

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 945**

51 Int. Cl.:

A61K 31/724 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/28 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.06.2011 PCT/US2011/000997**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2011 WO11152869**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2011 E 11790107 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2575487**

54 Título: **Formulaciones orales de carotenoides trans bipolares**

30 Prioridad:

02.06.2010 US 350804 P

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

15.02.2018

73 Titular/es:

**DIFFUSION PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)
2020 Avon Court 4
Charlottesville, VA 22902, US**

72 Inventor/es:

**GAINER, JOHN, L. y
MURRAY, ROBERT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 654 945 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

Formulaciones orales de carotenoides trans bipolares

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. número 61/350.804, presentada el 2 de junio de 2010.

- 5 Esta invención se refiere a formulaciones de compuestos potenciadores de la difusión. Las composiciones de esta invención incluyen típicamente un carotenoide trans bipolar, una ciclodextrina y un revestimiento. Se incluyen composiciones que están revestidas entéricamente con un compuesto sensible al pH para el aporte oral.

Antecedentes de la invención

- 10 Se considera generalmente que el aporte por vía oral de agentes terapéuticos es el método más popular de aporte de fármacos para los pacientes debido a que esta vía, en general, incrementa el cumplimiento terapéutico del paciente, disminuye el número de efectos secundarios asociados con las inyecciones y proporciona comodidad al usuario. Esta vía de administración está muy favorecida para la dosificación a pacientes con enfermedades crónicas.

- 15 Los carotenoides son una clase de hidrocarburos que consisten en unidades isoprenoides. La cadena principal de la molécula consiste en dobles enlaces y enlaces sencillos carbono-carbono conjugados, y también puede tener grupos colgantes. Se sabe que la crocetina y el crocetinato sódico trans (TSC) incrementan la difusividad de oxígeno en soluciones acuosas.

La Patente de EE. UU. 6.060.511 se refiere a crocetinato sódico trans (TSC) y sus usos. La patente cubre diversos usos del TSC tales como mejorar la difusividad de oxígeno y el tratamiento del choque hemorrágico.

- 20 La solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 10/647.132 se refiere a métodos de síntesis para elaborar sales de carotenoides trans bipolares (BTC) y a métodos para usarlas.

La solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 11/361.054 (documento US2006/0194973) se refiere a métodos mejorados de síntesis de BTC y a nuevos usos del BTC.

La solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 12/081.236 (documento US2008/0255246) se refiere al uso de carotenoides trans bipolares como un pretratamiento y en el tratamiento de la vasculopatía periférica.

- 25 La solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 12/289.713 (documento US2009/0110746) se refiere a una nueva clase de agentes terapéuticos que potencian la difusión de moléculas pequeñas.

La Solicitud Provisional de EE. UU. N° Ser. 61/213.575 (documento US2010/0322918) se refiere al uso de compuestos potenciadores de la difusión con trombolíticos.

- 30 Se ha divulgado una variedad de formulaciones de carotenoides trans bipolares. Véase la solicitud de propietario común solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 10/647.132 (documento US2004/0116729) y la solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 11/361.054.

Sumario de la invención

Las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen un compuesto potenciador de la difusión, una ciclodextrina y un revestimiento entérico.

- 35 En particular, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica según la reivindicación 1. Otras características ventajosas se pueden encontrar en las reivindicaciones dependientes.

Descripción detallada de la invención

- 40 Aunque un carotenoide trans bipolar (BTC), tal como crocetinato sódico trans (TSC), es un miembro de la familia carotenoide de compuestos, no se puede dosificar oralmente de un modo similar a otros carotenoides que se venden en forma de cápsulas o píldoras (p. ej., betacaroteno o vitamina A). Dos factores que se deben tener en cuenta en el desarrollo de una formulación oral de un compuesto de BTC son consideraciones de pH y solubilidad que son totalmente diferentes de otros compuestos carotenoides. Los métodos usados para la formulación de otros compuestos carotenoides simplemente no funcionan para compuestos tales como TSC.

- 45 El TSC se precipita bajo condiciones ácidas, tales como las que existen en el estómago. Este material sólido es prácticamente insoluble en el ambiente ácido del estómago. El TSC no es estable en condiciones ácidas y se convertirá en el isómero cis que puede precipitar. Se ha ideado un sistema que protegerá al TSC en el ambiente ácido duro del estómago y liberará TSC en una región de pH más favorable. Un pH más favorable existe en el intestino delgado. Estudios de circuito cerrado in situ han mostrado un incremento de la biodisponibilidad cuando el TSC se administra directamente al intestino delgado en comparación con el estómago. Véanse los Ejemplos
50 posteriores. Se cree que la eficacia del TSC depende de los niveles de concentración de TSC encontrados en el

cuerpo. La eficacia del TSC se puede prolongar al administrar TSC oralmente.

Los comprimidos de carotenoides trans bipolares incluyen excipientes que se usan comúnmente en la elaboración de comprimidos. Ventajosamente, los comprimidos también tienen un revestimiento entérico situado sobre ellos, de modo que se disolverán en las zonas de pH superior ($> 5,5$) del tracto digestivo en vez de en el estómago ácido.

5 Composiciones de la invención

Las composiciones de esta invención se fabrican todas para ser de calidad farmacéutica, es decir, composiciones farmacéuticas. Estas formulaciones pueden incluir portadores farmacéuticamente aceptables conocidos por los expertos en la técnica sí como otros agentes terapéuticos. Ventajosamente, la formulación no incluye un compuesto que inhiba la capacidad del compuesto potenciador de la difusión para mejorar la difusividad.

10 Las composiciones incluyen) un compuesto potenciador de la difusión, b) una ciclodextrina y c) un revestimiento. Como alternativa, se puede usar un portador sensible al pH (es decir, el TSC se dispersa/mantiene en una matriz polimérica) o un sistema de liberación con el tiempo (también conocido como liberación sostenida, controlada, etc.).

A. Compuestos potenciadores de la difusión

15 Los compuestos potenciadores de la difusión de la invención incluyen los compuestos descritos en los documentos US N° Ser. 10/647.132, US N° Ser. 11/361.054, US N° Ser. 12/081.236 y US N° Ser. 12/289.713.

Los compuestos potenciadores de la difusión de esta invención son carotenoides trans incluyendo diésteres, dialcoholes, dicetonas y diácidos de carotenoides trans, carotenoides trans bipolares (BTC) y sales bipolares de carotenoides trans (BTCS). Se incluyen compuestos de carotenoides trans bipolares que tienen la fórmula:

YZ-TCRO-ZY

20 donde:

Y = un catión

Z = un grupo polar que está asociado con el catión y

TCRO = esqueleto de carotenoide trans, tal como TSC.

Más específicamente:

25 **Y** (que puede ser igual o diferente en los dos extremos) = H o un catión distinto de H, preferiblemente Na^+ o K^+ o Li^+ . Y es ventajosamente un ion metálico monovalente. Y también puede ser un catión orgánico, p. ej., R_4N^+ , R_3S^+ , donde R es H o $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ donde n es 1-10, ventajosamente 1-6. Por ejemplo, R puede ser metilo, etilo, propilo o butilo.

30 **Z** (que puede ser igual o diferente en los dos extremos) = grupo polar que está asociado con H o el catión. Incluyendo opcionalmente el carbono terminal en el carotenoide (o compuesto relacionado con carotenoide), este grupo puede ser un grupo carboxilo (COO^-) o un grupo CO (p. ej. un grupo éster, aldehído o cetona), o un grupo hidroxilo. Este grupo también puede ser un grupo sulfato (OSO_3^-) o un grupo monofosfato (OPO_3^-), ($\text{OP}(\text{OH})\text{O}_2^-$), un grupo difosfato, trifosfato o combinaciones de los mismos. Este grupo también puede ser un grupo éster de COOR en el que la R es $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$.

35 **TCRO** = esqueleto de carotenoide o relacionado con carotenoide trans (ventajosamente menos de 100 carbonos) que es lineal, tiene grupos colgantes (definidos posteriormente), y típicamente comprende dobles enlaces y enlaces sencillos carbono-carbono "conjugados" o alternos (en una realización, el TCRO no está completamente conjugado como en un licopeno). Los grupos colgantes (X) son típicamente grupos metilo pero pueden ser otros grupos según se analiza posteriormente. En una realización ventajosa, las unidades del esqueleto están ligadas de tal modo que su disposición esté invertida en el centro de la molécula. Los 4 enlaces sencillos que rodean un doble enlace carbono-carbono están todos en el mismo plano. Si los grupos colgantes están en el mismo lado del doble enlace carbono-carbono, los grupos se denominan *cis* (también conocidos como "Z"); si están en el lado opuesto del enlace carbono-carbono, se denominan *trans* (también conocidos como "E"). A lo largo de este caso, los isómeros se denominarán *cis* y *trans*.

45 Los compuestos de esta invención son *trans*. El isómero *cis* típicamente es un detrimento -- y da como resultado que la difusividad no se incrementa. En una realización, se puede utilizar un isómero *cis* en el que el esqueleto sigue siendo lineal. La posición de los grupos colgantes puede ser simétrica con relación al punto central de la molécula o puede ser asimétrica de modo que el lado izquierdo de la molécula no parezca igual que el lado derecho de la molécula ni en cuanto al tipo de grupo colgante ni su relación espacial con respecto al carbono central.

50 Los grupos colgantes X (que pueden ser iguales o diferentes) son átomos de hidrógeno (H), o un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado que tiene 10 carbonos o menos, ventajosamente 4 o menos, (que contiene

opcionalmente un halógeno), o un halógeno. X también podría ser un grupo éster (COO-) o un grupo etoxi/metoxi. Ejemplos de X son un grupo metilo (CH₃), un grupo etilo (C₂H₅), una estructura de anillo aromático fenílico o simple con o sin grupos colgantes desde el anillo, un grupo alquilo (C1-C10) que contiene halógeno tal como CH₂Cl, o un halógeno tal como Cl o Br o un metoxi (OCH₃) o etoxi (OCH₂CH₃). Los grupos colgantes pueden ser iguales o diferentes pero los grupos colgantes utilizados deben mantener el esqueleto como lineal.

Aunque existen muchos carotenoides en la naturaleza, las sales de carotenoides no. La patente de EE. UU. de propietario común 6.060.511 se refiere a crocetinato sódico trans (TSC). El TSC se elaboró al hacer reaccionar azafrán presente en la naturaleza con hidróxido sódico seguido por extracciones que seleccionaban principalmente el isómero trans.

La presencia de los isómeros cis y trans de un carotenoide o una sal de carotenoide se puede determinar al examinar el espectro ultravioleta-visible para la muestra de carotenoide disuelta en una solución acuosa. Dado el espectro, el valor de la absorbancia del pico más alto se produce en el intervalo de longitud de onda visible de 380 a 470 nm (dependiendo el número del disolvente usado y la longitud de la cadena del BTC o la BTCS). La adición de grupos colgantes o diferentes longitudes de cadena pueden cambiar esta absorbancia del pico, pero un experto en la técnica reconocerá que la existencia de un pico de absorbancia en el intervalo visible correspondiente a la estructura de cadena principal conjugada de estas moléculas, dividido por la absorbancia del pico que se presenta en el intervalo de longitud de onda UV de 220 a 300 nm, se puede usar para determinar el nivel de pureza del isómero trans. Cuando el diéster de carotenoide trans (TCD) o la BTCS se disuelve en agua, el pico del intervalo de longitud de onda visible más alto estará entre 380 nm y 470 nm (dependiendo de la estructura química exacta, la longitud de la cadena principal y los grupos colgantes) y el pico del intervalo de longitud de onda UV estará entre 220 y 300 nm. Según M. Crow y C. Lambert, Photochemistry and Photobiology, Vol. 38 (2), 241-243 (1983), el resultado del cálculo (en ese caso se analizó la crocetina) era 3,1, que se incrementaba hasta 6,6 después de la purificación.

Realizando el análisis de Crow y Lambert sobre el TSC sintético según se describe en US N° Ser. 10/647.132 y US N° Ser. 11/361.054, esa relación es mayor de 7,0 (p. ej. de 7,0 a 8,5), ventajosamente mayor de 7,5 (p. ej. 7,5 - 8,5), lo más ventajosamente mayor de 8. El material sintetizado es un isómero trans "más puro" o altamente purificado.

Ventajosamente, el carotenoide trans es crocetina, crocina, una sal de carotenoide trans bipolar (BTC) tal como TSC o un diéster, alcohol o ácido de carotenoide.

B. Ciclodextrinas

Se han sugerido muchos excipientes para incrementar la biodisponibilidad de fármacos a partir de tracto gastrointestinal tales como tensioactivos, agentes quelantes, glicoles, polietilenglicol y otros; sin embargo, la ciclodextrina con un carotenoide trans bipolar funciona extremadamente bien.

Una descripción detallada de ciclodextrinas en combinación con carotenoides trans bipolares se puede encontrar en la solicitud de propietario común US N° Ser. 11/361.054. El carotenoide trans bipolar está en la forma de una composición que comprende un carotenoide trans y una ciclodextrina, por ejemplo α-ciclodextrina, β-ciclodextrina o γ-ciclodextrina. La ciclodextrina puede ser hidroxilpropil-β-ciclodextrina o 2-hidroxilpropil-γ-ciclodextrina. En otra realización, la composición comprende además manitol o solución salina. En una realización adicional más, la composición comprende además un compuesto para regular el pH tal como bicarbonato o glicina. Ventajosamente, la relación de un carotenoide trans bipolar a la ciclodextrina es hasta 1:10. Ventajosamente, hasta 1:4, p. ej. 2:1, 1:1 o 1:4.

C. Revestimientos

Un revestimiento entérico es una barrera aplicada a la medicación oral que controla la localización en el sistema digestivo en el que se absorbe. *Entérico* se refiere al intestino delgado, por lo tanto los revestimientos entéricos evitan la liberación del medicamento antes de que alcance el intestino delgado. La mayoría de los revestimientos entéricos funcionan al presentar una superficie que es estable al pH altamente ácido encontrado en el estómago, pero se disocia rápidamente a un pH menos ácido (relativamente más básico). Por ejemplo, no se disolverán en los jugos ácidos del estómago (pH de 1 a 3), pero lo harán en el ambiente de pH superior (por encima de pH 5,5) presente en el intestino delgado. Materiales usados para revestimientos entéricos incluyen ácidos grasos, ceras y goma laca así como plásticos.

Los carotenoides trans bipolares precipitan en condiciones ácidas. Para estos tipos de fármacos, se puede añadir un revestimiento entérico a la formulación para proteger a la sustancia activa de la exposición ácida del estómago, aportando en su lugar el principio activo al ambiente de pH básico (pH del intestino 5,5 y superior) donde es más soluble, y puede dar su acción deseada.

Se cree que la eficacia del TSC depende de los niveles de concentraciones de TSC encontrados en el cuerpo. La eficacia del TSC se puede prolongar al administrar TSC oralmente. Puesto que el TSC precipita en condiciones ácidas, las composiciones de esta invención protegen al TSC en el ambiente ácido duro del estómago y liberan TSC en una región de pH más favorable en el intestino.

Un revestimiento entérico se aplica a formulaciones de dosificación oral a fin de proteger a la sustancia activa de la disolución en el fluido gástrico dentro del estómago. Las razones más comunes para usar un revestimiento entérico incluyen:

- Protección de la sustancia activa de las enzimas gástricas o la acidez del fluido gástrico
 - 5 · Enmascaramiento del sabor o el olor
 - Prevención de la irritación del estómago incluyendo náuseas y vómitos
 - Liberación sostenida para una absorción controlada
 - Aporte de la sustancia activa a una zona específica del tracto digestivo que es más favorable para la absorción sistémica
- 10 Otra realización incluye usar un revestimiento entérico que responde a un intervalo más amplio de valores de pH a fin de permitir que un carotenoide trans bipolar tal como TSC se absorba en más secciones del intestino, incrementando así la superficie específica disponible para la absorción.

Composición de los revestimientos

- 15 Existen muchos materiales disponibles que se usan para revestir entéricamente materiales. La mayoría funcionan bien mediante una erosión lenta del material de revestimiento (cera de carnauba, queratina, gluten, etc.) o bien mediante un revestimiento sensible al pH. Los materiales que se basan en el mecanismo de erosión dependen de los tiempos de vaciado gástrico. El segundo tipo, el revestimiento sensible al pH, son hidrófobos e insolubles en agua a condiciones de pH bajo y se vuelven solubles a pH superiores. Así, el revestimiento es insoluble en el ambiente ácido duro del estómago y se disuelve en la región de pH superior del intestino. Existen muchos polímeros sensibles al pH disponibles que se pueden seleccionar basándose en un pH específico al que se produce la desintegración. La tabla posterior lista algunos de los polímeros sensibles al pH más comunes.
- 20

Polímeros sensibles al pH comunes usados para revestimientos entéricos

Acetato-ftalato de celulosa (CAP)

Acetato-succinato de celulosa

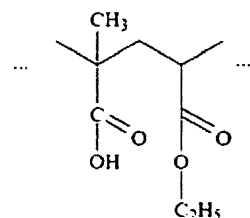
Polímeros de acrilato

Ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa

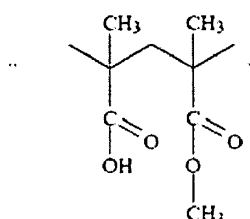
Acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa

Poli(acetato-ftalato de vinilo)

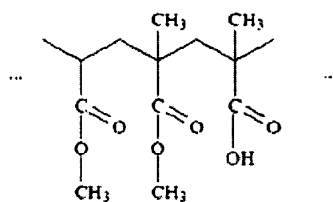
- 25 Tres polímeros-copolímeros de acrilato disponibles comercialmente derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico son Eudragit L30D-55, L100 y FS30D. La funcionalidad dependiente del pH de estos polímeros se determina por sus grupos funcionales ácido carboxílico:



Eudragit L30D-55: La disolución se produce a un pH de 5,5 o más con una zona de liberación elegida del duodeno.



Eudragit L100: La disolución se produce a un pH por encima de 6,0 con una zona de liberación elegida del yeyuno.



Eudragit FS30D: La disolución se produce a un pH por encima de 7,0 con una zona de liberación elegida del colon.

D. Otros ingredientes

- 5 Se pueden añadir agentes para tamponar los compuestos potenciadores de la difusión. Se pueden añadir otros agentes para afectar a la osmolalidad, o se pueden añadir como agentes de combinación necesarios para formulaciones orales. Agentes tamponadores específicos incluyen glicina, carbonato sódico, bicarbonato sódico, carbonato magnésico e hidróxido de aluminio. Agentes específicos para afectar a la osmolalidad incluyen manitol y polisacáridos.

- 10 Otros agentes que se pueden añadir incluyen:

Prosolv 90 es una celulosa microcristalina silicificada. Se dice que el PROSOLV SMCC 90 ofrece un equilibrio de compactación y flujo de lo mejor de su clase para formulaciones en forma de comprimido. Mejora el flujo de la formulación, potencia la consolidación de las partículas y mejora la uniformidad del contenido.

- 15 Crospovidone XL 90 es una polivinilpirrolidona reticulada que se usa en la formación de comprimidos como un adyuvante de la esferonización y una alternativa a la celulosa microcristalina. Esferonización, marmumerización, nodulización y micronodulización significan todos lo mismo: la fabricación de productos en esferas pequeñas para el uso en las industrias farmacéutica y relacionadas. Todos los productos producidos mediante estos procedimientos se pueden denominar esferoides, esferas, microsferas, nódulos, micronódulos o nódulos farmacéuticos. Todos estos términos se refieren a lo mismo. El intervalo de tamaño es normalmente de aproximadamente 0,8 mm a 1,5 mm de diámetro, aunque son posibles menores y mayores. En contraste, el término granulación se refiere normalmente a partículas de conformación irregular con un intervalo de tamaño grande dentro de un lote. Los materiales granulados normalmente son menos densos.

- 25 El estearato magnésico, también llamado sal magnésica de ácido octadecanoico, es una sustancia blanca que es sólida a temperatura ambiente. Tiene la fórmula química $C_{36}H_{70}MgO_4$. Es una sal que contiene dos equivalentes de estearato (el anión de ácido esteárico) y un catión magnesio (Mg^{2+}). El estearato magnésico se funde a aproximadamente 88°C, no es soluble en agua y generalmente se considera seguro para el consumo humano. Debido a que es ampliamente considerado como inocuo, a menudo se usa como un agente de carga en la fabricación de comprimidos y cápsulas medicinales. A este respecto, la sustancia también es útil debido a que tiene propiedades lubricantes, evitando que los ingredientes se peguen al equipo de fabricación durante la compresión de
- 30 polvos químicos en comprimidos sólidos.

Kollidon es un polímero de polivinilo de peso molecular variable; usado como un agente de suspensión y dispersión y vehículo para productos farmacéuticos.

Métodos de formulación

- 35 Formulaciones de la presente invención adecuadas para la administración oral se pueden presentar como unidades discretas tales como píldoras, cápsulas, sellos o comprimidos, como polvos o gránulos, o como una solución, suspensión o emulsión. Formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen además tabletas y pastillas. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica de la farmacia. La formulación puede ser para la liberación inmediata o lenta o controlada del compuesto potenciador de la difusión. Las ventajas de un sistema de liberación sostenida (también conocida como liberación temporizada, liberación controlada, etc.) son que la frecuencia de dosificación se puede disminuir y las concentraciones sistémicas de fármaco son más estables a lo largo de un período mayor en comparación con otras formulaciones del mismo fármaco.

- 45 Las dosificaciones apropiadas de las composiciones de la invención dependerán del metabolismo del compuesto dado y la gravedad de la afección que se trate. Para que una dosis sea "terapéuticamente eficaz", debe tener el efecto deseado, es decir, debe aliviar los síntomas de la indicación para la que se da. La dosificación terapéuticamente eficaz dependerá de la afección que se trate, la gravedad de la afección, la fase y las características individuales de cada paciente mamífero tratado y la mitigación del efecto potenciador de la difusión.

Típicamente, las composiciones de la invención se elaboran al mezclar el carotenoide trans bipolar y la ciclodextrina seleccionada en una relación de hasta 1:10. La mezcladura se realiza mediante cualquier método

farmacéuticamente aceptado. La mezcla bien se carga en un recipiente para cápsulas o bien se estampa en un comprimido (que también puede contener los ingredientes mencionados previamente para promover la liberación de los moldes, etc.). Las cápsulas o los comprimidos se revisten a continuación mediante un polímero sensible al pH tal como un Eudragit de tal modo que se cree un revestimiento continuo.

- 5 En una realización, múltiples tipos de cuentas revestidas entéricamente se ponen en una cápsula u otro sistema para el aporte oral. Las cuentas están compuestas por una primera porción o grupo de cuentas que tienen un primer revestimiento y una segunda porción o grupo de cuentas que tienen un segundo revestimiento. También se pueden añadir grupos adicionales de cuentas con diferentes revestimientos. Un ejemplo es una cápsula que contiene cuentas que tienen tres tipos diferentes de revestimientos de Eudragit que se liberan a diferentes valores de pH y se liberan a lo largo de un período más prolongado que una cápsula que contiene un solo tipo de cuenta.

Usos terapéuticos y modos de administración

Las composiciones de la invención tienen usos terapéuticos para tratar a mamíferos que tienen tejidos que experimentan bajos niveles de oxígeno (hipoxia) o en diversas afecciones que afectan al sistema nervioso central.

- 15 Los usos de las composiciones de la invención incluyen los divulgados en la Patente de EE. UU. 6.060.511, la solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 10/647.132, la solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 11/361.054, la solicitud de Patente de EE. UU. N° Ser. 12/081.236 y la solicitud de Patente de EE. UU. provisional N° Ser. 61/213.575 de propietario común.

Las composiciones orales de la invención son útiles en el tratamiento de:

choque hemorrágico,

- 20 una enfermedad respiratoria, asma, enfisema, ALI, ARDS, COPD

isquemia,

una enfermedad cardiovascular, aterosclerosis, infarto de miocardio, hipertensión, fibrilación ventricular

apoplejía, lesión cerebral traumática, edema cerebral,

- 25 afecciones del sistema nervioso central (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas). Neurodegeneración es el término general para la pérdida progresiva de estructura o función de las neuronas, incluyendo muerte de neuronas. Ejemplos de enfermedades nerviosas degenerativas incluyen: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, enfermedad por cuerpos de Lewy y atrofia muscular espinal. Véase el Ejemplo 7.

artritis,

- 30 anemia, (anemia de la premadurez, anemia de Fanconi, anemia hemolítica, anemia microcítica, una anemia normocrómica, una anemia macrocítica, esferocitosis hereditaria, anemia drepanocítica, anemia hemolítica autoinmunitaria por anticuerpos calientes, anemia hemolítica por crioaglutinina),

insuficiencia renal crónica, hipertensión,

papilomas, lesiones de la médula espinal,

- 35 radioterapia del cáncer (ventajosamente como un anexo a i) incluyendo radiación de haces externos, bisturí gamma, braquiterapia, tomoterapia y haz de protones, incluyendo radioterapia conformal tridimensional fraccionada, radiación intracavitaria y radioterapia de intensidad modulada (IMRT), y/o ii) quimioterapia incluyendo temozolimida).

diabetes, retinopatía diabética,

- 40 vasculopatía/claudicación vascular periférica, embolia, coágulos de sangre, estenosis espinal/claudicación neurogénica,

enfermedades en las que los órganos no obtienen suficiente oxígeno tales como granulomatosis de Wegener

Las composiciones de la invención también son útiles como un pretratamiento o para tratar a mamíferos con riesgo de las enfermedades/afecciones apuntadas anteriormente.

- 45 Las composiciones también son útiles en la neuroprotección, es decir, en la prevención o el retraso de las complicaciones asociadas con trastornos neurodegenerativos tales como enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer. También son útiles para reducir la cantidad de isquemia resultante de cirugía en un mamífero al administrar la composición antes, durante o después de la cirugía.

Las composiciones también son útiles para potenciar el comportamiento cuando la respiración/el esfuerzo se

incrementa o estresa, para incrementar el metabolismo aeróbico y para incrementar la resistencia durante la actividad física, tal como correr, andar o levantar objetos.

5 Para los usos siguientes, los compuestos potenciadores de la difusión se administran mediante cualquier vía adecuada incluyendo oral, nasal o inhalación, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, transdérmica e intraósea), vaginal o rectal. La vía de administración preferida dependerá de las circunstancias. Una vía de inhalación o una inyección intravenosa o intramuscular es ventajosa para el tratamiento de situaciones de emergencia, cuando es necesario que el compuesto potenciador de la difusión entre en la corriente sanguínea muy rápidamente. En una realización, una composición de una ciclodextrina y carotenoide trans bipolar disueltos en agua estéril se puede inyectar, bien intramuscularmente (IM) o bien intravenosamente (IV). Las formulaciones incluyen así las adecuadas para la administración a través de estas vías (líquido o polvo que se va a nebulizar). Se apreciará que la vía preferida puede variar, por ejemplo, con la afección y la edad del paciente.

isquemia crítica de las extremidades

enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, ataxia de Friedreich, enfermedad de Huntington, enfermedad por cuerpos de Lewy y atrofia muscular espinal,

15 esclerosis múltiple,
síndrome metabólico
neuropatía periférica
parálisis cerebral

20 cáncer -- una sal de carotenoide trans bipolar, tal como TSC, es la quimioterapia usada para provocar la regresión de muchos tipos de tumores cancerosos, es decir, sin el uso de radiación u otra quimioterapia. El Ejemplo 8 se refiere al tratamiento de tumores cancerosos con TSC. El TSC no funciona destruyendo las células cancerosas, sino que, aunque sin querer limitarse por una teoría, se cree que funciona haciendo que las células reviertan en células más maduras (y, así, más cercanas a la normalidad). El uso de retinoides (tales como ácido retinoico totalmente trans), o sus sales, para el tratamiento del cáncer se excluye de la invención. Ejemplos de los tipos de cáncer/tumores que se pueden tratar son: cánceres/tumores de piel, pulmón, mama, cerebro, próstata y colon.

25 En una realización, se administra más de un compuesto potenciador de la difusión. Alternativamente, se pueden aportar conjuntamente hemoglobinas o fluorocarbonos y un compuesto potenciador de la difusión.

30 Los siguientes Ejemplos son ilustrativos, pero no limitativos de las composiciones de la presente invención y los métodos de la presente divulgación. Otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de una variedad de condiciones y parámetros normalmente encontrados que son obvios para los expertos en la técnica están dentro de esta invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Composición para comprimidos (sin ciclodextrina)

35 Se elaboraron dos formulaciones que consisten en los siguientes ingredientes:

Combinación al 65%

65,0%	TSC
26,0%	Prosolv 90
2,9%	Crospovidone XL 90
1,5%	Estearato magnésico
4,6%	Kollidon

ES 2 654 945 T3

Combinación al 60%

60,4%	TSC
30,1%	Prosolv 90
3,8%	Crospovidone XL 90
1,4%	Estearato magnésico
4.3%	Kollidon

Los comprimidos de TSC se elaboraron en tres (3) etapas:

5 Etapa 1: Una mezcla que contiene 70% de TSC, 25% de Prosolv 90 y 5% de Kollidon 25 se mezcló en una bolsa durante 5 minutos y se compactó con rodillos usando un compactador de rodillos Vector. Las condiciones para el compactador de rodillos eran presión de los rodillos = 5,5 Mpa (800 psi), velocidad del tornillo = 10 rpm, velocidad de los rodillos = 0,95 rpm. Esto producía una combinación denominada Combinación de TSC I.

10 Etapa 2: La Combinación de TSC I procedente de la Etapa 1 se compactó con rodillos usando Crospovidone XL 10 y estearato magnésico. Los porcentajes eran 97,5% de Combinación de TSC I, 2% de Crospovidone XL 10 y 0,5% de estearato magnésico. El producto de esta etapa se denomina Gránulos de TSC II.

Etapa 3: Las cintas procedentes de la Etapa 2 se trituraron a mano y se tamizaron a través de un tamiz de malla 20. Los gránulos obtenidos se mezclaron con excipientes (véase posteriormente) para dar combinaciones finales que contenían 65% de TSC y 60% de TSC.

Combinación de TSC al 65%	Combinación de TSC al 60%
95,2% de Gránulos de TSC II	88,5 % de Gránulos de TSC II
2,8% de Prosolv 90	8,5 % Prosolv 90
1% de Crospovidone XL	2% de Crospovidone XL
1% de Estearato magnésico	1% de Estearato magnésico

15 Etapa 4: Los comprimidos se revistieron con CAP (acetato-ftalato de celulosa)

Para demostrar la diferencia en la absorción en el estómago y en el intestino, se realizaron los siguientes estudios.

Ejemplo 2

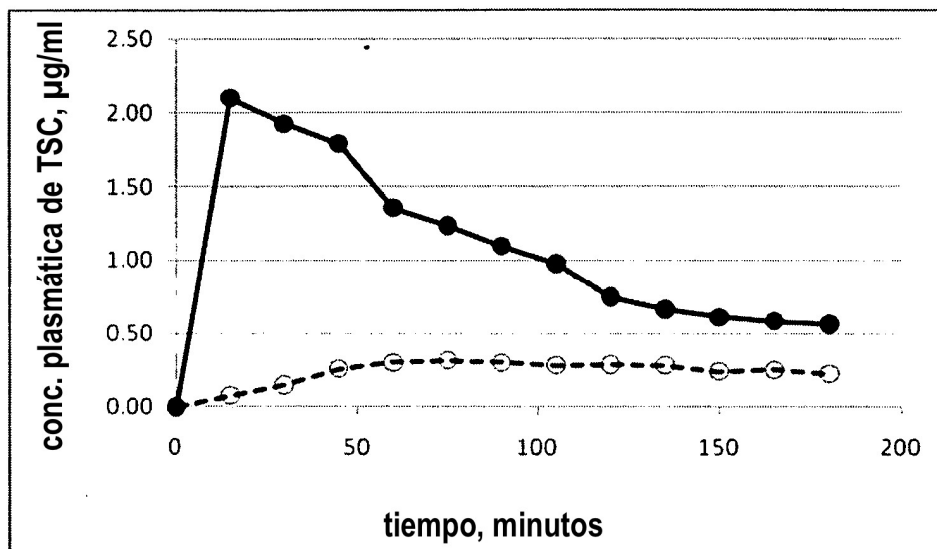
Absorción de soluciones de TSC

20 Ratas Sprague-Dawley (SD) y Wistar macho que pesaban aproximadamente 300-400 g cada una se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de cada experimento. Se dio agua a voluntad y la coprofagia se previno usando jaulas con suelos de malla de alambre. La anestesia se indujo y se mantuvo con isoflurano. La arteria carótida se expuso y se canuló con tubo PE-50. La cánula se aseguró usando suturas de seda y se aplicó a la herida lidocaína al 2%.

25 Después de la canulación, los animales se incluyeron en uno de dos grupos: administración de una formulación de dosificación de TSC directamente en el 1) estómago a través de una sonda; o 2) en un segmento intestinal aislado. Para la dosificación en un segmento intestinal aislado, se realizó una línea media frontal, exponiendo el abdomen y segmentos intestinales. En este estudio, el íleon se aisló y se canuló con tubo PE-50, a continuación se lavó con solución salina normal a 37°C hasta que los lavados corrieran claros. El segmento se recolocó, el abdomen se pinzó y se dejó que la rata se estabilizara durante 1 hora. A continuación, la formulación de TSC se introdujo en el
30 segmento aislado. El intestino se recolocó y el abdomen se cerró con suturas. Se recogieron muestras de sangre de aproximadamente 0,3 ml para la arteria carótida a intervalos de tiempo discretos después de la administración de TSC. Una pequeña cantidad de heparina sódica se usó como un anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron y el volumen de plasma resultante se mezcló con 3 volúmenes de metanol y se sometió a turbulencia.
35 A continuación, la mezcla de plasma se centrifugó y el sobrenadante se analizó mediante HPLC para determinar los niveles de TSC.

La formulación de dosificación de TSC administrada en este estudio consistía en una formulación intravenosa (20

mg/ml de TSC, 8% de γ -ciclodextrina, 50 mM de glicina y 2,3% de manitol). La Figura 1 de la siguiente página muestra que existe un incremento de la biodisponibilidad cuando se administra TSC directamente al intestino delgado en comparación con el estómago.



5 Figura 1. Concentración plasmática media de TSC después de la administración de 2,9 mg/kg de TSC directamente al (●) íleon (dosificación in situ) y al (○) estómago.

Ejemplo 3

Comprimidos revestidos entéricamente (sin ciclodextrina)

10 El TSC se precipita y es prácticamente insoluble bajo el ambiente ácido duro del estómago. El TSC se debe proteger del ambiente duro del estómago y liberarse en una región de pH superior más favorable del intestino delgado. Para este estudio, se elaboraron comprimidos de TSC (Tabla 1) y se revistieron entéricamente bien con Eudragit L100 o bien con acetato-ftalato de celulosa (CAP). La integridad de ambos tipos de revestimientos protectores se confirmó en un estudio de disolución de la USP en el que comprimidos revestidos entéricamente se pusieron en primer lugar en una celda de disolución que contenía fluido gástrico simulado (SGF), a continuación se transfirieron a otra celda que contenía fluido intestinal simulado (SIF). El revestimiento y el comprimido permanecían intactos en el SGF, pero se producía disolución en SIF. Este estudio se realizó según protocolos de la USP.

15

Tabla 1. Formulación de comprimidos de TSC

Combinación de TSC al 65%	Combinación de TSC al 60%
95,2% de Gránulos de TSC II	88,5% de Gránulos de TSC II
2,8% de Prosolv 90	8,5% de Prosolv 90
1% de Crospovidone XL	2% de Crospovidone XL
1% de Estearato magnésico	1% de Estearato magnésico

Estos comprimidos se elaboraron usando tecnología de formación de comprimidos conocida para el experto en la técnica.

20 A continuación, para examinar lo que ocurría con TCS revestido entéricamente, un comprimido revestido con CAP, y que contenía 300 mg de TSC usando la combinación al 65%, se administró oralmente a perros. Se encontraron concentraciones plasmáticas de TSC muy bajas, sugiriendo que la disponibilidad sería demasiado baja para el uso clínico en esta formulación.

Ejemplo 4

Absorción intestinal de TSC y efecto de la ciclodextrina

Se efectuaron estudios adicionales a fin de determinar el efecto sobre la absorción sistémica con la adición de γ -ciclodextrina al TSC.

- 5 Ratas Sprague-Dawley (SD) y Wistar macho que pesaban aproximadamente 300-400 g cada una se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de cada experimento. Se dio agua a voluntad y la coprofagia se previno usando jaulas con suelos de malla de alambre. La anestesia se indujo y se mantuvo con isoflurano. La arteria carótida se expuso y se canuló con tubo PE-50. La cánula se aseguró usando suturas de seda y se aplicó a la herida lidocaína al 2%.
- 10 Después de la canulación, se realizó una línea media frontal, exponiendo el abdomen y segmentos intestinales. En este estudio, el yeyuno se aisló y la formulación de TSC se administró en el yeyuno proximal. Se administraron aproximadamente 60 mg/kg de TSC a diversas relaciones de γ -ciclodextrina de 0,5:1 hasta 4:1 (peso de TSC:peso de γ -ciclodextrina). El movimiento del TSC dentro de los segmentos intestinales no se restringía distalmente a la zona de administración. El intestino se recolocó y el abdomen se cerró con suturas. Se recogieron muestras de
- 15 sangre de aproximadamente 0,3 ml para la arteria carótida a intervalos de tiempo discretos después de la administración de TSC. Una pequeña cantidad de heparina sódica se usó como un anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron y el volumen de plasma resultante se mezcló con 3 volúmenes de metanol y se sometió a turbulencia. A continuación, la mezcla de plasma se centrifugó y el sobrenadante se analizó mediante HPLC para determinar los niveles de TSC.
- 20 Se encontró que la γ -ciclodextrina potencia mucho la absorción del TSC según se muestra en la Figura 3.

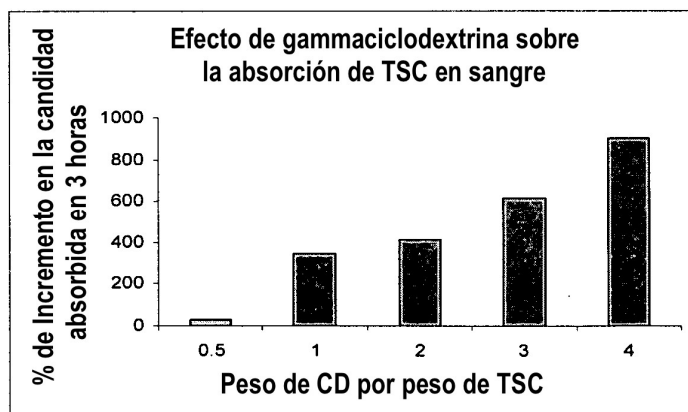
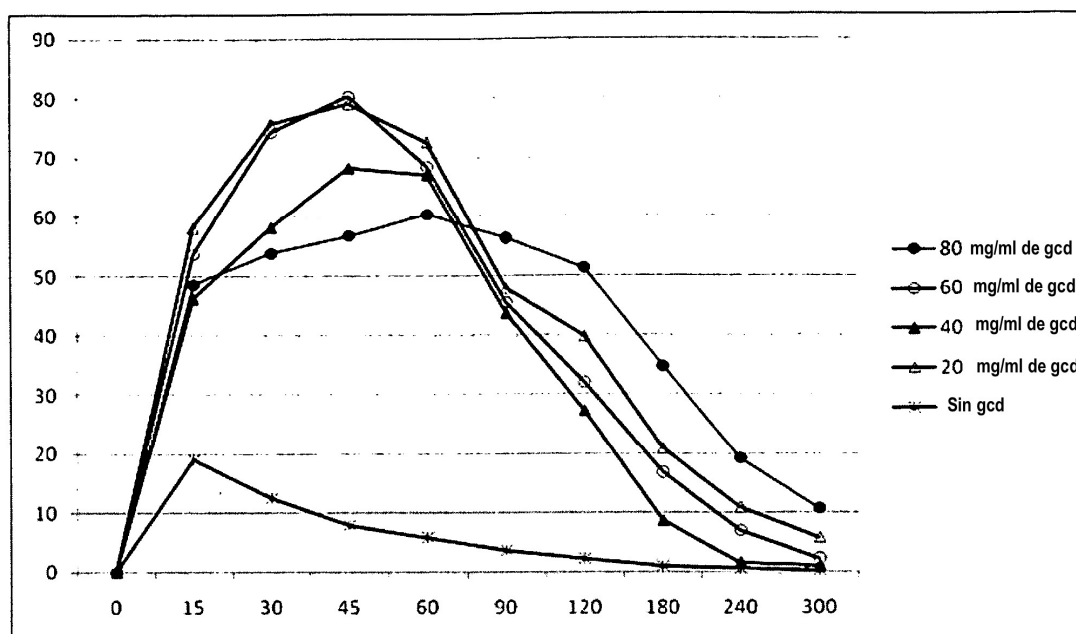


Figura 3: Efecto de γ -ciclodextrina sobre la absorción de TSC en el yeyuno de la rata.

Posteriormente están las curvas de pk después de la administración de TSC in situ en el intestino delgado. Las curvas muestran que la ciclodextrina incrementa significativamente la absorción intestinal de TSC.

La gráfica posterior es la concentración plasmática de TSC ($\mu\text{g/ml}$) frente al tiempo después de la administración (min.).



Ejemplo 5

5 Capacidad de extensión para $C_{\text{máx}}$

Se ha encontrado que la γ -ciclodextrina potencia mucho la absorción sistémica de TSC en el tracto gastrointestinal. La dosificación de TSC usada en el estudio anterior es grande, por lo tanto, se administraron dosis adicionales de TSC con γ -ciclodextrina en una relación de 1:1 (peso de TSC:peso de γ -ciclodextrina) a fin de determinar la capacidad de extensión de la absorción sistémica (en cuanto a la $C_{\text{máx}}$) con respecto a la cantidad de dosificación de TSC. Para el siguiente estudio, se administró TSC al segmento intestinal del yeyuno en las siguientes dosificaciones: 2,5, 5, 10 y 60 mg/kg.

Para este estudio, Ratas Sprague-Dawley (SD) y Wistar macho que pesaban aproximadamente 300-400 g cada una se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de cada experimento. Se dio agua a voluntad y la coprofagia se previno usando jaulas con suelos de malla de alambre. La anestesia se indujo y se mantuvo con isoflurano. La arteria carótida se expuso y se canuló con tubo PE-50. La cánula se aseguró usando suturas de seda y se aplicó a la herida lidocaína al 2%.

Después de la canulación, se realizó una línea media frontal, exponiendo el abdomen y segmentos intestinales. En este estudio, el yeyuno se aisló y la formulación de TSC se administró en el yeyuno proximal. El movimiento del TSC dentro de los segmentos intestinales no se restringía distalmente a la zona de administración. El intestino se recolocó y el abdomen se cerró con suturas. Se recogieron muestras de sangre de aproximadamente 0,3 ml para la arteria carótida a intervalos de tiempo discretos después de la administración de TSC. Una pequeña cantidad de heparina sódica se usó como un anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron y el volumen de plasma resultante se mezcló con 3 volúmenes de metanol y se sometió a turbulencia. A continuación, la mezcla de plasma se centrifugó y el sobrenadante se analizó mediante HPLC para determinar los niveles de TSC.

Los resultados se muestran en la Figura 4. La línea de la Figura 4 es una regresión lineal de los datos, y muestra que se obtiene un excelente ajuste. Esto sugiere que los datos obtenidos para la inclusión de γ -ciclodextrina pueden extenderse para otras dosificaciones de TSC.

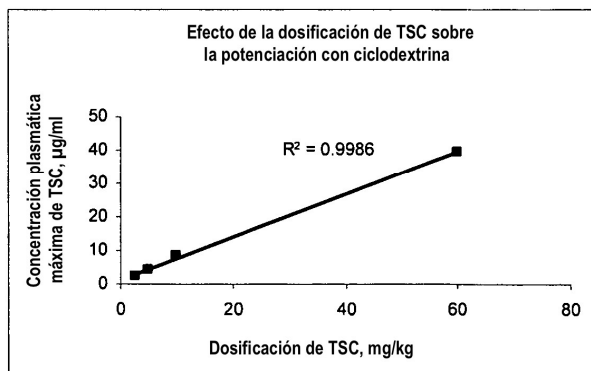


Figura 4: Efecto de la dosificación de TSC en una mezcla de TSC- γ -ciclodextrina sobre la $C_{m\acute{a}x}$

Ejemplo 6

Absorción intestinal con y sin revestimientos entéricos

- 5 Se efectuaron estudios adicionales a fin de investigar el beneficio de incluir γ -ciclodextrina con TSC para el uso en el aporte por vía oral. Para este estudio, TSC y γ -ciclodextrina en una relación de 1:4 (peso de TSC:peso de γ -ciclodextrina) se cargaron en cápsulas de gelatina de tamaño 9 y: 1) bien se dejaron sin revestir, 2) bien se revistieron entéricamente con Eudragit L30D-55 (también denominado LS30D55 en la presente memoria) (un revestimiento que se debe desintegrar a un pH mayor de 5,5) o bien 3) se revistieron entéricamente con Eudragit FS30D (un revestimiento que se debe desintegrar a un pH mayor de 7). También se administraron cápsulas no revestidas que contenían solamente TSC (sin ciclodextrina).

15 Para este estudio, Ratas Sprague-Dawley (SD) y Wistar macho que pesaban aproximadamente 300-400 g cada una se mantuvieron en ayunas durante 24 horas antes de cada experimento. Se dio agua a voluntad y la coprofagia se previno usando jaulas con suelos de malla de alambre. La anestesia se indujo y se mantuvo con isoflurano. La arteria carótida se expuso y se canuló con tubo PE-50. La cánula se aseguró usando suturas de seda y se aplicó a la herida lidocaína al 2%.

20 Después de la canulación, una cápsula de gelatina que contiene producto farmacológico se administró al estómago a través de una jeringa dosificadora (Torpac, Fairfield NJ) seguido por 0,3 ml de agua estéril al estómago a través de sonda. Se recogieron muestras de sangre de aproximadamente 0,3 ml para la arteria carótida a intervalos de tiempo discretos después de la administración de TSC. Una pequeña cantidad de heparina sódica se usó como un anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron y el volumen de plasma resultante se mezcló con 3 volúmenes de metanol y se sometió a turbulencia. A continuación, la mezcla de plasma se centrifugó y el sobrenadante se analizó mediante HPLC para determinar los niveles de TSC.

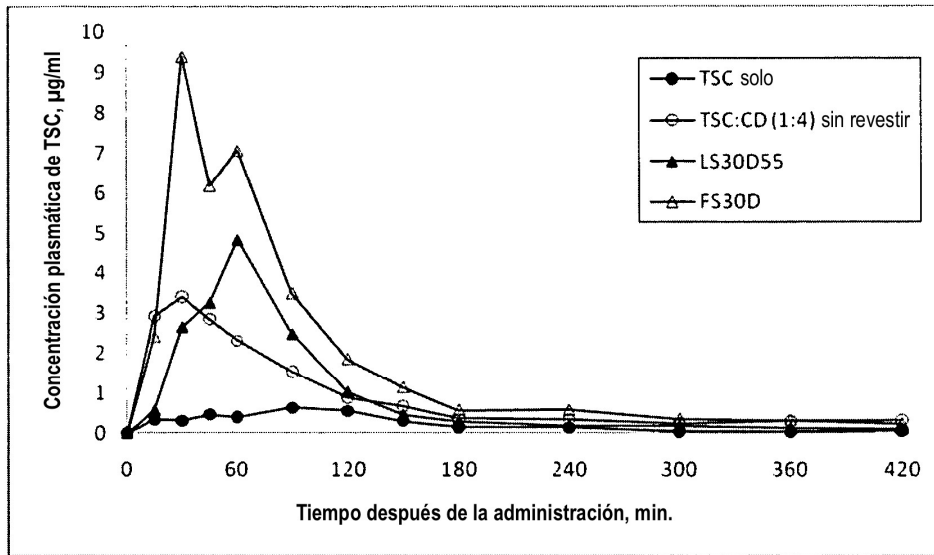
25 La gráfica posterior muestra la concentración en la corriente sanguínea después de la administración oral a ratas a lo largo de un período de 7 horas de polvos secos contenidos en cápsulas de gelatina, conteniendo todas las cápsulas la misma cantidad de TSC (aproximadamente 4 mg).

TSC solo muestra el TSC solo en una cápsula;

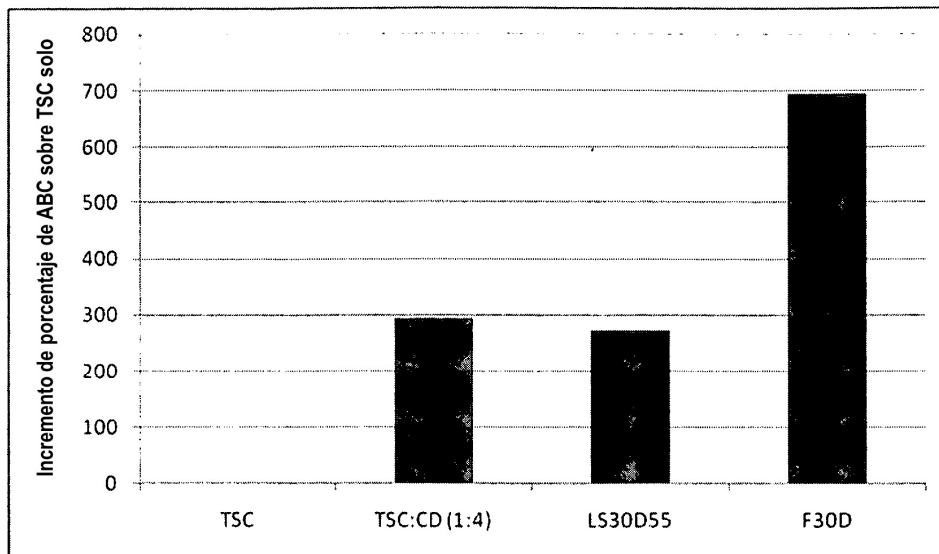
TSC:CD (1:4) no revestido, que es para cápsulas hechas de una mezcla 1 a 4 de TSC a ciclodextrina pero sin revestimiento aplicado a las cápsulas de gelatina;

30 LS30D55, que es para la misma cápsula 1:4 revestida con Eudragit LS30D55 (un revestimiento que se debe desintegrar a un pH mayor de 5,5);

FS30D, que es para la misma cápsula 1:4 revestida con Eudragit FS30D (un revestimiento que se debe desintegrar a un pH mayor de 7).



El gráfico de barras posterior muestra el porcentaje de mejora en la absorción (en comparación con TSC solo) que se obtiene con las cápsulas no revestidas así como las revestidas con los Eudragits.



5 Ejemplo 7

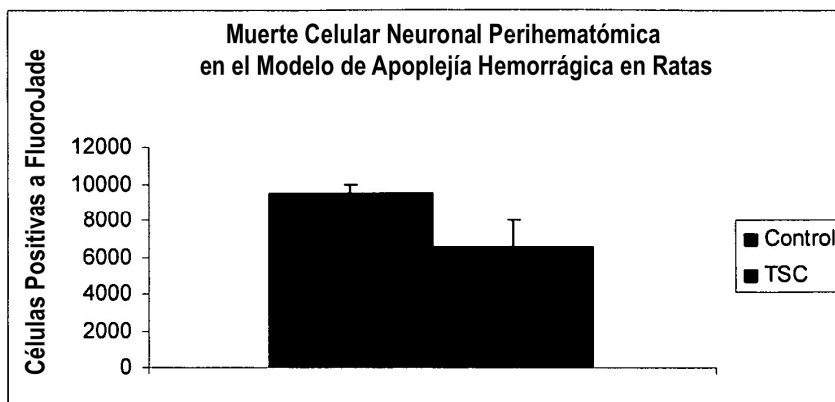
Enfermedad neurodegenerativa

Un aspecto principal de cualquier enfermedad neurodegenerativa es, según se indica anteriormente, la muerte de neuronas. Se han efectuado estudios para examinar los efectos de TSC sobre la muerte neuronal en diferentes modelos de animales.

10 El primer estudio en el que se hizo esto fue uno realizado usando un modelo de apoplejía hemorrágica en ratas. Para ese estudio, la enzima colagenasa se inyectó a través de una trepanación en la calavera en el ganglio basal derecho, que daba como resultado que algunos de los vasos sanguíneos cerebrales se rompieran y sangraran. A continuación, se inyectó TSC empezando 3 horas después de que se administrara la colagenasa, y los animales fueron sacrificados 48 horas después de la administración de la colagenasa.

15 Cuando hay una hemorragia en el cerebro, la sangre se reúne y forma un hematoma. Alrededor de la periferia de este hematoma, hay una muerte de células neuronales. Sin embargo, se encontró que el tratamiento con TSC daba como resultado aproximadamente 20% menos de muerte de las neuronas. El uso del colorante fluorojade permite contar los números de neuronas "muertas" en una sección cerebral dada del cerebro. Esto se realizó en la zona alrededor de los hematomas formados en el modelo de apoplejía hemorrágica en ratas. Se encontró que había

aproximadamente 30% menos de muerte neuronal en los animales tratados con TSC según se muestra en el gráfico posterior.

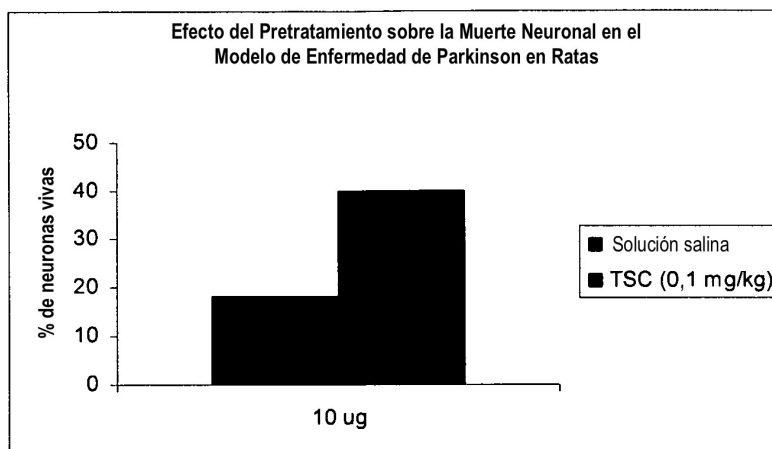


5 Otro modelo que se usó que examinaba el efecto del TSC sobre la viabilidad neuronal es un modelo de enfermedad de Parkinson en ratas. En este modelo, se realiza una trepanación a través de la calavera y en la región de la sustancia negra. La afección similar a la enfermedad de Parkinson es inducida al inyectar 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en el cerebro. Una cantidad de 10 µg de 6-OHDA se inyecta frecuentemente en este modelo, y se usó en el primer estudio.

10 El primer estudio con este modelo se diseñó para imitar un estudio encontrado en la bibliografía, tratamiento en el que se encontró que la crocetina tenía un efecto beneficioso sobre la muerte neuronal después de la inyección de 10 µg de 6-OHDA. En el estudio, se inyectó TSC en una dosificación de 0,1 mg/kg durante 7 días que precedían a la inyección de la 6-OHDA (el mismo régimen de dosificación que se había realizado en el estudio con crocetina). Después de la inyección de la 6-OHDA, no se administraron más tratamientos a lo largo de las siguientes 4 semanas.

15 En ese momento, las ratas fueron sacrificadas y los cerebros se extirparon y se enviaron a Charles River Laboratories para los recuentos de neuronas vivas. Esto daba como resultado recuentos en el lado derecho del cerebro, en el que se ha inyectado la 6-OHDA, así como en el lado izquierdo no tratado del cerebro. Esto permitía la comparación de la muerte celular (recuento en el lado tratado/recuento en el lado no tratado) de los controles, que se habían pretratado con solución salina, con los animales pretratados con TSC. El gráfico posterior muestra estos resultados.

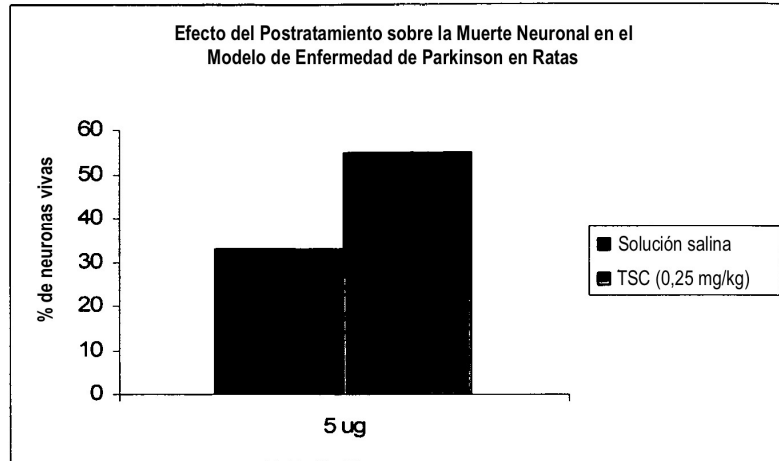
20



Como se puede observar, el porcentaje de neuronas vivas después de este tratamiento es aproximadamente el doble. También se debe apuntar que este es un modelo muy intensivo de muerte neuronal, en el que alrededor de 85% de las neuronas mueren en los controles.

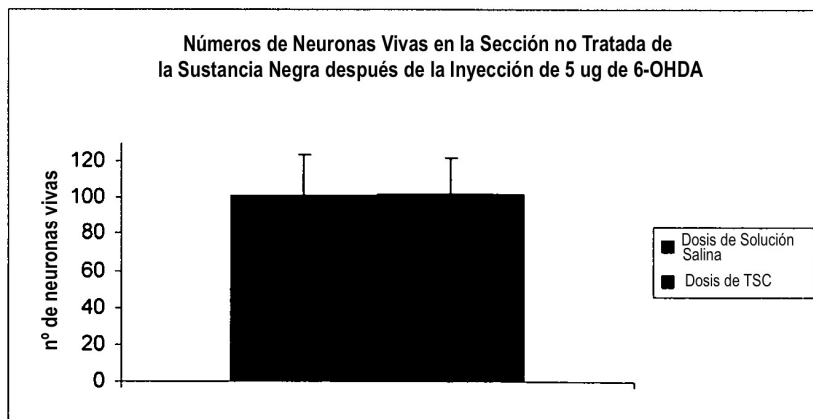
25 Es de mucho más interés conocer el efecto del postratamiento sobre la muerte neuronal después de la inyección de

6-OHDA. Para investigar eso, se inyectaron de nuevo 5 µg de 6-OHDA en la sustancia negra como antes, pero el tratamiento comenzaba después de esa inyección. A continuación, se administraron a los animales inyecciones diarias de TSC (0,25 mg/kg) durante 4 semanas antes del sacrificio. Los cerebros se extirparon y se enviaron a Charles River Laboratories para los recuentos neuronales.



5 Como se observa, hay más neuronas vivas (aproximadamente 20% más) con el tratamiento con TSC, y estos datos son diferentes de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

10 Un resultado interesante de este estudio era que las secciones cerebrales del lado sin 6-OHDA de los cerebros mostraban casi los mismos números de neuronas vivas independientemente de si se inyectaba solución salina o TSC, según se muestra en el gráfico posterior. Esto demuestra que el TSC no tenía efecto sobre la viabilidad de neuronas vivas.



Estos resultados, combinados con los encontrados en el modelo de apoplejía hemorrágica, muestra que el TSC ejerce un efecto neuroprotector en el cerebro.

15 Ejemplo 8

Quimioterapia con TSC

20 El modelo de metástasis pulmonar en ratones es un modelo ampliamente usado para la evaluación de la terapia de tumores. Con células B16 (melanoma de ratón), esencialmente todas las células son "transportadas" durante la inyección celular intravenosa en la vena caudal, y los tumores se forman preferentemente en los pulmones. Así, el término metástasis pulmonar se usa ampliamente aunque cada nódulo pulmonar resultante sea técnicamente un tumor "primario" independiente en lugar de una metástasis verdadera.

Puesto que la melanina en las células B 16 no se blanquea como el resto de los tejidos pulmonares, los nódulos tumorales se pueden visualizar fácilmente después de blanquear los pulmones extraídos en solución de Fekete. Sin embargo, siempre hay una fracción de nódulos que es amelanótica ("blanca") y esto requiere un recuento cuidadoso

a fin de no sobreestimar la carga tumoral.

Para los presentes estudios, se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra de ocho semanas de edad de Charles River Laboratories. Los ratones se alojaron en grupos de 5 o menos, y recibían alimento y agua a voluntad.

5 Células B16 fueron cultivadas por the Center for Cell Signaling of the University of Virginia usando un protocolo estándar. Las células se recibieron mientras estaban en una fase de crecimiento exponencial. Las células se suministraron en una concentración de 5×10^5 células/ml en solución salina tamponada de Hank (HBSS).

Las células se inyectaron inmediatamente al recibirse, y este día se denominó el Día 0. El Día 0, todos los ratones fueron inyectados intravenosamente en la vena caudal con 0,1 ml de la suspensión celular, lo que significa que cada ratón recibía $0,5 \times 10^5$ células. A continuación, los ratones se dejaron hasta el Día 4.

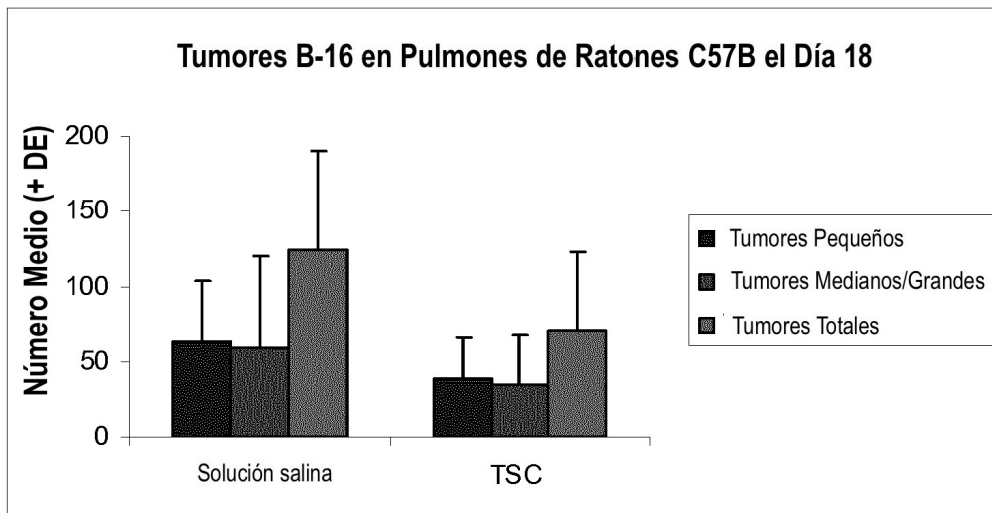
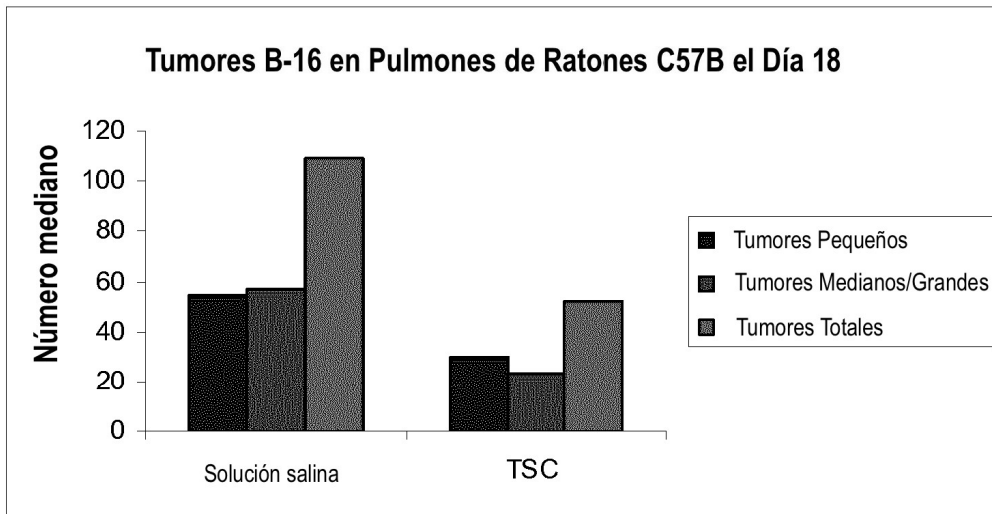
10 El Día 4, los ratones se dividieron en dos grupos: El Grupo A, que consistía en 5 ratones, recibía una inyección intravenosa de 0,05 ml de solución salina en la vena caudal. El Grupo B, compuesto por 7 ratones, recibía una inyección intravenosa de 0,05 ml de solución de TSC en la vena caudal, para una dosificación de TSC de 0,142 mg/kg/día. Las mismas inyecciones se repitieron los Días 5 - 8 y los Días 11 - 15. El Día 18, los ratones fueron sacrificados usando dióxido de carbono. Los pulmones se extirparon, se enjuagaron y se pusieron en solución de Fekete y se almacenaron a temperatura ambiente.

20 Más tarde, los pulmones se evaluaron visualmente, en orden enmascarado aleatorio, para obtener un recuento visual de los números de tumores. Se encontró que había una mezcla de tumores pequeños más tumores de tamaño mediano y mayores. Así, los tumores se contaron visualmente en dos grupos separados: tumores pequeños y tumores medianos/grandes. Aunque la mayoría de los tumores eran negros, también había algunos tumores blancos.

Los resultados de los recuentos de tumores se muestran en la tabla y en los siguientes gráficos. La tabla muestra los números medianos (med.) de cada tipo de grupo de tumor así como la media \pm desviación estándar. El primer gráfico muestra los valores medianos y el segundo gráfico muestra los valores medios. Los grupos no eran estadísticamente diferentes debido a las grandes desviaciones estándar.

25 Tabla

Grupo	Pequeño			Mediano/Grande		Total	
	N	med.	media	med.	media	med.	media
Solución salina	5	55	64 \pm 40	57	60 \pm 27	109	124 \pm 66
TSC	7	18	32 \pm 29	19	30 \pm 24	34	62 \pm 53



Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que se pueden realizar numerosas modificaciones y adiciones tanto a los presentes compuestos como composiciones sin apartarse de la invención divulgada.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

i) una sal de carotenoide trans bipolar que tiene la estructura:



5 donde

Y = un catión que puede ser igual o diferente,

Z = un grupo polar que puede ser igual o diferente y que está asociado con el catión, y

10 TCRO = un esqueleto de carotenoide trans lineal con dobles enlaces y enlaces sencillos carbono-carbono conjugados y que tiene grupos colgantes X, en donde los grupos colgantes X, que pueden ser iguales o diferentes, son (1) un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado que tiene 10 átomos de carbono o menos, o (2) un halógeno,

ii) una ciclodextrina, y

iii) un revestimiento entérico.

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, para el uso en el incremento de la difusividad de oxígeno en un mamífero mediante administración oral.

15 3. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, para el uso en el tratamiento de la hipoxia en un mamífero mediante administración oral.

4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, para el uso en la prevención de la hipoxia en un mamífero mediante administración oral.

20 5. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3 o 4, en donde dicha hipoxia se selecciona del grupo que consiste en isquemia, cáncer, lesión cerebral traumática, una enfermedad respiratoria, choque hemorrágico, una enfermedad cardiovascular, insuficiencia orgánica múltiple, aterosclerosis, arteriopatía periférica, vasculopatía periférica, infarto de miocardio, enfisema, asma, lesión pulmonar aguda, síndrome de fatiga respiratoria aguda, neumopatía obstructiva crónica, hipertensión, edema cerebral, papilomas, lesión de la médula espinal, apoplejía y afecciones del sistema nervioso central.

25 6. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, en donde la sal de carotenoide trans bipolar es crocetinato sódico trans .

7. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, en donde la sal de carotenoide trans bipolar es crocetinato sódico trans y la ciclodextrina es γ -ciclodextrina.

30 8. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, en donde el revestimiento es un revestimiento entérico que liberará el carotenoide trans bipolar a un pH mayor de 5,5 o a un pH mayor de 6,5.

9. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, en donde el revestimiento es un revestimiento que liberará el carotenoide trans bipolar en el intestino o el revestimiento es un polímero de acrilato.

10. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, en donde la ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina.

35 11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, en donde la sal de carotenoide trans bipolar es crocetinato sódico trans sintético en el que el nivel de pureza del isómero trans en la composición es tal que, bajo análisis UV-visible, la absorbancia del pico más alto que se produce en el intervalo de longitud de onda visible dividida por la absorbancia del pico que se presenta en el intervalo de longitud de onda UV es mayor que 7,5.

40 12. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, en donde dicha composición está en la forma de dosificación unitaria.

13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 2 o 3, en donde dicha composición está en la forma de un comprimido, una píldora o una cápsula.