamente mayor en comparación con el grupo "10 DÍAS RIP PBS" (10 DÍAS SHAM,  $n = 7$ :  $0,124 \pm 0,039$  mV; 10 DÍAS RIP,  $n = 7$ :  $0,055 \pm 0,033$  mV). Por el contrario, la elevación del segmento ST en "5 DÍAS SHAM PBS" es similar al grupo "5 DÍAS RIP PBS" (5 DÍAS SHAM,  $n = 8$ :  $0,134 \pm 0,034$  mV; 5 DÍAS RIP,  $n = 8$ :  $0,104 \pm 0,016$  mV) (Figuras 3 y 4).

Módulo 1: operación simulada (sin el RIP)

No es significativa entre los tres grupos SHAM (5 DÍAS SHAM PBS,  $n = 8$ :  $0,134 \pm 0,034$  mV; 5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO,  $n = 6$ :  $0,131 \pm 0,043$  mV; 5 DÍAS SHAM NTG,  $n = 7$ :  $0,124 \pm 0,058$  mV) (Figuras 5 y 6).

Módulo 2: NO intermitente (NTG)

En el grupo NTG ("5 DÍAS RIP NTG"), la elevación del ST se reduce significativamente en comparación con el grupo PBS (5 días RIP PBS,  $n = 8$ :  $0,104 \pm 0,016$  mV; 5 días RIP NTG,  $n = 7$ :  $0,052 \pm 0,030$  mV). No es significativa entre el grupo PBS y NTG-PLACEBO (5 DÍAS NTG-PLACEBO:  $n = 6$ ,  $0,096 \pm 0,061$  mV) (Figuras 7 y 8).

Módulo 3: NO continuo (ISDN retard)

La elevación del segmento ST en el grupo de ISDN ("5 DÍAS RIP ISDN") se reduce en comparación con el grupo PBS (5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $0,104 \pm 0,016$  mV; 5 DÍAS RIP ISDN,  $n = 7$ :  $0,062 \pm 0,027$  mV), pero no es significativa así como entre el grupo PBS y el ISDN-PLACEBO (5 DÍAS ISDN-PLACEBO,  $n = 7$ :  $0,110 \pm 0,069$  mV) (Figuras 9 y 10).

Módulo 4: NO Intermitente más ASA

La elevación del segmento ST en el grupo tratado con PBS y ASA es mayor en comparación con el grupo de control PBS (5 DÍAS RIP ASA + PBS,  $n = 7$ :  $0,138 \pm 0,098$  mV; 5 DÍAS RIP PBS,  $n = 8$ :  $0,104 \pm 0,016$  mV), pero no es significativo así como entre el grupo ASA + NTG-PLACEBO (5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO,  $n = 6$ :  $0,144 \pm 0,091$  mV). En el grupo ASA + NTG, la elevación del ST disminuye en comparación con el grupo tratado con ASA y PBS (5 DÍAS RIP NTG + ASA,  $n = 7$ :  $0,088 \pm 0,071$  mV) (Figuras 11 y 12).

#### 3.4. Arritmias ventriculares

La importancia de los latidos prematuros ventriculares (VPBs) es el resultado de su posible asociación con un mayor riesgo de muerte súbita cardíaca. Los VPBs se estratificaron según la clasificación de Lown. Se ha mostrado que un alto grado de Lown predice la mortalidad después del infarto de miocardio agudo.

Grado 0: sin latidos ectópicos ventriculares

Grado I: VPB ocasional y aislado

Grado II: VPB frecuente (> 1/min o 30/h)

Grado III: VPB multiforme

5 (a) VPB

(b) Bigenimus

Grado IV: VPB repetitivo

(a) Pareados

(b) Salvos

10 Grado V: VPB temprano

Módulo 1: operación simulada (sin el RIP)

En el grupo "5 DÍAS SHAM PBS", el 87,5% de las ratas tienen arritmias de clase IVb y el 12,5% de clase IVa. En el grupo "5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO" el 83,3% tienen arritmias IVb y 16,7% de clase IVa y en el grupo "5 DÍAS SHAM NTG" el 85,7% tienen arritmias IVb y el 14,3% arritmias de clase IIIa (Figura 13).

15 Módulo 2: NO intermitente (NTG)

En el grupo "5 DÍAS RIP PBS", el 75,0% de las ratas tienen arritmias de clase IVb, el 12,5% de IVa y el 12,5% de clase 0. Con respecto al grupo "5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO", el 50,0% de las ratas mostraron arritmias de clase IVb, el 16,7% de IVa, el 16,7% de clase IIIb y el 16,7% arritmias de clase 0. Curiosamente, el grupo "5 DIEZ RIP NTG" muestra un 42,9% de arritmias de clase IVb y un 57,1% de arritmias de clase 0 (Figura 14).

20 Módulo 3: NO continuo (ISDN retard)

En el grupo "5 DÍAS ISDN-PLACEBO", el 57,1% de las ratas tienen arritmias de clase IVb, el 14,3% de clase IVa y el 28,6% de clase IIIb. El grupo "5 DÍAS RIP ISDN" muestra arritmias menos graves con el 57,1% de clase IVb, el 28,6% de clase IIIb y el 14,3% arritmias de clase 0 (Figura 15).

Módulo 4: NO Intermitente más ASA

25 En el grupo "5 DÍAS RIP ASA + PBS", en el grupo tratado con ASS + NTG-PLACEBO y en el grupo "5 DÍAS RIP ASS + NTG" el 83,3% de las ratas poseen arritmias de clase IVb y el 16,7% de clase IIIa (Fig. 16).

Con respecto al porcentaje de cada grado Lown de cada grupo, se puede determinar una puntuación de VBP. Cuantos más animales muestran un grado más alto, más alta es la puntuación de VBP (Figura 17).

Figura 19: puntuación de VPB

30

Tabla 1: puntuación de VPB

Grupo	Puntuación de VPB
Módulo 1	
SHAM PBS	5,88
SHAM NTG-PLACEBO	5,83
SHAM NTG	5,71
Módulo 2	
RIP PBS	5,13
RIP NTG-PLACEBO	4,50
RIP NTG	2,57
Módulo 3	
RIP PBS	5,13
RIP ISDN-PLACEBO	5,29
RIP ISDN	4,75
Módulo 4	
RIP ASA + PBS	5,50
RIP ASA + NTG-PLACEBO	5,50
RIP ASA + NTG	5,50

### 3.5. Tamaño del infarto

- 5 Después de 90 minutos de oclusión de la LAD y 20 minutos de reperfusión, se analizó el tamaño del infarto.

El grupo "10 DÍAS RIP PBS" tiene un área de infarto significativamente menor en comparación con el grupo "10 DÍAS SHAM PBS" (10 DÍAS RIP PBS, n = 6:  $6,57 \pm 3,26\%$ ; 10 DÍAS SHAM PBS, n = 7:  $13,71 \pm 6,04\%$ ). No es significativa entre ambos grupos de 5 DÍAS (5 DÍAS SHAM PBS, n = 8:  $13,36 \pm 5,22\%$ , 5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12\%$ ) (Figura 18).

- 10 Módulo 1: operación simulada (sin el RIP)

No es significativa entre los tres grupos SHAM (5 DÍAS SHAM PBS, n = 8:  $13,36 \pm 5,22\%$ ; 5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO, n = 6:  $14,21 \pm 5,79\%$ ; 5 DÍAS SHAM NTG, n = 7:  $14,09 \pm 5,18\%$ ) (Figura 19).

Módulo 2: NO intermitente (NTG)

- 15 Comparado con el "5 DÍAS RIP PBS", se observa un área de infarto significativamente más pequeña en el grupo "5 DÍAS RIP NTG" (5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12\%$ ; 5 DÍAS RIP NTG, n = 7:  $3,61 \pm 2,08\%$ ). No es significativa entre el grupo PBS y NTG-PLACEBO (5 DÍAS NTG-PLACEBO: n = 6,  $9,80 \pm 6,79\%$ ) (Figura 20).

Módulo 3: NO continuo (ISDN retard)

- 20 El tamaño del infarto en el grupo de ISDN ("5 DÍAS RIP ISDN") es más pequeño en comparación con el grupo de PBS (5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12\%$ ; 5 DÍAS RIP ISDN, n = 7:  $7,59 \pm 4,38\%$ ), así como el grupo ISDN-PLACEBO (5 DÍAS ISDN-PLACEBO, n = 6:  $9,97 \pm 3,65\%$ ) (Figura 21).

Módulo 4: NO Intermitente más ASA

El tamaño del infarto en el grupo tratado con ASA ("5 DÍAS ASA + PBS") se incrementa mínimamente en comparación con el grupo de control PBS (5 DÍAS RIP ASA + PBS, n = 6:  $12,51 \pm 3,05\%$ ; 5 DÍAS RIP PBS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12\%$ ), así como el grupo ASA + NTG-PLACEBO (5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO, n = 6:  $13,92 \pm$

1,71%). No hay diferencia entre el grupo ASA + NTG y el grupo tratado con ASA y PBS (Fig. 22). Sin embargo, el área de infarto en el grupo NTG es significativamente más pequeña en comparación con el grupo ASA + NTG (5 DÍAS RIP NTG, n = 7:  $3,61 \pm 2,08\%$ ; 5 DÍAS RIP NTG + ASS, n = 6:  $13,00 \pm 3,82\%$ ) (Figura 23).

### 3.6. Obtención de imágenes microvasculares coronarias con micro-CT

5 Las arterias colaterales son vasos preexistentes que corren paralelos a una arteria principal. En el caso de que la arteria principal esté ocluida, incluso durante un corto período de tiempo (40 segundos durante este RIP), las colaterales asumen el suministro de sangre. Como resultado, las arterias colaterales en este área (ROI, región de interés) comienzan a crecer en longitud (claramente visibles por el patrón de tornillo de corcho) y lo más notablemente en su diámetro. De modo que medimos el diámetro de las colaterales en la ROI.

10 Módulo 1: operación simulada (sin el RIP)

No es significativo entre los tres grupos SHAM (5 DÍAS SHAM PBS, n = 3:  $82,7 \pm 3,7 \mu\text{m}$ ; 5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO, n = 3:  $89,6 \mu\text{m} \pm 10,6 \mu\text{m}$ ; 5 DÍAS SHAM NTG, n = 3:  $86,8 \pm 9,0 \mu\text{m}$ ) (Figuras 24 y 28).

Módulo 2: NO intermitente (NTG)

15 Comparado con el "5 DÍAS RIP PBS", los diámetros de las colaterales en la ROI en el grupo "5 DÍAS RIP NTG" están significativamente incrementados (5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ; 5 DÍAS RIP NTG, n = 3:  $158,4 \pm 9,2 \mu\text{m}$ ). No hay diferencia entre el grupo PBS y NTG-PLACEBO (5 DÍAS NTG-PLACEBO: n = 3;  $127,0 \pm 12,1 \mu\text{m}$ ) (Figuras 25 y 28).

Módulo 3: NO continuo (ISDN retard)

20 El diámetro de las colaterales en el grupo de ISDN ("5 DÍAS RIP ISDN") se ha mejorado en comparación con el grupo de PBS (5 DÍAS RIP PBS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ; 5 DÍAS RIP ISDN, n = 3:  $148,2 \pm 11,3 \mu\text{m}$ ), así como en comparación con el grupo de ISDN-PLACEBO (5 DÍAS ISDN-PLACEBO, n = 3:  $133,0 \pm 11,5 \mu\text{m}$ ) (Figuras 26 y 28).

Módulo 4: NO Intermitente más ASA

25 El diámetro en el grupo tratado con PBS y ASA es significativamente más pequeño en comparación con el grupo de control de PBS (5 DÍAS RIP PBS + ASA, n = 3:  $102,5 \pm 8,0 \mu\text{m}$ ; 5 DÍAS RIP PBS, n = 3;  $129,8 \pm 6,9 \mu\text{m}$ ), pero no es significativo en comparación con el grupo de ASA + NTG-PLACEBO (5 DÍAS NTG-PLACEBO + ASA, n = 3:  $97,1 \pm 8,6 \mu\text{m}$ ). En el grupo ASA + NTG, el diámetro aumentó significativamente en comparación con el grupo tratado con PBS y ASA (5 DÍAS RIP ASA + NTG, n = 3:  $124,4 \pm 5,6 \mu\text{m}$ ) (Figuras 27 y 28).

### 4. Conclusión

30 Examinamos los grupos "10 DÍAS SHAM PBS" y "5 DÍAS SHAM PBS", cada uno sin un RIP (protocolo isquémico repetitivo) y los grupos "10 DÍAS RIP PBS" y "5 DÍAS RIP PBS", cada uno con un RIP de cinco y diez días.

La medida del volumen del infarto después de una oclusión permanente de la LAD de 90 minutos (FPO, oclusión permanente final) reveló áreas infartadas significativamente más pequeñas en el grupo 10 DIAS RIP que en el grupo "10 DÍAS SHAM". Por el contrario, después de un RIP de cinco días, no se hicieron evidentes diferencias en el grupo SHAM y RIP.

35 Además, usamos parámetros de ECG para los exámenes y la evaluación por primera vez. Encontramos que la máxima elevación del ST después de la FPO de la LAD no mostró diferencias cruciales entre "5 DÍAS RIP PBS" y los grupos SHAM, sin embargo. Sin embargo, después de 10 días las elevaciones del ST se redujeron significativamente en el grupo de RIP.

40 Aparte de la medida de elevación del ST durante la FPO, pudimos analizar y evaluar las arritmias de forma diferenciada.

Con base en estos nuevos conocimientos sobre la caracterización del modelo RMI de rata, decidimos usar un RIP de 5 días en el caso de una estimulación esperada de la arteriogénesis.

El grado de mejora de la elevación del ST y el volumen del infarto después de un RIP de 10 días se puede obtener con sustancias proarteriogénicas dentro de un RIP de 5 días, sin embargo.

45 Esto proporciona parámetros adicionales que son capaces de aprobar nuestros resultados de medida de volumen de infarto.

50 La aplicación intermitente de disolución de NTG (dos veces al día en la mucosa bucal) disminuyó las arritmias graves del corazón de la rata durante la FPO en comparación con el grupo de control. Además, el volumen del infarto se reduce en más del 50% después de 90 minutos de FPO en comparación con el grupo de control. Esta reducción en el tamaño del infarto ni siquiera se puede obtener con los controles establecidos en un RIP de 10 días.

Además, un tratamiento con disolución de NTG atenuó significativamente la elevación del ST durante la FPO. Sobre la base de análisis  $\mu$ CT, eran medibles arterias colaterales significativamente aumentadas de tamaño.

5 El tratamiento de las ratas con ISDN retard (una vez al día intragástricamente) también condujo a disminuciones de la elevación del ST durante la FPO, menos arritmias y volúmenes de infarto reducidos. Sin embargo, estas mejoras de los parámetros del infarto son menos claras en comparación con el tratamiento con NTG. Además, no mostraron ningún significancia.

10 En comparación con los controles, el tratamiento con ASA mostró un deterioro de los parámetros del ECG y un aumento de los volúmenes de infarto debido a un deterioro del crecimiento colateral. Estos efectos negativos de ASA en la arteriogénesis ya son conocidos. Curiosamente, pueden ser abolidos en parte por medio de un tratamiento con NTG adicional (dos veces al día en la mucosa bucal). De este modo, los diámetros de las colaterales se ampliaron en la ROI y se mejoraron los parámetros del ECG. Sin embargo, los volúmenes de infarto después de la FPO no mostraron reducción.

Los grupos SHAM no difirieron entre ellos.

Más adelante, no se midieron diferencias entre los grupos de Placebo y sus grupos de control correspondientes.

15 En conclusión, los resultados presentados indican que un tratamiento intermitente con disolución de NTG disminuye el tamaño de un infarto de miocardio inducido experimentalmente. Además, los efectos sobre el ritmo cardíaco pueden mejorar. Estas ideas son de excepcional relevancia para aspectos clínicos.

#### Ejemplo 7

20 Una formulación preferida preparada según las presentes enseñanzas se analizará de la siguiente manera. Los pacientes con un historial médico de angina crónica estable inducida por esfuerzo debido a cardiopatía isquémica estable (enfermedad de la arteria coronaria) recibirán un recipiente con una preparación acuosa que contiene GTN. El recipiente estará equipado con un dispositivo de pulverización de bomba que suministra una dosis medida de 0,4 mg de GTN por pulverización. Los pacientes se autoadministrarán sublingualmente la dosis especificada al inicio de un ataque de angina de pecho. Los pacientes documentarán el tiempo transcurrido desde el tratamiento hasta el alivio de los síntomas de la angina de pecho, en particular dolor de pecho anginoso. Se espera que los pacientes experimenten un alivio agudo inmediato o casi inmediato y vuelvan a un estado libre de síntomas después del tratamiento con la presente invención.

#### Ejemplo 8

30 Una formulación preferida preparada según las presentes enseñanzas se analizará de la siguiente manera. En un ensayo controlado con placebo, los pacientes con un historial médico de interferencias de claudicación debido a enfermedad de la arteria periférica y una distancia máxima de marcha de menos de 250 m recibirán un recipiente con una preparación acuosa que contiene GTN o placebo. El recipiente estará equipado con un dispositivo de pulverización de bomba que suministra una dosis medida de 0,15 mg de GTN por pulverización. Los pacientes se autoadministrarán sublingualmente la dosis especificada 5 minutos antes de un programa de marcha diaria de 45-60 minutos. Los pacientes serán monitorizados en el momento de la inclusión en el estudio (medida de la línea base), así como 8, 12 y 16 semanas después del inicio de la fase intervencionista para documentar sus distancias recorridas máxima y sin dolor (por medio de un ensayo en cinta ergométrica estándar) y su calidad de vida (medida por un cuestionario de calidad de vida) en comparación con su grupo de referencia y placebo. Se espera que los pacientes tratados con principio activo muestren mejoras significativas sobre los pacientes con placebo. Los pacientes que reciben GTN mostrarán un deterioro de la marcha significativamente mejorado con un mayor aumento de las distancias recorridas máximas y sin dolor y una mayor calidad de vida debido a la mayor circulación colateral incrementada inducida por GTN por medio de la arteriogénesis.

**REIVINDICACIONES**

1. Una preparación farmacéutica que comprende:
  - (a) de 0,15 a 3 por ciento en peso de trinitrato de glicerilo,
  - 5 (b) de 40 a 95 por ciento en peso de agua, y
  - (c1) de 2 a 10 por ciento en peso de por lo menos un polímero soluble en agua,
  - o
  - (c2) de 1 a 10 por ciento en peso de por lo menos un polímero soluble en agua y de 5 a 20 por ciento en peso de etanol.
- 10 2. La preparación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el polímero soluble en agua es un polímero soluble en agua no iónico.
3. La preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en tiloxapol y poloxámero.
- 15 4. La preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polímero soluble en agua es tiloxapol, o
 

en la que el polímero soluble en agua es poloxámero 407, o

en la que el polímero soluble en agua es una mezcla de tiloxapol y poloxámero.
- 20 5. La preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la preparación farmacéutica comprende adicionalmente por lo menos un aditivo seleccionado del grupo que consiste en conservantes, componentes de sabor, componentes de aroma, edulcorantes, ácidos y bases y sustancias tampón, preferentemente.
 

en la que la preparación farmacéutica comprende de 0 a 1 por ciento en peso de por lo menos un aditivo.
- 25 6. La preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la preparación farmacéutica comprende además xilitol como componente de sabor.
7. La preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la preparación farmacéutica comprende además de 0,1 a 1 por ciento en peso de por lo menos una sustancia tampón.
8. La preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la preparación farmacéutica comprende además de 0 a 40 por ciento en peso de propilenglicol.
- 30 9. La preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la viscosidad de la preparación farmacéutica es  $\leq 50$  mPa \* s, o
 

en la que la viscosidad de la preparación farmacéutica es  $\leq 30$  mPa \* s.
10. La preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en un método para la prevención o tratamiento de una insuficiencia arterial, preferentemente
 

en la que la insuficiencia arterial se caracteriza por una oclusión parcial o completa de un vaso arterial.
- 35 11. La preparación farmacéutica para uso según la reivindicación 10, en la que la insuficiencia arterial es debida a la deposición de material en los vasos sanguíneos, o en la que la insuficiencia arterial es debida a una compresión externa o interna de una arteria.
- 40 12. La preparación farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 o 11, en la que la insuficiencia arterial es una enfermedad vascular, o en la que la insuficiencia arterial es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en aterosclerosis, disfunción endotelial, disfunción microvascular, enfermedad de un microvaso, enfermedad vasoespástica, una enfermedad isquémica, una enfermedad arterial aguda o crónica adicional, esclerodermia, displasia fibromuscular, trastornos isquémicos diabéticos, una insuficiencia arterial intestinal, una insuficiencia arterial urogenital, una insuficiencia arterial nerviosa o una insuficiencia de la arteria central de la retina, o en la que la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial coronaria, preferentemente
 

45 seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de la arteria coronaria, cardiopatía isquémica, angina de pecho estable e inestable, síndrome coronario agudo, isquemia miocárdica, infarto de miocardio, fallo cardíaco inducido por isquemia, enfermedad microvascular coronaria, en particular enfermedad de los vasos pequeños, o síndrome X

- cardiaco, espasmos coronarios o angina de Prinzmetal, o en la que la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial cerebral intracraneal o extracraneal, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en isquemia cerebral o enfermedades cerebrales isquémicas, enfermedad cerebrovascular isquémica, ataque isquémico transitorio, en particular mini-accidente cerebrovascular o accidente cerebrovascular previo, accidente cerebrovascular, enfermedad de la arteria carótida extracraneal, enfermedad de la arteria vertebral extracraneal o demencia vascular, o
- 5
- en la que la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial periférica, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en síndrome de Raynaud, trastornos de isquemia diabética, que incluyen síndrome de pie isquémico diabético o neuropatía diabética, tromboangeítis obliterante, en particular endangitis obliterante o enfermedad de Buerger, enfermedad vascular inflamatoria, en particular vasculitis, síndromes compartimentales, enfermedad arterial periférica, en particular enfermedad oclusiva arterial periférica, que incluye deterioro de la marcha o distancia recorrida limitada, claudicación o claudicación intermitente, síntomas de extremidades isquémicas, en particular dolor, debilidad, entumecimiento o calambres en los músculos debido a la disminución del flujo sanguíneo, dolor isquémico en reposo, índice de presión braquial del tobillo anormal, lesiones isquémicas de las extremidades, en particular cambio de color de la piel, sequedad de la piel, heridas o úlceras de cicatrización lenta o que no cicatrizan, necrosis, gangrena, isquemia crítica crónica de las extremidades, o la necesidad de amputación de un miembro.
- 10
- 15
13. La preparación farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en la que la preparación farmacéutica se administra oralmente.
- 20
14. La preparación farmacéutica para uso de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que la preparación farmacéutica se administra tópicamente, lingualmente, sublingualmente, inhalativamente, bucalmente, mucosalmente, transmucosalmente u oromucosalmente, dérmicamente o cutáneamente, transdérmicamente o percutáneamente.
15. Un procedimiento para la preparación de una preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende mezclar los componentes (a) y (c1) o (c2) en agua.
- 25
16. Un kit que comprende la preparación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el kit es una pulverización.

**Figura 1**



**Figura 2**

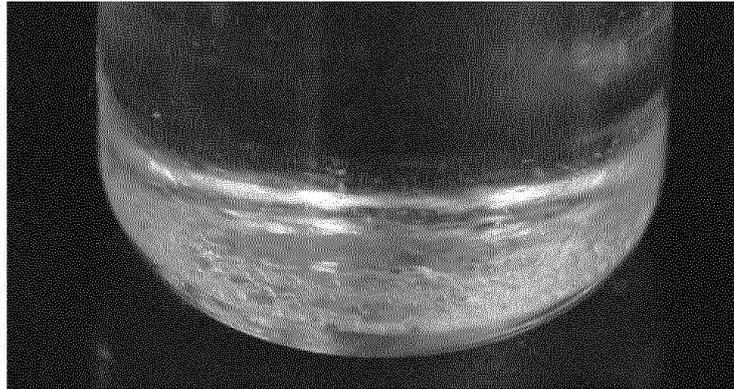


Figura 3

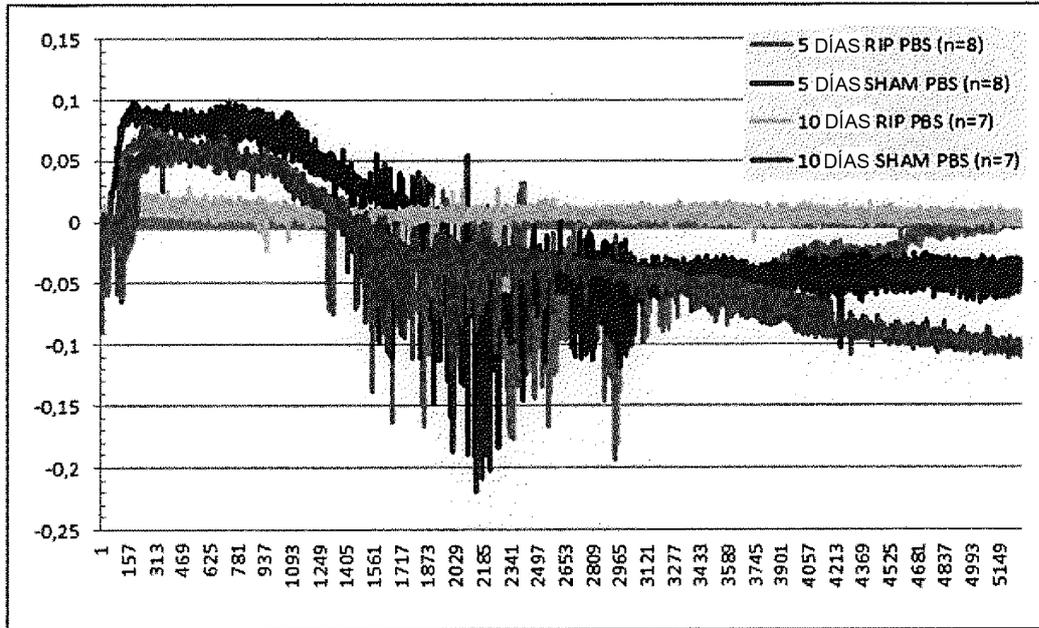


Figura 4

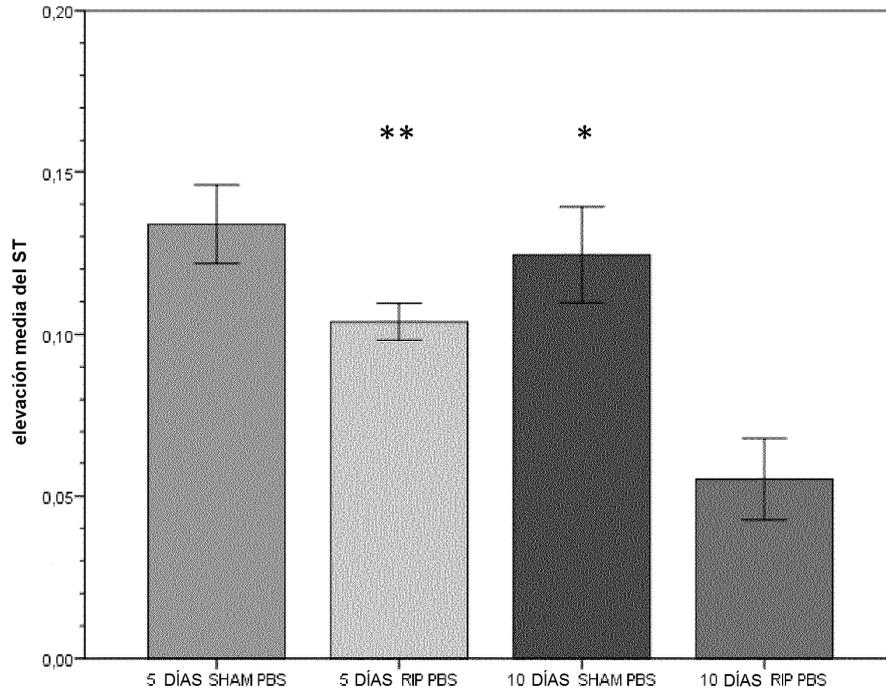


Figura 5

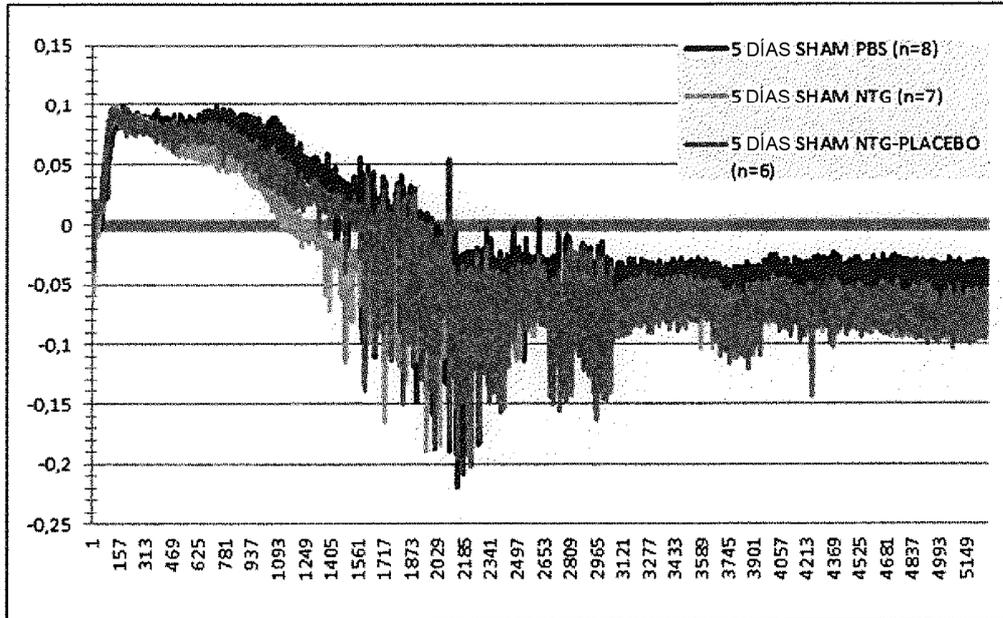


Figura 6

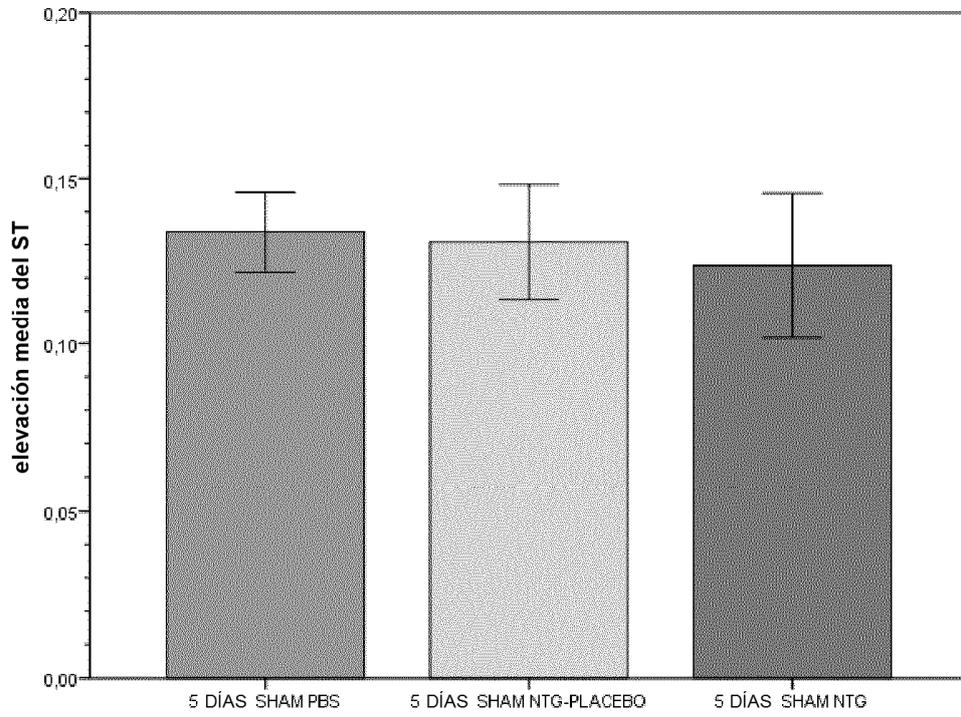


Figura 7

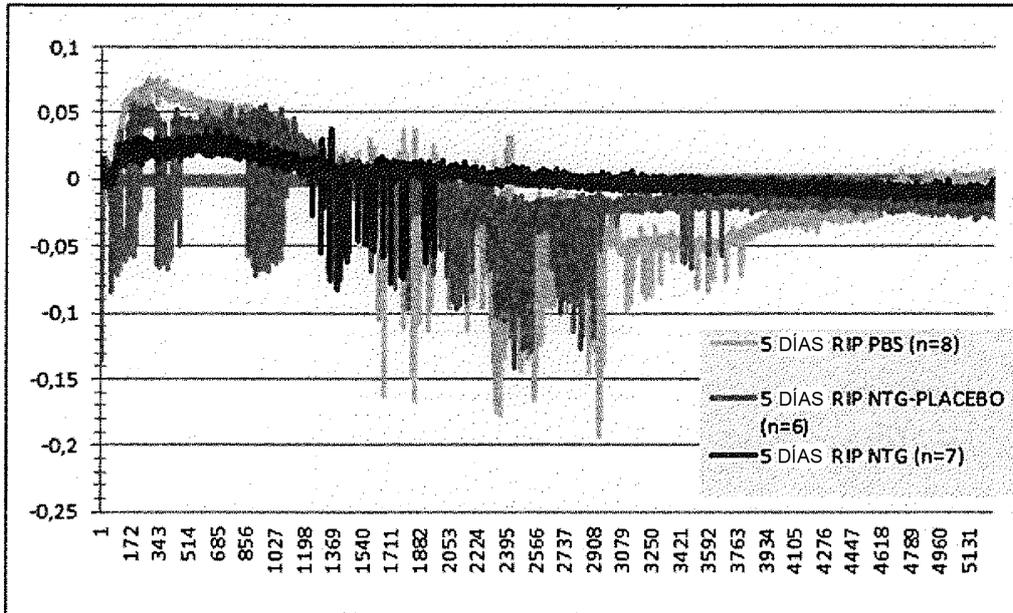


Figura 8

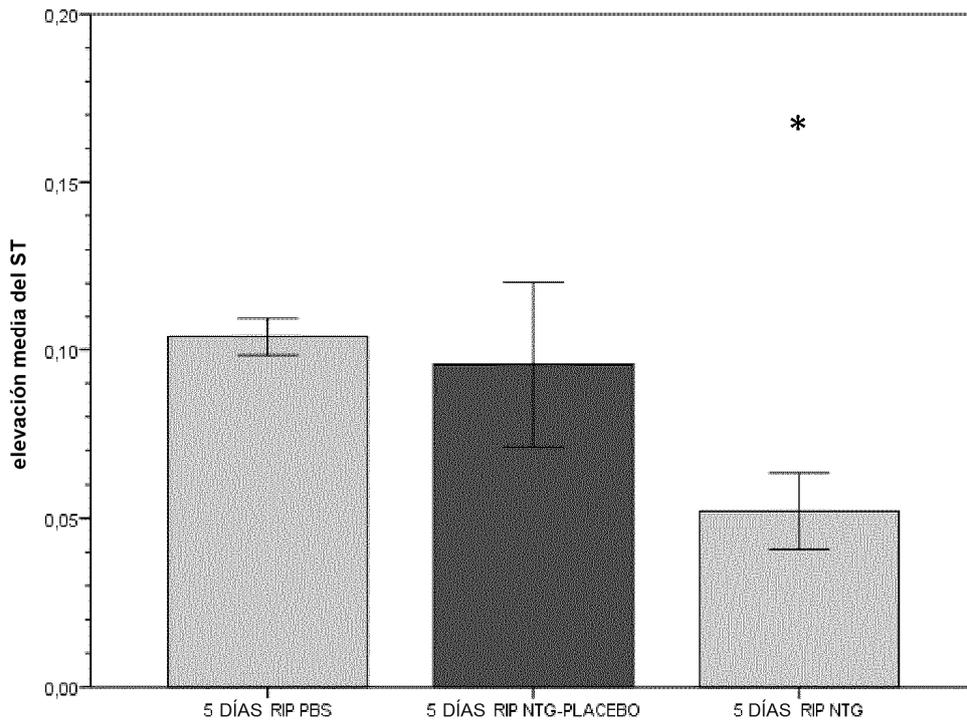


Figura 9

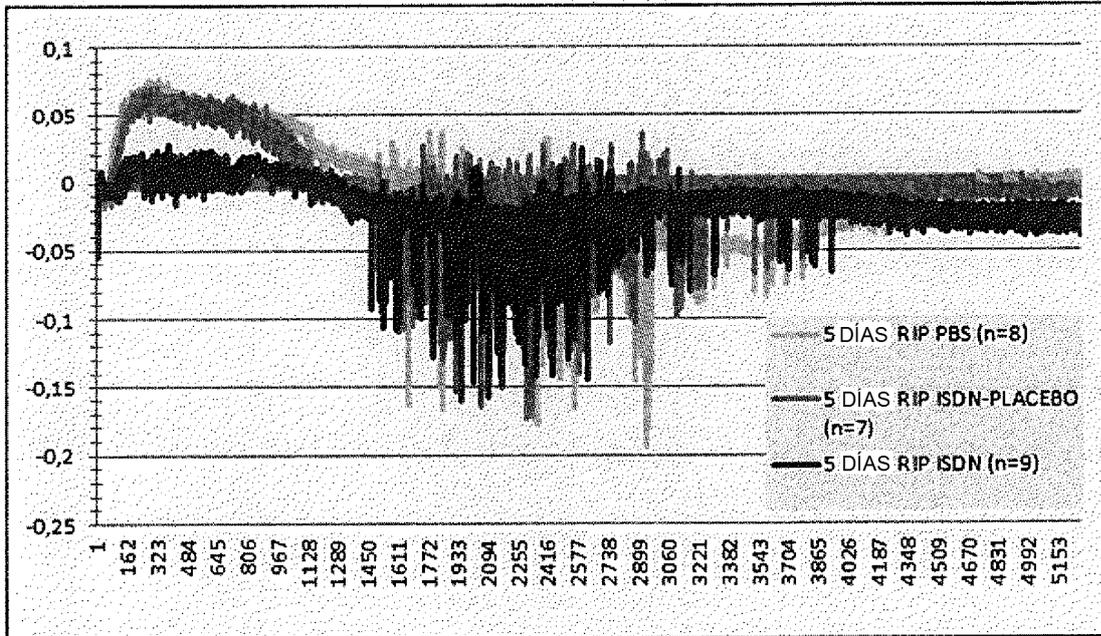


Figura 10

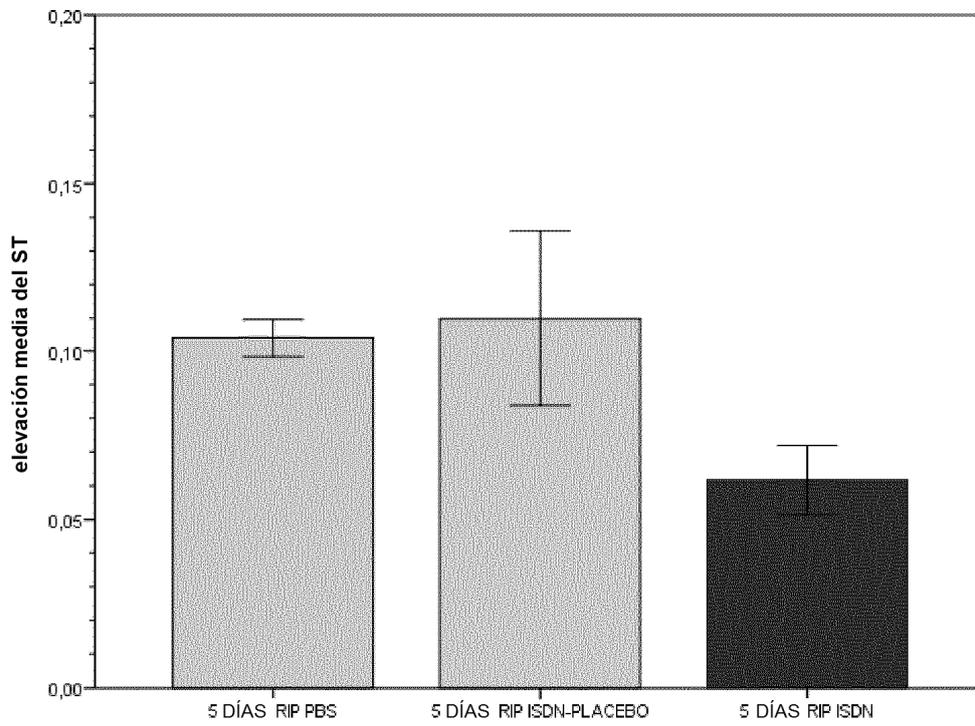


Figura 11

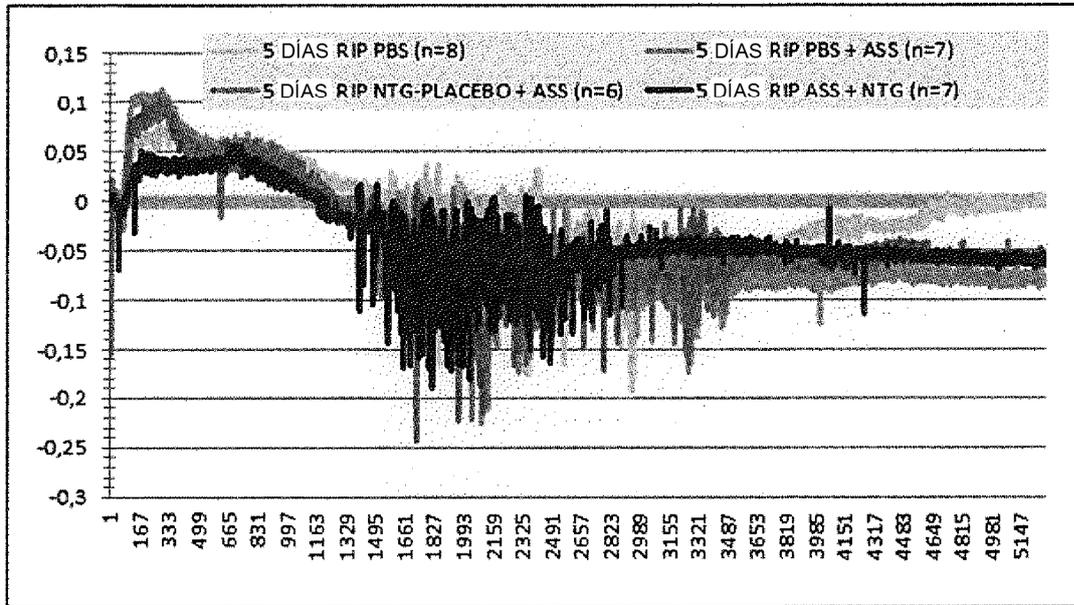


Figura 12

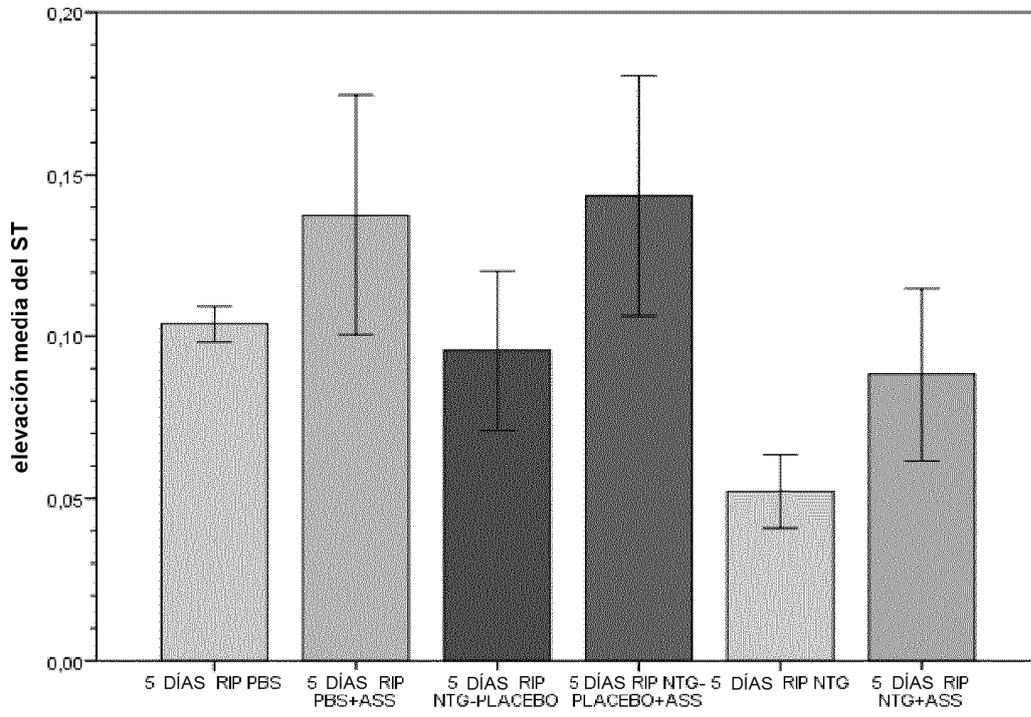


Figura 13

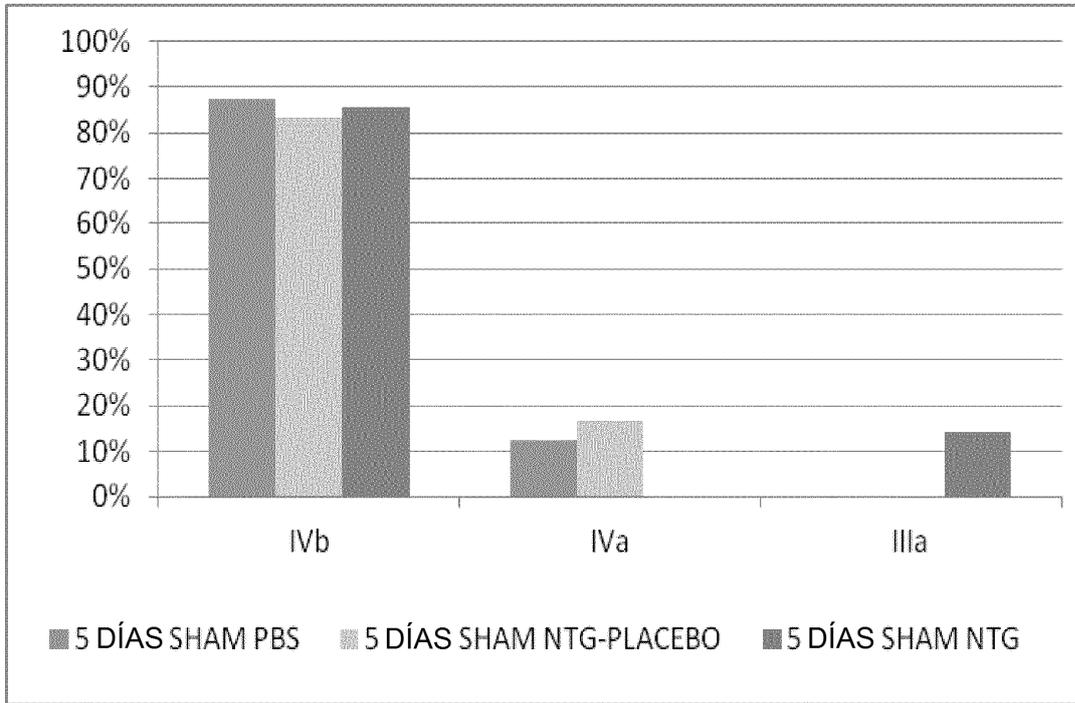


Figura 14

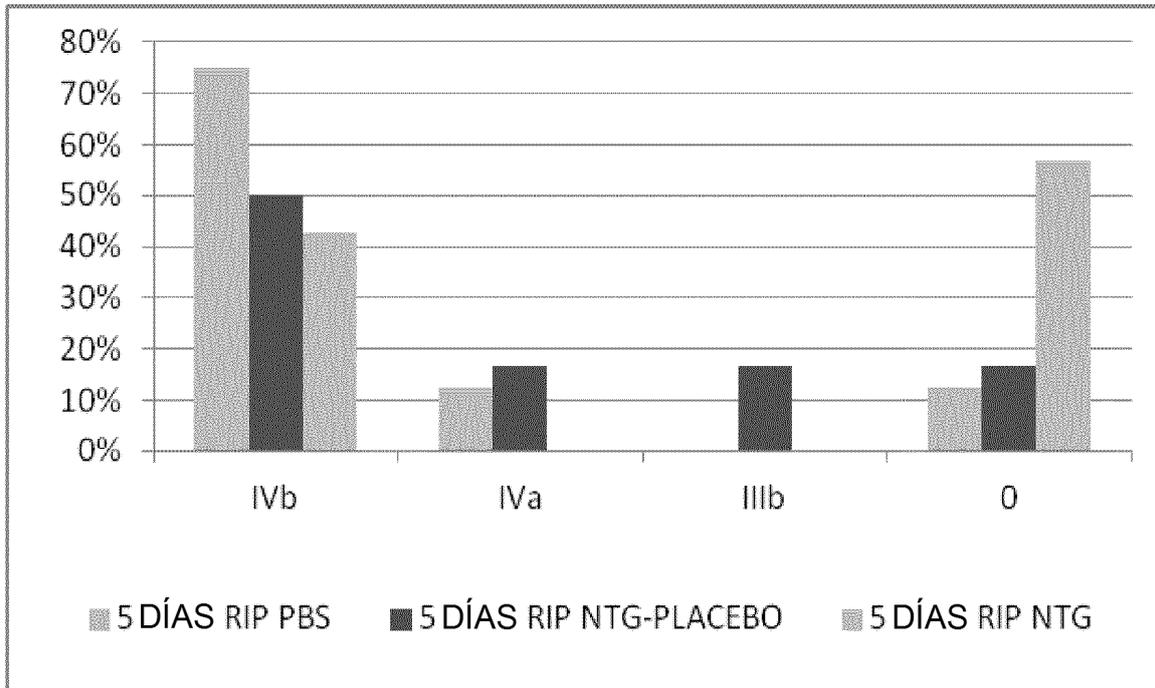


Figura 15

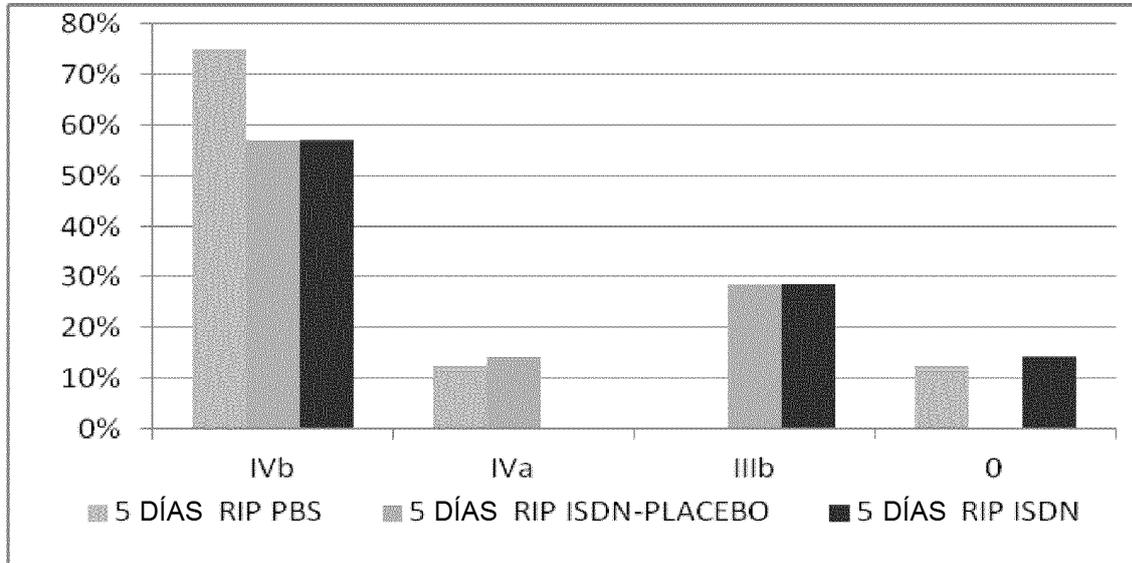


Figura 16

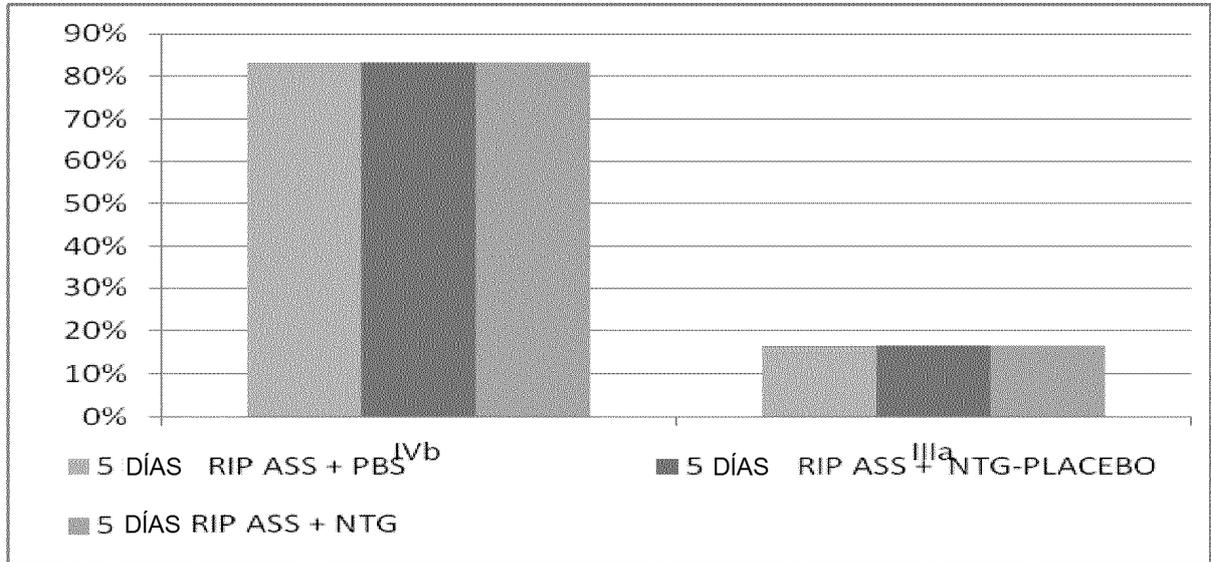


Figura 17

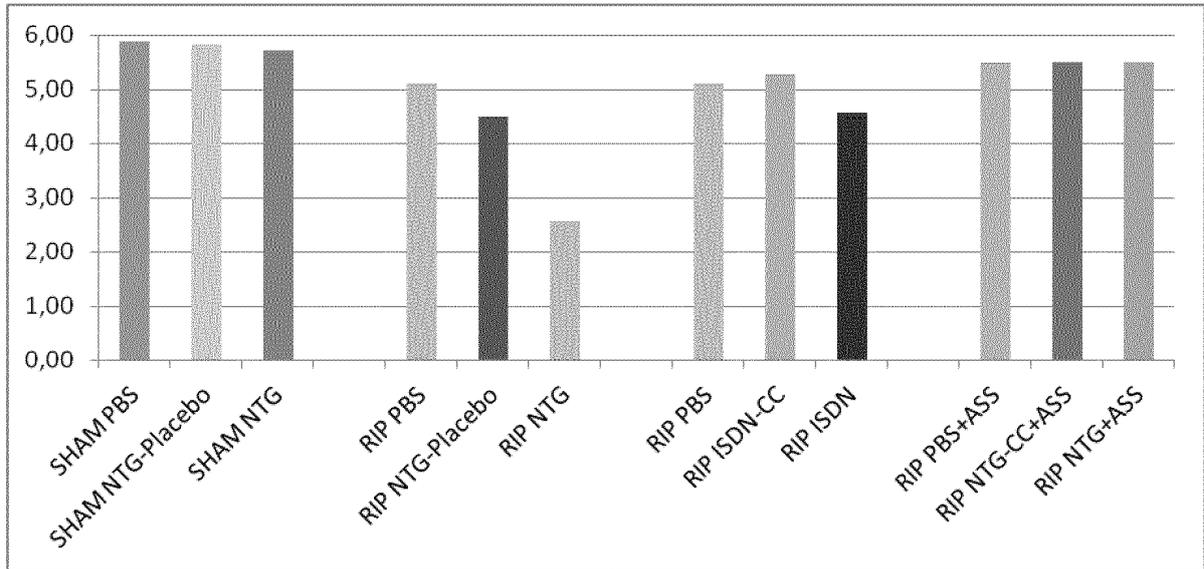


Figura 18

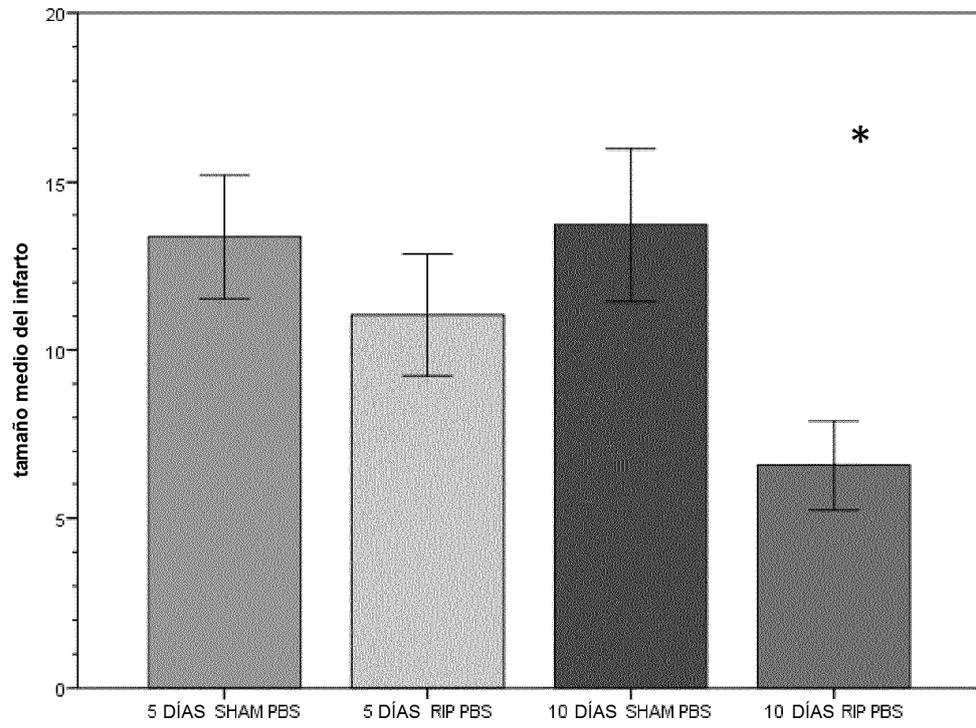


Figura 19

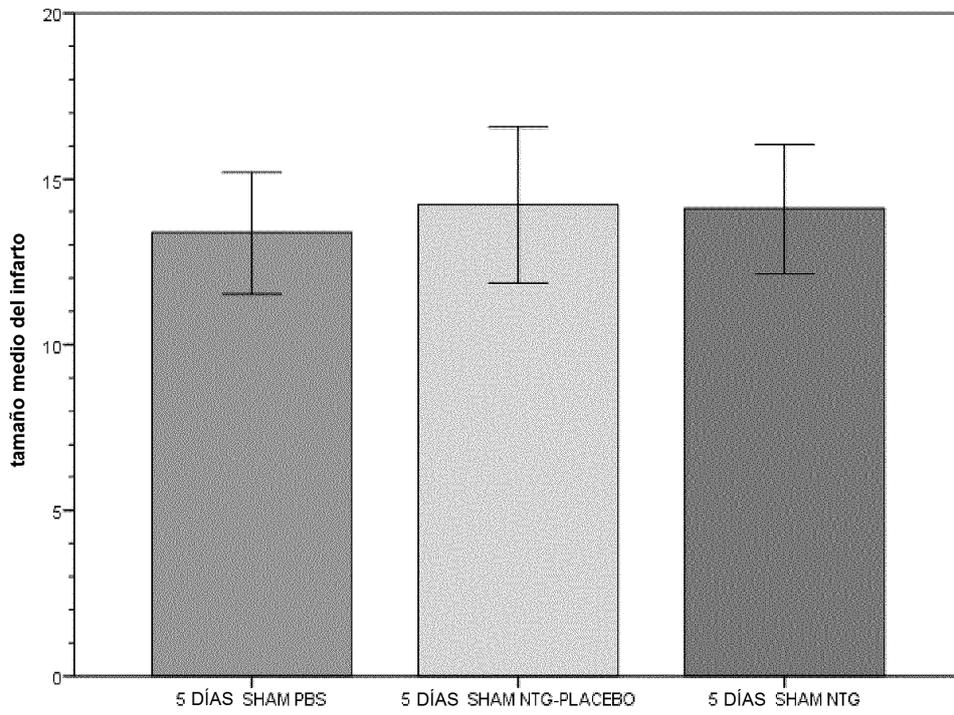


Figura 20

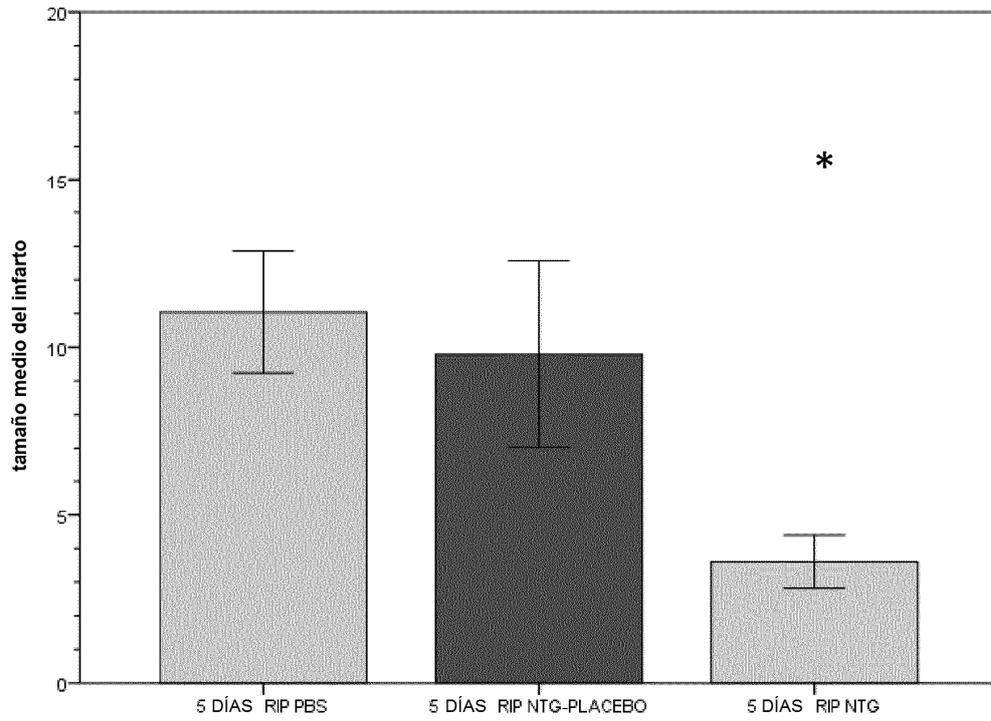


Figura 21

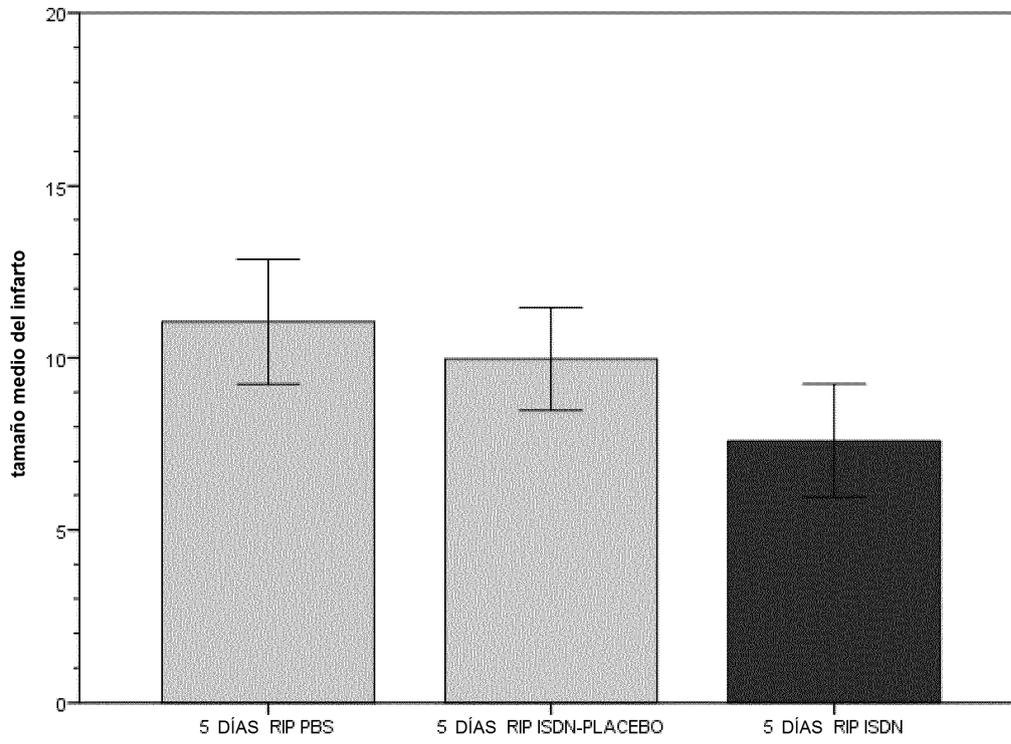
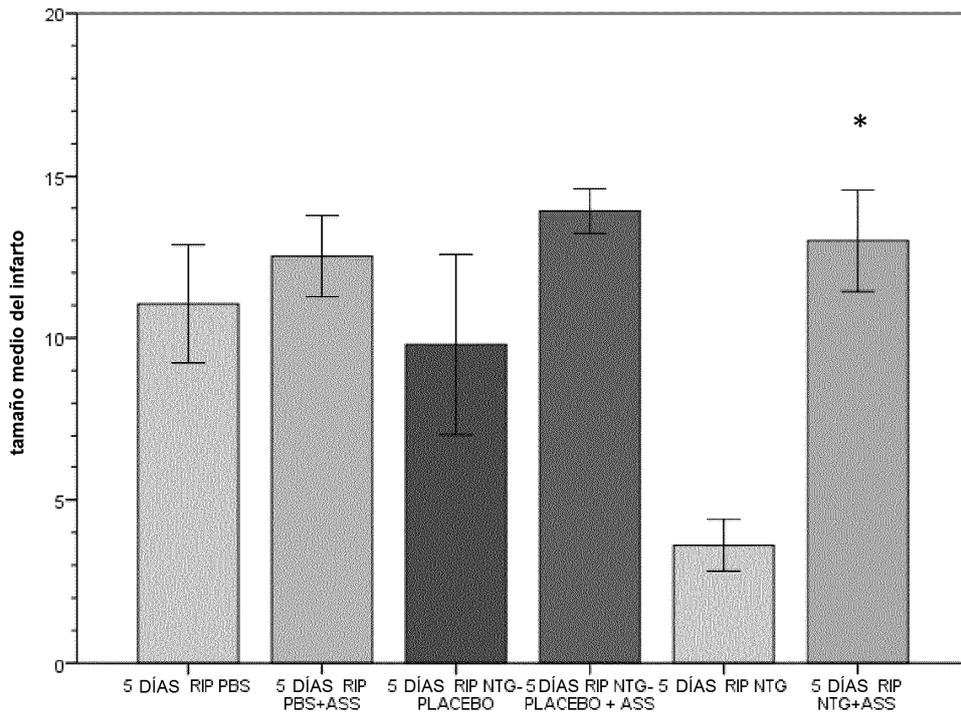
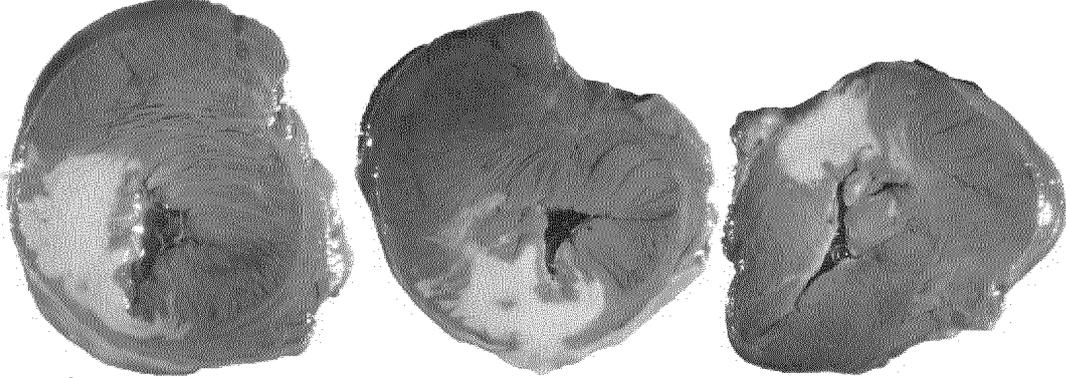


Figura 22

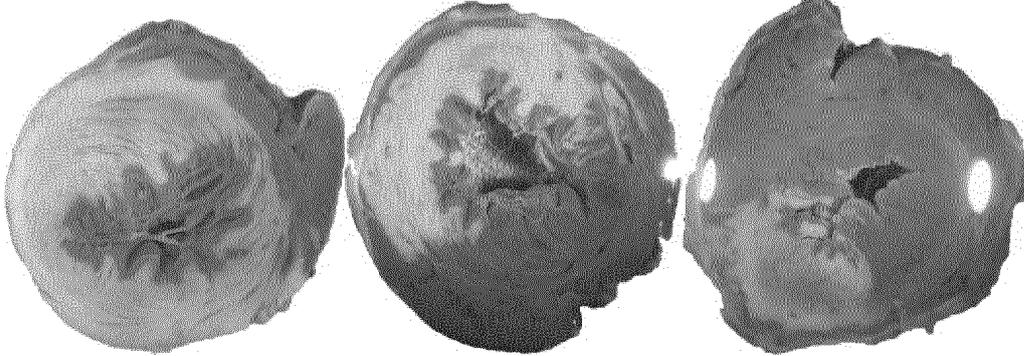


**Figura 23**

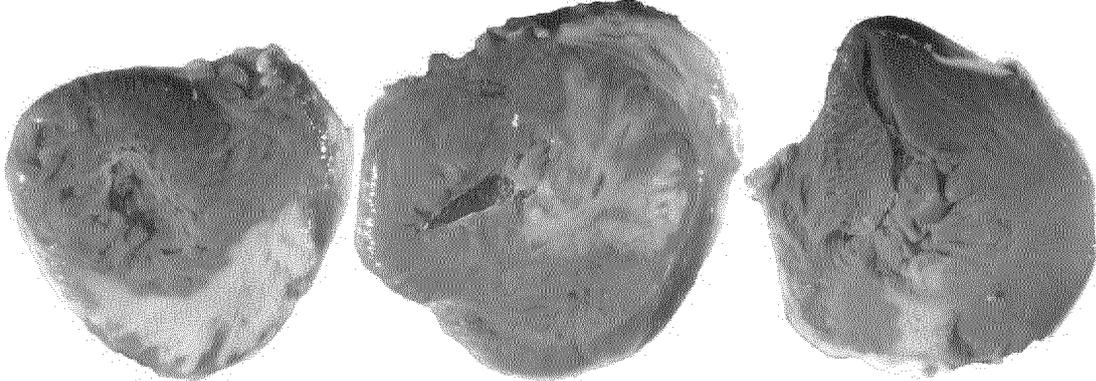
10 DÍAS RIP PBS:



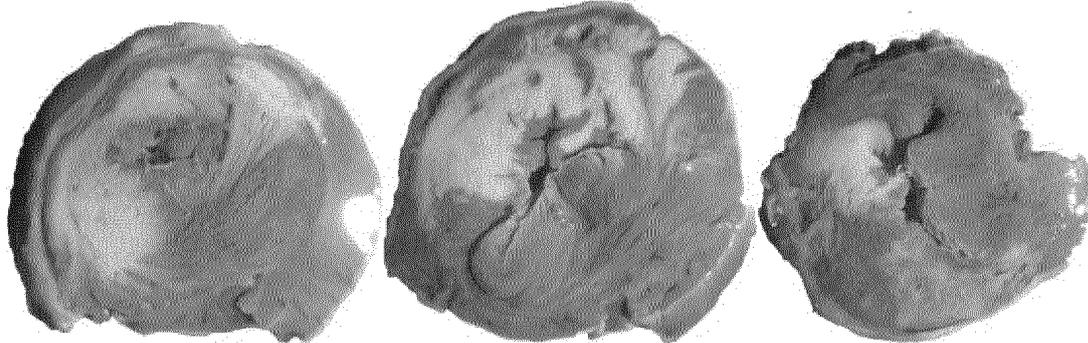
10 DÍAS SHAM PBS:



5 DÍAS RIP PBS:

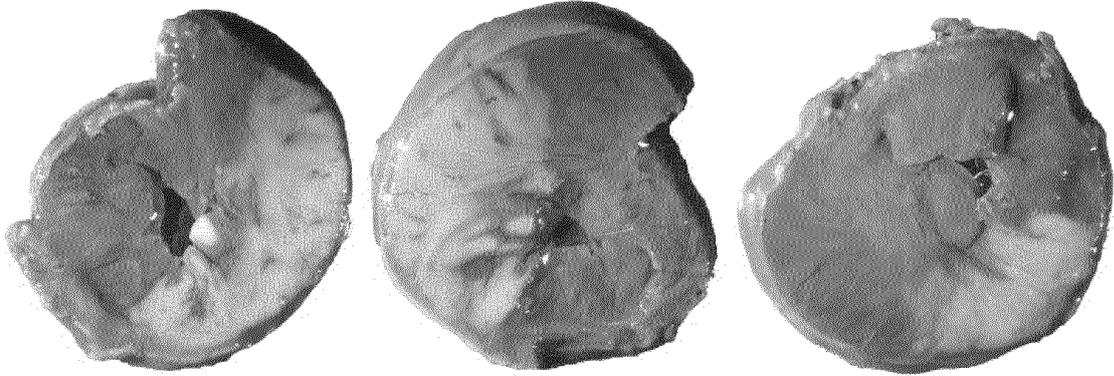


5 DÍAS SHAM PBS:

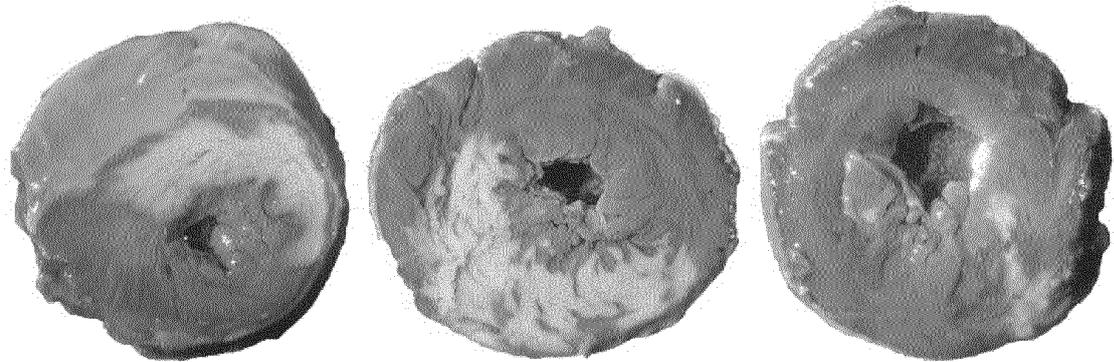


**Figura 23 (continuación)**

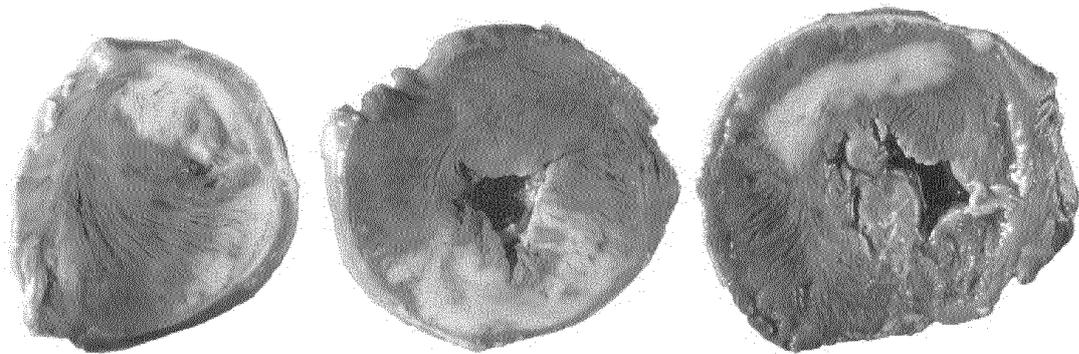
5 DÍAS SHAM NTG-PLACEBO:



5 DÍAS SHAM NTG:



5 DÍAS RIP NTG-PLACEBO:

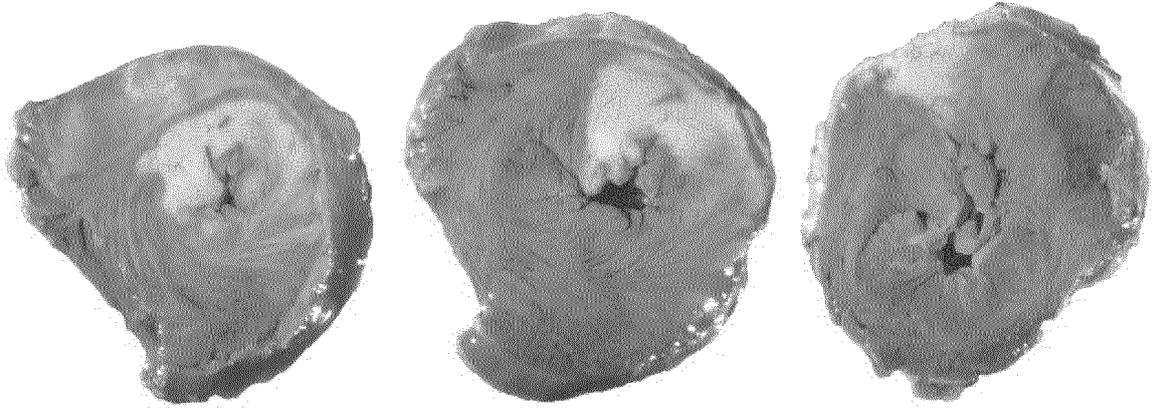


5 DÍAS RIP NTG:

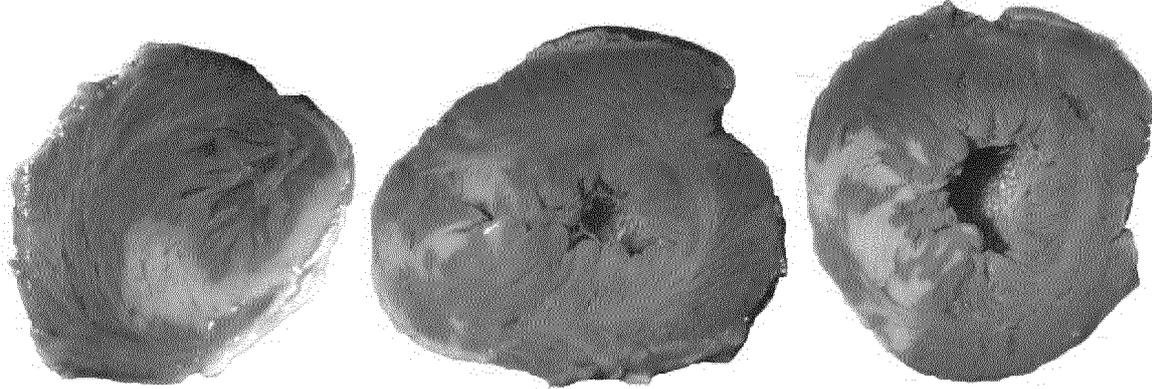


**Figura 23 (continuación)**

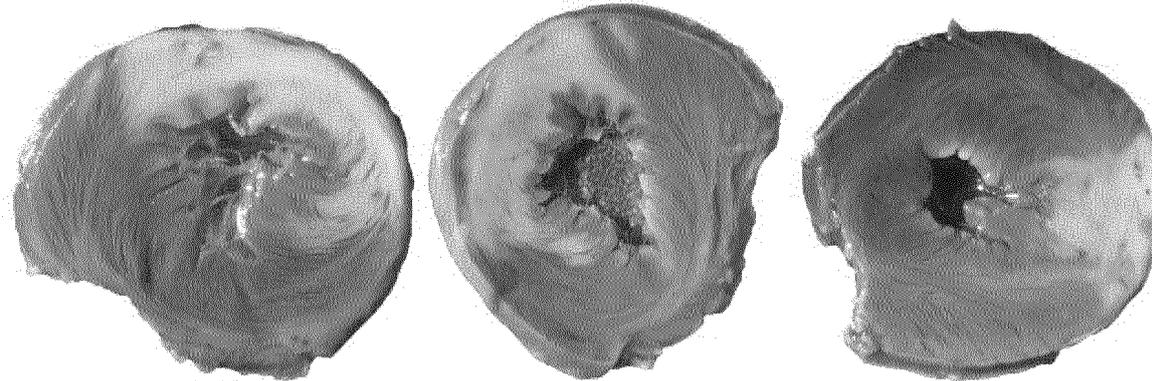
5 DÍAS RIP ISDN-PLACEBO:



5 DÍAS RIP ISDN:



5 DÍAS RIP ASA + PBS:



**Figura 23 (continuación)**

5 DÍAS RIP ASA + NTG-PLACEBO:



5 DÍAS RIP ASA + NTG:



Figura 24

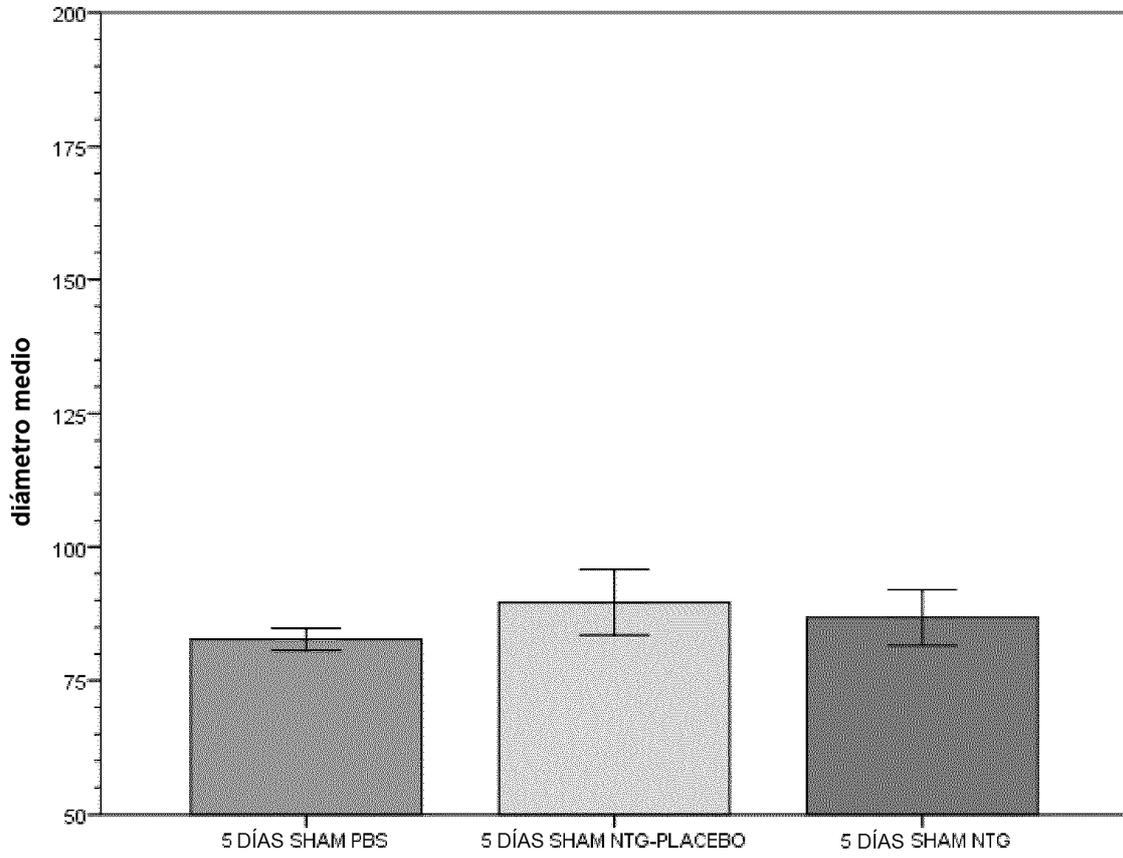


Figura 25

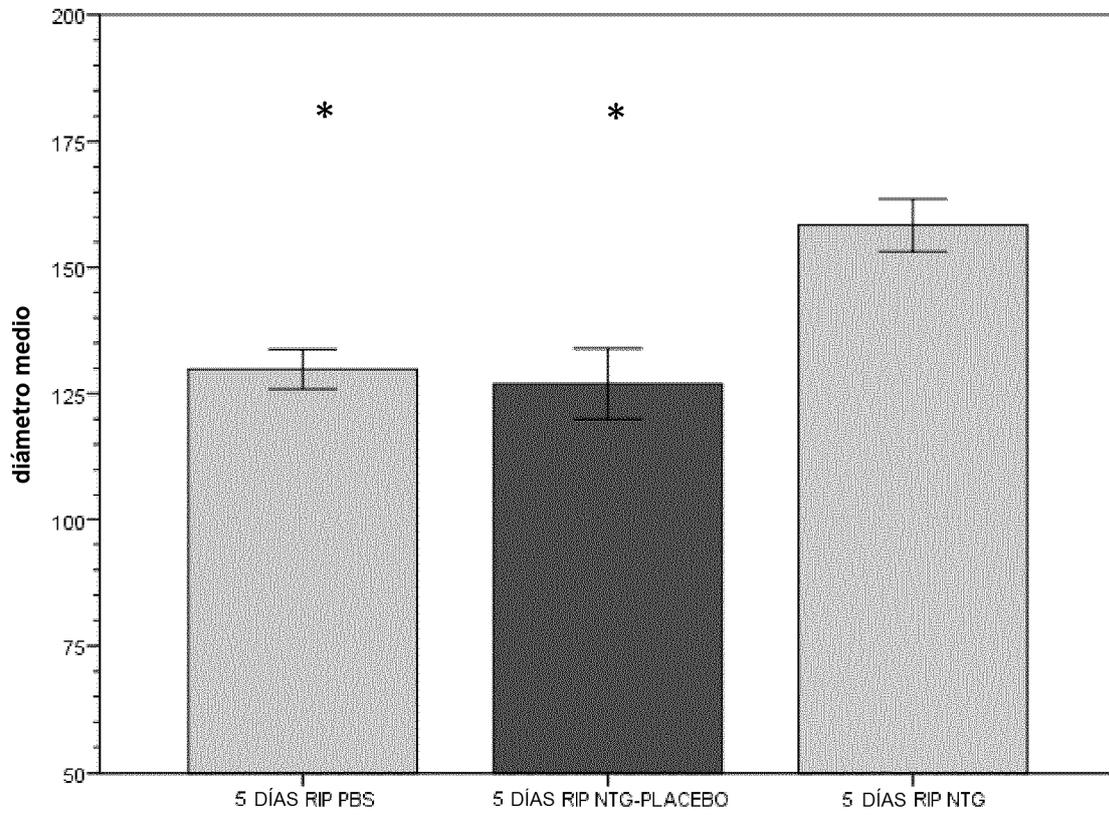


Figura 26

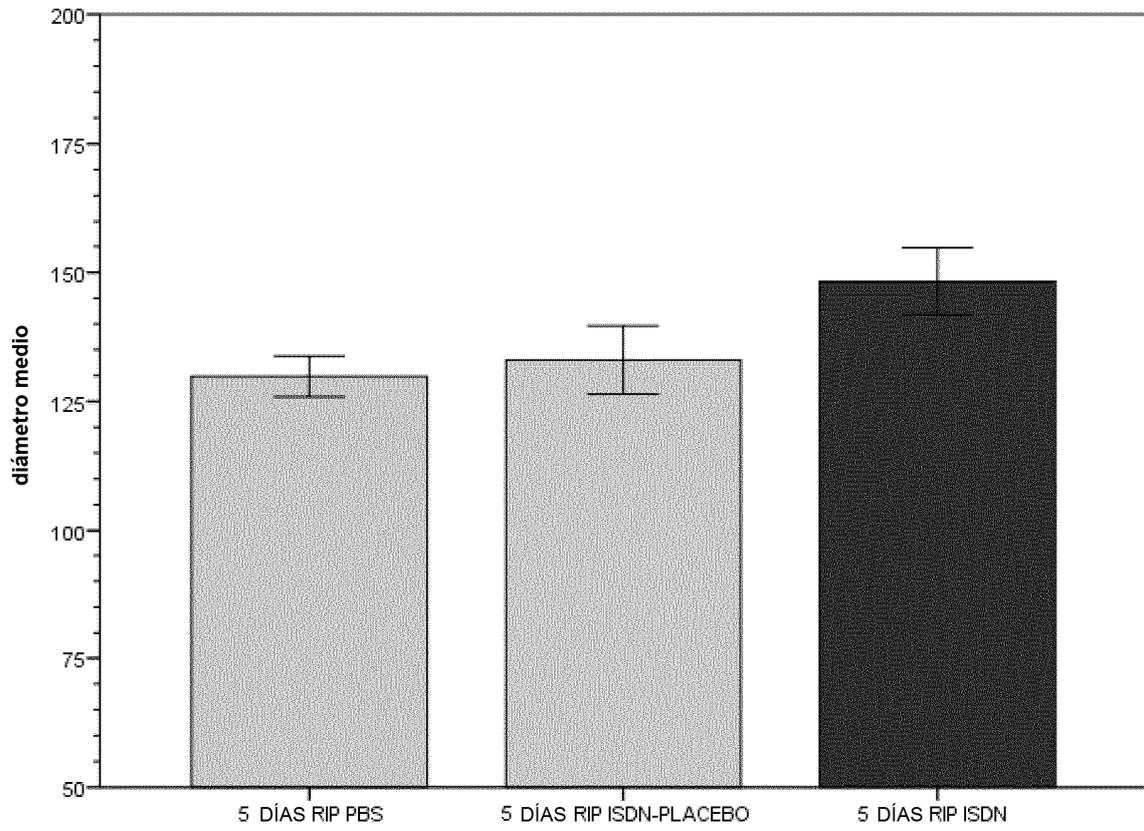


Figura 27

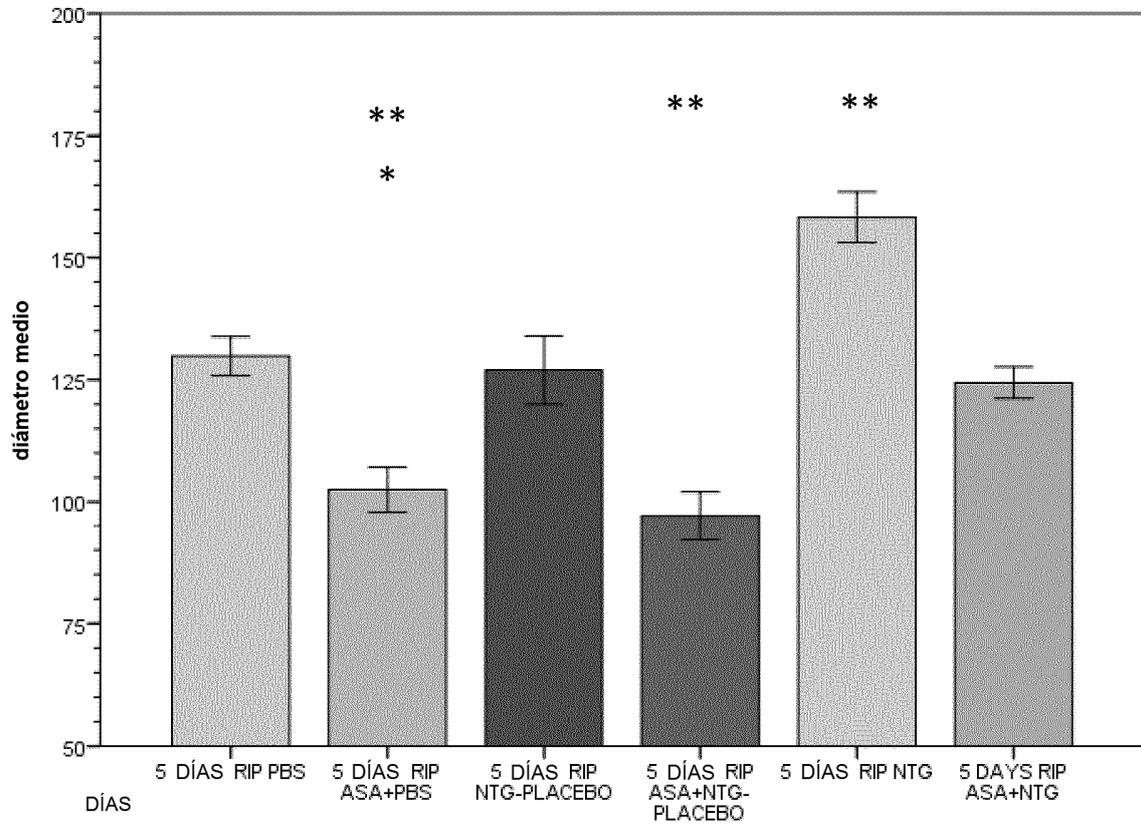


Figura 28

