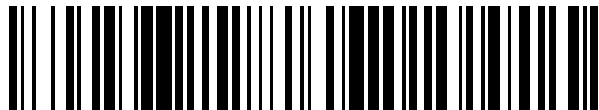


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 649**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/21** (2006.01)

**A61K 9/20** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2013 PCT/EP2013/061128**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13178713**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2013 E 13725972 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 2854794**

54 Título: **Gránulos estabilizados que contienen trinitrato de glicerilo para inducir la arteriogénesis**

30 Prioridad:

**31.05.2012 EP 12004188**  
**31.05.2012 US 201261653601 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.03.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GORATH, MICHAELA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 704 649 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

Gránulos estabilizados que contienen trinitrato de glicerilo para inducir la arteriogénesis

La presente invención se refiere a un dador de NO para uso en métodos de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial mediante la administración de un dador de NO (óxido nítrico).

5 Las enfermedades cardiovasculares, así como otras enfermedades que implican una insuficiencia cardiovascular y, más específicamente, una insuficiencia arterial, afectan a una población creciente de pacientes, encabezan las estadísticas internacionales de mortalidad y morbilidad y tienen una enorme importancia económica. En Alemania, por ejemplo, aproximadamente 280000 pacientes sufren cada año un infarto cardíaco, y mueren aproximadamente 65000 pacientes.

10 Una importante causa para una enfermedad cardiovascular es la oclusión parcial o completa de los vasos arteriales que da como resultado un suministro reducido de oxígeno y nutrientes del tejido abastecido por el vaso arterial.

La angina de pecho, el dolor torácico, es un síndrome clínico que refleja un suministro inadecuado de oxígeno para las demandas metabólicas miocárdicas que da como resultado isquemia y generalmente es causado por obstrucción (estenosis), espasmo de las arterias coronarias, disfunción endotelial o microvascular.

15 La arteriogénesis es un proceso en el cual pequeñas conexiones colaterales arteriolares ya preexistentes se pueden desarrollar hasta arterias de conductancia funcional completa que esquivan el sitio de una oclusión arterial y/o compensan el flujo sanguíneo a territorios isquémicos abastecidos por la arteria insuficiente. Por consiguiente, la arteriogénesis es un mecanismo endógeno altamente eficaz para el mantenimiento y la regeneración del flujo sanguíneo después de un suceso oclusivo agudo o crónico en un vaso arterial. En este caso las conexiones colaterales pueden funcionar como derivaciones naturales.

20 La arteriogénesis es un proceso distinto de la angiogénesis o neovascularización, donde tiene lugar una formación *de novo* de vasos arteriales (Buschmann I and Schaper W., Journal of Pathology, 2000, 190: 338-342).

25 La nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) se usa desde hace décadas como agente vasodilatador en enfermedades cardiovasculares tales como la enfermedad de las arterias coronarias (CAD, también cardiopatía isquémica o cardiopatía coronaria), que es la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo. (McGrae McDermott, Journal of the American Medical Association, 2007, 297 (11): 1253-1255). La nitroglicerina se ha utilizado únicamente para tratar los síntomas de estas enfermedades, por ejemplo, la angina de pecho estable debido a su efecto vasodilatador sobre venas y arterias, lo que resulta en una reducción de la carga de trabajo y consumo de energía del corazón (al disminuir la precarga y la poscarga), así como un aumento del suministro de oxígeno al miocardio (al dilatar las arterias coronarias). Estos síntomas incluyen dolor en el pecho, presión, malestar o disnea. Sin embargo, la nitroglicerina no se ha utilizado para curar la enfermedad subyacente ni para mejorar su pronóstico.

30 Por consiguiente, la nitroglicerina ha sido y es utilizada principalmente para el alivio agudo o la profilaxis de los ataques de angina de pecho, el síntoma más común de la enfermedad de las arterias coronarias (Fox K. *et al.*, Guidelines on the management of stable angina pectoris: full text. The Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. European Heart Journal doi:10.1093/eurheartj/eh1002; Gibbons R.J. *et al.*, ACC/AHA/ACP-ASIM Guidelines for the Management of Patients With Chronic Stable Angina. Journal of the American College of Cardiology, 1999, 33 (7): 2092-2197).

35 En la técnica, se ha descrito que la nitroglicerina no es capaz de inducir la angiogénesis (neovascularización) ni la arteriogénesis en un entorno donde esta sustancia ha sido administrada continuamente (Hopkins S. P. *et al.*, Journal of Vascular Surgery, 1998, 27 (5): 886-894; Troidl K. *et al.*, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2010, 55 (2): 153-160).

40 Los dadores de NO de acción prolongada que abarcan el grupo de diolatos de diazenio y triolatos de diazenio (también denominados NONOatos) han sido implicados en la inducción y/o en la mejora de la formación de colaterales en el tratamiento de las enfermedades arteriales por medio de la administración de bombas de flujo continuo (Schaper W., DE 10 2008 005 484 A1). Un comprimido de nitroglicerina y su método de fabricación está descrito, por ejemplo, en el documento WO 99/17766 A1.

45 Existe la necesidad de proporcionar agentes para promover la circulación colateral.

50 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un dador de NO para uso en un método para tratar o prevenir una insuficiencia arterial, en donde se administra un dador de NO de manera intermitente a un sujeto en una cantidad eficaz para la inducción de la arteriogénesis. y en donde el dador de NO es trinitrato de glicerilo en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaringea u oral caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de trinitrato de glicerilo (GTN), al menos un diluyente, un material portador y al menos una sustancia que reduce la volatilidad del GTN, por lo que esta sustancia es un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C, en donde el dador de NO se administra al menos una vez al día y al menos un día a la semana durante al menos dos semanas.

55

- La invención se refiere además a un dador de NO para uso en un método de reducción de los efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que es antiarteriogénico o que inhibe la arteriogénesis, en donde el dador de NO se administra a un sujeto sometido a dicho tratamiento. en una cantidad y manera eficaces para la inducción de la arteriogénesis, en donde el dador de NO es trinitrato de glicerilo en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaríngea u oral caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de trinitrato de glicerilo (GTN), al menos un diluyente, un material portador y al menos una sustancia que reduce la volatilidad de GTN, por lo que esta sustancia es un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C, en particular en donde el dador de NO se define según la presente invención.
- Se describe además un método para tratar o prevenir una insuficiencia arterial, en donde se administra un dador de NO de manera intermitente a un sujeto en una cantidad eficaz para la inducción de la arteriogénesis, y en donde el dador de NO es GTN en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaríngea u oral caracterizada por que contiene un absorbato que comprende entre 0,05 y 2 % en peso de GTN y un estabilizante éster no volátil en un material portador.
- En el contexto de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que los dadores de NO, en particular los dadores de NO de acción corta son efectivos en la inducción de la arteriogénesis incluso aunque no se administren de manera constante sino de una manera en la que los niveles plasmáticos sólo se elevan durante un tiempo corto. Además, se ha encontrado sorprendentemente que el uso intermitente del trinitrato de glicerilo (GTN, también conocido como nitroglicerina) dador de NO de acción corta es particularmente eficaz y muestra un efecto pro-arteriogénico mayor que un nitrato de acción prolongada (véase la sección de ejemplos). Por consiguiente, la presente invención proporciona agentes eficaces para la promoción de la circulación colateral. Basándose en el descubrimiento de que los dadores de NO, en particular los dadores de NO de acción corta son capaces de inducir la arteriogénesis, la presente invención proporciona ahora una herramienta eficaz para prevenir y tratar una insuficiencia arterial.
- El término "dador de NO de acción corta", como se usa en la presente memoria, generalmente se refiere al propio NO o a un dador de NO que libera NO rápidamente, con un tiempo de semivida corto de menos de, por ejemplo, 60, 45, 30, o preferiblemente 15 minutos, después de haber sido administrado a un sujeto. Los ejemplos de dadores de NO de acción corta incluyen, pero no se limitan a nitroglicerina (trinitrato de glicerilo), nitrito de amilo y nitroprusiato de sodio.
- En el contexto de la presente invención, el dador de NO de acción corta es preferiblemente nitroglicerina (trinitrato de glicerilo).
- La nitroglicerina tiene la ventaja de que es un agente seguro y clínicamente establecido.
- Según la presente invención, el término "tratamiento" o "prevención" significa que no solo se alivian los síntomas de la enfermedad, sino que también se trata o previene la propia enfermedad. En una realización preferida, el término "tratamiento" significa mejorar el pronóstico de dicha enfermedad.
- Según la invención, el término "insuficiencia arterial" se refiere a cualquier suministro insuficiente de sangre o de oxígeno o cualquier otro suministro insuficiente de un tejido que es proporcionado por una arteria. Este suministro insuficiente se puede corregir por los métodos y usos de la presente invención en donde se usa un dador de NO para aumentar el suministro de un tejido dado. La insuficiencia arterial puede ocurrir tanto durante el reposo físico como durante el ejercicio.
- En una realización preferida de la presente invención, la insuficiencia arterial es debida a un suministro insuficiente de oxígeno o de sangre a un tejido suministrado por la arteria o por un bypass o derivación durante el reposo físico o el ejercicio.
- Según una realización adicional preferida, la insuficiencia arterial es debida a un aumento de la demanda de oxígeno o de flujo sanguíneo de un tejido suministrado por la arteria o por un bypass o derivación.
- Este aumento de la demanda de oxígeno o de flujo sanguíneo puede tener varias causas, que incluyen pero no se limitan al aumento de la actividad deportiva o física, y al aumento de la actividad mental o a una enfermedad que requiere una mayor demanda de oxígeno o de flujo sanguíneo.
- 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, el término "oclusión parcial" es equivalente a una estenosis.
- La oclusión parcial o completa de un vaso arterial es un fenómeno bien conocido. Puede tener varias causas, que incluyen, pero no se limitan a la deposición de material en los vasos sanguíneos (incluyendo las estenosis no revascularizables), la compresión del tejido externo o fluido cercanos al vaso (incluyendo la alteración en la relajación diastólica del miocardio), el espasmo vascular, la disfunción del endotelio del vaso que produce una vasoconstricción paradójica durante el ejercicio o el deterioro microvascular debido a disfunción endotelial o anomalías de las células del músculo liso.

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

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

5 En una realización preferida adicional, la insuficiencia arterial es debida a una compresión externa o interna de una arteria.

10 La compresión interna de una arteria puede ser debida 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, tiene lugar a veces en una disfunción endotelial o en pequeños vasos arteriales oprimidos debido a una disfunción de las células endoteliales o del músculo liso.

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

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

15 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 adicional preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial coronaria.

20 En una realización preferida, la insuficiencia coronaria es una insuficiencia arterial coronaria aterosclerótica, en particular enfermedad de las arterias coronarias (cardiopatía coronaria o cardiopatía isquémica), angina de pecho estable, angina de pecho inestable, isquemia de miocardio o isquemia de miocardio crónica, síndrome coronario agudo, o infarto de miocardio (infarto de miocardio o infarto de miocardio isquémico).

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

25 En una realización adicional preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial cerebral (intra o extracraneal).

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, pre-ictus, ataque isquémico transitorio (mini ictus), ictus, demencia vascular, enfermedad cerebral isquémica, o enfermedad cerebrovascular isquémica.

30 La insuficiencia arterial cerebral también puede ser una enfermedad cerebral microvascular isquémica, demencia vascular de vasos pequeños, encefalopatía arterioesclerótica subcortical (enfermedad de Binswanger), enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson.

En una realización preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial periférica.

35 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), incluyendo la enfermedad arterial de las extremidades inferiores y superiores).

40 En una realización preferida, la insuficiencia arterial periférica es una insuficiencia arterial periférica no aterosclerótica, en particular el síndrome de Raynaud (vasoespasmos), la tromboangiitis obliterante, endangiitis obliterante o enfermedad de Buerger (inflamación progresiva recurrente y trombosis (formación de coágulos) de arterias y venas pequeñas y medias de las manos y de los pies), enfermedad vascular inflamatoria (vasculitis), isquemia diabética, neuropatía diabética y síndromes compartimentales.

En una realización adicional preferida, 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.

45 En una realización adicional preferida, la insuficiencia arterial puede ser una insuficiencia arterial urogenital, en particular una insuficiencia arterial urogenital aterosclerótica, en particular disfunción eréctil, enfermedad de la arteria renal, isquemia renal o infarto renal.

En una realización adicional preferida, la insuficiencia arterial puede ser una insuficiencia arterial nerviosa, en particular tinnitus.

50 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 retiniana central, en particular una insuficiencia de la arteria retiniana aterosclerótica, en particular la insuficiencia arterial ocular.

5 En una realización adicional preferida, la insuficiencia arterial se caracteriza por la ausencia de una disfunción endotelial.

La disfunción endotelial es un estado patológico sistémico del endotelio bien conocido y puede ser definido ampliamente como un desequilibrio entre sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras producidas por el endotelio o que actúan sobre el endotelio.

10 En una realización adicional preferida, la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial crónica. En el contexto de la presente invención, el término "insuficiencia arterial crónica" significa que el curso de la insuficiencia arterial es crónico y, a menudo, progresivo.

15 Según una realización adicional preferida, la insuficiencia arterial crónica incluye la disfunción endotelial, aterosclerosis, enfermedad de las arterias coronarias (cardiopatía coronaria o cardiopatía isquémica), angina de pecho estable, enfermedad microvascular coronaria o enfermedad de vasos pequeños, angina de Prinzmetal y síndrome cardíaco X, demencia vascular, enfermedad cerebral isquémica 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 de la arteria periférica (PAD) o enfermedad oclusiva de la arteria periférica (PAOD), tromboangiitis obliterante, endangiitis obliterante o enfermedad de Buerger, enfermedad inflamatoria vascular (vasculitis), displasia fibromuscular, isquemia diabética, neuropatía diabética, enfermedad isquémica del intestino, disfunción eréctil, enfermedad de la arteria renal, tinnitus y esclerodermia (esclerosis sistémica).

25 El dador de NO utilizado en el contexto de la presente invención es GTN que, según un aspecto de la invención, se encuentra en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaringea u oral caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de trinitrato de glicerilo (GTN), al menos un diluyente, un material portador y al menos una sustancia que reduce la volatilidad de GTN, por lo que esta sustancia es un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C.

En el contexto de la presente invención, los términos "GTN" o "nitroglicerina" se usan simultáneamente.

30 La presente invención aprovecha el sorprendente hallazgo de que se pueden fabricar preparaciones no líquidas de GTN muy estables utilizando un nuevo procedimiento en donde el GTN se combina con ésteres de ácido carboxílico no volátiles. Los ésteres que son adecuados para este fin son aquellos con un punto de fusión de 60 °C o menos y que pueden ser líquidos o adoptar una consistencia pastosa o semisólida a temperatura ambiente que varía de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 25 °C. Como se describe en esta memoria, se ha descubierto ahora que se obtiene una preparación de GTN no líquida muy estabilizada cuando GTN, flegmatizado en un diluyente adecuado para formar un concentrado de GTN, se pone a continuación en contacto con un material portador adecuado dando como resultado una suspensión que contiene GTN que se mezcla después (o al mismo tiempo) con un estabilizante adecuado según las enseñanzas proporcionadas en esta memoria. El absorbato resultante que contiene GTN es muy estable. El absorbato resultante puede estar en forma de polvo o gránulos. El absorbato también se puede presionar para formar una composición tipo comprimido. Sin querer limitarse a la teoría, el estabilizante atrapa el GTN sobre y/o dentro del material portador, evitando de este modo la volatilización o el escape del GTN desde el absorbato no líquido. Por lo tanto, la invención da como resultado una vida útil muy prolongada y una estabilidad mejorada en comparación con las preparaciones de GTN convencionales, incluyendo GTN en un diluyente utilizado habitualmente con fines de flegmatización.

45 La presente invención es un avance significativo en la preparación y la disponibilidad clínica de medicamentos estabilizados con una vida útil prolongada cuyo ingrediente activo es, por su naturaleza, volátil e inestable tal como, pero sin estar limitado, el trinitrato de glicerilo. La presente invención tiene implicaciones de largo alcance para la química médica y las formulaciones no disponibles hasta ahora.

50 Ciertas preparaciones preferidas contienen entre 0,1 y 1 % en peso de trinitrato de glicerilo. El estabilizante éster no volátil puede ser sólido o semisólido a una temperatura de 20 °C en ciertas realizaciones preferidas, mientras que el estabilizante éster no volátil puede ser líquido en otras. En realizaciones preferidas, el estabilizante éster no volátil se selecciona del grupo que consiste en: mono y diglicéridos, glicéridos polietoxilados, ésteres de ácido láctico, succinato de D-alfa tocoferil polietilenglicol 1000 y triglicéridos sólidos, y mezclas de cualquiera de estas sustancias. El estabilizante éster no volátil se puede usar en una concentración de 0,2 a 10 % en peso, con respecto al peso total de la preparación. Según la presente invención, el GTN, el diluyente y el estabilizante forman una preparación homogénea en algunas realizaciones. En realizaciones actualmente preferidas, la relación en masa del estabilizante éster no volátil al GTN está entre 2 y 40; y la relación de masa del diluyente al estabilizante éster no volátil está entre 1 y 9,5. En algunas realizaciones preferidas, el material portador se selecciona del grupo que consiste en: aluminometasilicato de magnesio, fosfato dibásico de calcio, isomalt y mezclas de cualquiera de los anteriores.

Según la presente invención, la preparación farmacéutica sólida descrita anteriormente puede incluir además al menos un excipiente adecuado para administración sublingual, que se selecciona del grupo que consiste en: mono, di y polisacáridos solubles en agua, así como sus alcoholes. En realizaciones actualmente preferidas, el excipiente adecuado para administración sublingual se selecciona del grupo que consiste en: fructosa, glucosa, isomalt, lactosa, maltosa, maltitol, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa y xilitol y mezclas de cualquiera de los anteriores. En realizaciones particularmente preferidas, el excipiente adecuado para administración sublingual es xilitol y/o isomalt a concentraciones entre 20 y 95 % en peso. En realizaciones aún más preferidas, el excipiente adecuado para administración sublingual es isomalt, que está contenida en concentraciones entre 70 y 95 % en peso, con respecto al peso total de la preparación.

En aún otras realizaciones de la preparación farmacéutica sólida, la preparación comprende además al menos 0,01 a 3,0 % en peso de un agente aromatizante.

En una realización particularmente preferida, la preparación farmacéutica sólida para administración bucofaringea u oral contiene un absorbato que comprende entre 0,05 y 2 % en peso de GTN y un estabilizante éster no volátil sobre un material portador.

Según las enseñanzas de la presente invención, cualquiera de las preparaciones farmacéuticas sólidas anteriores puede estar en forma de polvo suelto o gránulos sueltos. Se pueden envasar como dosis unitarias en la forma de un *stick pack* (envase tubular monodosis) o sobre.

En otro aspecto, se describe un procedimiento para la fabricación de una preparación farmacéutica con la sustancia activa trinitrato de glicerilo para administración bucofaringea u oral, caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de trinitrato de glicerilo (GTN), comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) preparar una mezcla que comprende al menos un material portador seleccionado del grupo que consiste en: aluminometasilicato de magnesio, fosfato dibásico de calcio, fructosa, glucosa, isomalt, lactosa, maltosa, maltitol, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa, xilitol y mezclas de cualquiera de los anteriores; b) preparar una solución de GTN que comprende al menos un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C; c) añadir paso a paso la solución de GTN al material portador; y d) mezclar hasta que la sustancia activa se haya distribuido homogéneamente, seguido opcionalmente por una etapa de secado.

La preparación utilizada en el contexto de la presente invención se puede producir mediante un procedimiento para la fabricación de una preparación farmacéutica sólida con la sustancia activa GTN para administración bucofaringea u oral caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de GTN, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) preparar una solución de GTN que comprende GTN flegmatizado y al menos un estabilizante éster no volátil; b) añadir paso a paso la solución de GTN formada en la etapa a) a un material portador; c) opcionalmente añadir los excipientes adicionales; d) mezclar hasta que la sustancia activa se haya distribuido homogéneamente, seguido opcionalmente por una etapa de secado.

La preparación utilizada en el contexto de la presente invención se puede producir además mediante un procedimiento para la fabricación de una preparación farmacéutica sólida con la sustancia activa GTN para administración bucofaringea u oral caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de GTN, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) proporcionar GTN mezclado con al menos un estabilizante éster no volátil; b) añadir paso a paso la mezcla GTN-estabilizante de la etapa a) a un material portador; c) opcionalmente añadir los excipientes adicionales; y d) mezclar hasta que la sustancia activa se haya distribuido homogéneamente, seguido opcionalmente por una etapa de secado.

Con fines de clarificación, y sin pretender de ninguna manera que sea limitante, se proporciona la siguiente definición de términos utilizados en esta memoria:

Diluyente es una sustancia que permite la flegmatización de una sustancia volátil tal como el GTN y permite la preparación segura de un concentrado líquido. Como se describe también en otra parte de la presente memoria, los diluyentes adecuados incluyen, por ejemplo (pero sin limitarse a ellos), triglicéridos de cadena media (MCT) (por ejemplo, C<sub>6-12</sub>), propilenglicol y etanol. Por ejemplo, cuando se hace referencia en la presente memoria a un concentrado de GTN, es GTN flegmatizado en un diluyente adecuado tal como, por ejemplo, MCT.

Estabilizante es una sustancia que aumenta la estabilidad de una sustancia volátil tal como el GTN por encima de la que presenta la sustancia en un mero diluyente. Como se describe también en otra parte de la presente memoria, los estabilizantes adecuados incluyen, pero no se limitan a ésteres de ácido carboxílico no volátiles. En términos generales y como se describe en otra parte en esta memoria, los estabilizantes adecuados se pueden seleccionar de un grupo de ésteres de ácido carboxílico con una polaridad similar a la del GTN y que pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos a temperatura ambiente pero que se licúan a aproximadamente 60 °C. Para los fines de la presente invención, los MCT tales como, por ejemplo, los triglicéridos de cadena media según la Farmacopea Europea no se contemplan como estabilizantes dentro de las enseñanzas de la presente invención.

El material portador es una sustancia no líquida que hace que una composición según la presente invención sea un polvo o un gránulo. Como se describe también en otra parte de la presente memoria, los materiales portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, hidratos de carbono solubles en agua y sus respectivos alcoholes, tales

como, pero sin limitarse a ellos, isomalt, que tiene una estructura porosa y compuestos inorgánicos con estructuras porosas tales como, pero sin limitarse a ellos, fosfato dibásico de calcio anhidro y aluminometasilicato de magnesio, o mezclas de cualquiera de los anteriores.

5 Absorbato como se usa en la presente memoria significa una composición que comprende una mezcla de al menos un ingrediente activo tal como GTN en una forma flegmatizada con al menos un material portador y un estabilizante. Para los fines de la presente invención, la relación en masa entre el diluyente y el estabilizante en una realización actualmente preferida es 19:5; en algunas otras realizaciones preferidas, la relación es 19:10. Todavía en otras realizaciones preferidas, la relación en masa diluyente:estabilizante es 19:2, 19:3, 19:4, 19:6, 19:7, 19:8, 19:9, 19:12, 19:15 y 1:1.

10 Las enseñanzas de la presente invención han dado como resultado, entre otros, el sorprendente e inesperado hallazgo de que el absorbato fluido con su área superficial al menos 10 veces mayor en comparación con una forma de comprimido convencional de GTN puede minimizar o prevenir la volatilización y/o la evaporación del GTN, incluso aunque en teoría, el GTN tiene una mayor oportunidad de escapar debido a la extensa área superficial del absorbato. Un experto en la técnica no habría predicho esto basándose en los conocimientos de la técnica anterior a  
15 la presente invención.

Por consiguiente, se describe el uso de una preparación farmacéutica que contiene GTN que es estable durante el almacenamiento, en forma de un polvo o gránulos fluidos que, además de al menos una sustancia portadora no líquida y excipientes adicionales opcionales, comprende al menos una sustancia estabilizante, que reduce  
20 significativamente la volatilidad del GTN y se selecciona del grupo de ésteres no volátiles cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C. Sin vincularse a esta teoría, se asume que los ésteres con una polaridad muy próxima a la del GTN rodean las moléculas de GTN sobre la superficie interna del material portador y evitan la volatilización del GTN. Los estabilizantes, que son sólidos, semisólidos o pastosos a temperatura ambiente, son especialmente adecuados como se muestra a continuación. De nuevo, sin vincularse a esta teoría, actualmente se cree que las soluciones absorbidas que forman el absorbato, las cuales se solidifican parcial o completamente después de la preparación,  
25 son especialmente eficaces para atrapar el GTN y por lo tanto, evitar que se evapore. Por ejemplo, cuando se usa un portador poroso, el GTN queda encapsulado en los poros del portador a medida que la sustancia estabilizante se solidifica en los poros. La preparación farmacéutica como se describe en la presente invención es adecuada para ser envasada en paquetes individuales, tales como los *stick packs*, cápsulas o sobres, por ejemplo. En el caso de los *stick packs*, los materiales y configuraciones particularmente preferidos están descritos en (1) Solicitud de patente internacional PCT/EP2012/000802 y (2) Solicitud de Patente Alemana No. DE 10 2011 012 491.8 presentada el 25 de febrero de 2011. Según el documento DE 10 2011 012 491.8 (p. ej. el ejemplo 5) los materiales preferidos para envasar la preparación que contiene GTN según la invención son películas de material compuesto que contienen una capa que comprende un copolímero de unidades de acrilonitrilo y uno o más monómeros distintos (copolímeros AN) sobre la superficie orientada hacia la preparación farmacéutica. En el caso de *stick packs*, los más  
30 preferidos son las películas de material compuesto de aluminio que contienen una capa hecha de copolímero de acrilonitrilo-metilacrilato o de copolímero de acrilonitrilo-metilacrilato modificado por impacto en el lado que está en contacto con la composición farmacéutica. Las preparaciones farmacéuticas y los métodos descritos en la presente invención se pueden utilizar también, sin embargo, para la producción eventual de otras formas farmacéuticas sólidas, por ejemplo, comprimidos, mini-comprimidos o pelets.

40 Una ventaja particularmente significativa de un aspecto de la presente invención es que la producción de preparaciones farmacéuticas de ingredientes volátiles, inestables se puede llevar a cabo sin el uso de disolventes volátiles e inflamables, lo que permite que las preparaciones sean elaboradas sin utilizar etapas de secado de alto consumo energético y procedimientos complejos de recuperación de disolvente. Sin embargo, la presente invención contempla también la producción de preparaciones farmacéuticas de ingredientes volátiles tales como GTN flegmatizado en etanol.  
45

Dentro del marco de los ensayos mostrados como ejemplo a continuación, a partir de los cuales se descubrió la invención, se ha descubierto inesperadamente que la volatilidad del GTN se reduce significativamente tanto en condiciones de almacenamiento estándar como en condiciones de estrés mediante el uso de un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a aproximadamente 60 °C. Para los fines de la invención, no volátil  
50 significa que la sustancia estabilizante tiene preferiblemente un punto de ebullición por encima de o aproximadamente de 200 °C (medido a presión ambiental normal). El punto de fusión máximo preferido de 60 °C resulta del hecho de que el GTN se calienta también a esta temperatura durante el procedimiento de producción del absorbato. Se deben evitar temperaturas más altas debido a problemas de estabilidad del GTN. Un punto de fusión más preferido es de o aproximadamente de 0 a 50 °C, un punto de fusión aún más preferido es de o aproximadamente de 20 a 45 °C, y el punto de fusión más preferido es de o aproximadamente de 30 a 40 °C. Además, y de modo muy importante, el uso del estabilizante éster descrito en la presente memoria no compromete las propiedades de disgregación de los gránulos, la liberación de la sustancia activa ni su absorción en el cuerpo. Los procedimientos de la presente invención dan como resultado una composición clínicamente ventajosa, que induce una rápida absorción de la sustancia activa cuando se administra habitualmente a través de la mucosa oral y como resultado una rápida reducción de los síntomas de la enfermedad en situaciones de emergencia que ponen en  
60 peligro la vida, tales como un ataque de angina de pecho.

Como se ha descrito antes, el componente GTN de la presente invención se proporciona en forma de un concentrado de GTN flegmatizado; en una realización preferida, el diluyente para tal concentrado es MCT. Debido a sus propiedades explosivas, el GTN destinado a fines farmacéuticos, es flegmatizado por el fabricante lo que reduce el riesgo que representan sus propiedades peligrosas. La matriz utilizada para la flegmatización puede estar en forma líquida y/o en polvo. Por ejemplo, el GTN está disponible comercialmente como una solución al 5 % en MCT, tal como Miglyol® 812, como una solución al 5 % en propilenglicol, como un concentrado al 10 % en un triturado con lactosa o una dilución al 2,25 % en glucosa. Miglyol® 812 es una preparación que comprende una fracción de ácido graso de un máximo de aproximadamente 2 % de ácido caproico (C<sub>6:0</sub>), aproximadamente 50-80 % de ácido caprílico (C<sub>8:0</sub>), aproximadamente 20-50 % de ácido cáprico (C<sub>10:0</sub>), un máximo de aproximadamente 3 % de ácido láurico (C<sub>12:0</sub>) y un máximo de aproximadamente 1 % de ácido mirístico (C<sub>14:0</sub>) manteniendo los estándares reconocidos por la técnica fijados por la Farmacopea Europea. Si estos concentrados de GTN se usan directamente para la preparación del absorbato según la invención, entonces el diluyente utilizado para la flegmatización está contenido también en el producto terminado. Según la presente invención, una relación preferida de diluyente: estabilizante está entre aproximadamente 1 y 8; más preferiblemente entre aproximadamente 1,2 y 5,0, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 1,5 y 4,0; y lo más preferiblemente entre aproximadamente 1,9 y 3,8. En otras realizaciones igualmente útiles de la presente invención, el GTN puede ser flegmatizado en un disolvente volátil tal como, pero sin estar limitado, etanol; en tales casos, en el producto terminado no hay diluyente o hay poco.

La composición que contiene GTN estabilizado según la invención comprende un absorbato que comprende concentraciones de o aproximadamente de 0,2 a 10 % en peso del estabilizante éster no volátil que tiene un punto de fusión no más alto de o aproximadamente de 60 °C; las concentraciones de estabilizante en ciertas realizaciones preferidas incluyen 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 u 8,0 % en peso. Se contempla también utilizar mezclas de los ésteres estabilizantes descritos. En tales casos, las cantidades se refieren al total de estas sustancias. La concentración de GTN en la composición final del absorbato está dentro de un intervalo de o aproximadamente de 0,05 a 2 % en peso; en ciertas realizaciones preferidas, las concentraciones de GTN incluyen 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, 0,35, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 1,0 o 1,5 % en peso. A menos que se indique otra cosa, todos los porcentajes en peso se refieren a la composición total. La relación en masa de estabilizante o estabilizantes:GTN está dentro del intervalo de o aproximadamente de 2 a 40; una realización preferida incluye una relación de 4 a 20, mientras que una relación de 5, 10 y 15 es particularmente preferida en otras realizaciones.

Como se ha explicado anteriormente, en una realización preferida de la invención el estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es más alto de o aproximadamente de 60 °C se selecciona del grupo de sustancias líquidas, sólidas, semi-sólidas o pastosas a temperatura ambiente. En realizaciones particularmente preferidas de la invención, el estabilizante se selecciona de un grupo de sustancias que dan como resultado una solución homogénea cuando se mezclan con el concentrado de GTN flegmatizado. Las sustancias estabilizantes especialmente preferidas son sólidas o pastosas a temperatura ambiente, e incluyen, pero no se limitan a triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos; triglicéridos polietoxilados, diglicéridos y monoglicéridos; ésteres de ácido láctico; y succinato de D-alfa tocoferol polietilenglicol 1000 (TPGS). Como se ha sugerido anteriormente, se sospecha que los absorbatos, que se solidifican parcial o completamente después de la preparación, son especialmente efectivos para evitar que se evapore el GTN.

En el caso de los estabilizantes seleccionados del grupo que consiste en triglicéridos, los triglicéridos preferidos incluyen, por ejemplo, grasa dura según USP/NF, que está p. ej. comercialmente disponible como Gelucire™ 43/01 de Gattefossé (Saint-Priest Cedex, Francia). En el caso de mono y diglicéridos incluyen, por ejemplo, monooleato de glicerol, que está p. ej., comercialmente disponible como Cithrol® GMO HP de Croda GmbH (Nettetal, Alemania), monocaprilcaprato de glicerol según la Farmacopea Europea (Ph. Eur.), comercializado por ejemplo bajo el nombre comercial Capmul™ MCM EP por Abitec (Janesville, USA), o mono y diglicéridos según USP/NF. Los glicéridos polietoxilados incluyen, por ejemplo, oleoil macrogol-6-glicéridos según USP/NF, que están, por ejemplo, comercialmente disponibles como Labrafil® 1944CS de Gattefossé. En otras realizaciones, los estabilizantes preferidos se seleccionan del grupo que consiste en ésteres de ácido láctico que incluyen, por ejemplo, lactato de cetilo y lactato de miristilo, que están, por ejemplo, comercialmente disponibles como Crodamol™ CL y Crodamol™ ML respectivamente de Croda GmbH (Nettetal, Alemania).

La composición de absorbato como se usa en la presente invención contiene también al menos un material portador farmacéuticamente adecuado caracterizado por un área superficial interna grande capaz de absorber, por ejemplo, líquidos oleosos. Los materiales portadores preferidos de ese tipo incluyen, pero no se limitan a, aluminometasilicato de magnesio según USP/NF, un ejemplo del cual está disponible comercialmente como Neusilin® US2 de Fuji Chemical Industry (Japón), fosfato dibásico de calcio anhidro según USP/NF, un ejemplo del cual está disponible comercialmente como Fujicalin® de Fuji Chemical Industry (Japón), isomalt según la Farmacopea Europea, un ejemplo de la cual está disponible comercialmente como Galen IQ™ de BENEÓ-Palatinit GmbH (Mannheim, Alemania) o mezclas de cualquiera de los tipos de materiales portadores citados.

La composición del absorbato utilizado en la presente invención puede contener también otros excipientes farmacéuticamente aceptables que ayudan a la liberación sublingual de la sustancia activa y se seleccionan (pero sin limitarse a ellos) entre el grupo de monosacáridos, disacáridos y polisacáridos solubles en agua, así como sus alcoholes. Este excipiente se selecciona especialmente del grupo que incluye, pero no se limita a fructosa, glucosa, isomalt, lactosa, maltitol, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa y xilitol y/o mezclas de los mismos. En ciertas



realizaciones preferidas, estos excipientes están presentes en una concentración total de o aproximadamente de 70 a 95 % en peso. En el caso de mezclas, la concentración de cada sustancia individual es de o aproximadamente de 20 a 95 % en peso, por lo que en ciertas realizaciones preferidas, las concentraciones incluyen 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, u 85 % en peso. En ciertas realizaciones, se prefiere especialmente la isomalt. Ella puede servir tanto como material portador cuando un diluyente para el ingrediente activo como GTN es una solución oleosa, como también puede servir como material de relleno adicional.

5

Además, la preparación del absorbato como se usa en la presente invención puede contener otros excipientes, tales como agentes aromatizantes. Los agentes aromatizantes se utilizan especialmente en el caso de preparaciones para administración oral o sublingual con el fin de aumentar la aceptación entre los pacientes. En ciertas realizaciones preferidas según la invención, se usan a concentraciones de o aproximadamente de 0,01 a 3,0 % en peso, por lo que las concentraciones especialmente preferidas en algunas otras realizaciones incluyen o incluyen aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 1,5, 2 o 2,5 % en peso.

10

Una fórmula actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	79,35
Monocaprilcaprato de glicerol Ph. Eur.	19,85
Fosfato dibásico de calcio anhidro	100,80
Isomalt	1800,00
Total	2000,00
Concentración de GTN	0,2 %

15 Otra fórmula actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Triglicéridos sólidos	20,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	49,9
Isomalt	880,1
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,00
Concentración de GTN	0,2 %

Otra fórmula más actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Oleoil macrogol-6-glicéridos	20,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	880,0

ES 2 704 649 T3

Contenido	Cantidad [g]
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,00
Concentración de GTN	0,2 %

Y otra fórmula actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Triglicéridos sólidos	10,0
Monocaprilcaprato de glicerol Ph. Eur.	10,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	880,0
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,00
Concentración de GTN	0,2 %

Y otra fórmula más actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Oleoil macrogol-6-glicéridos	10,0
Triglicéridos	10,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	880,0
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,0
Concentración de GTN	0,2 %

5

Y otra fórmula actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente propilenglicol.	4,0
Monocaprilcaprato de glicerol Ph. Eur.	1,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	5,0

ES 2 704 649 T3

Contenido	Cantidad [g]
Isomalt	89,0
Agente aromatizante de menta	1,0
Total	100,00
Concentración de GTN	0,2 %

Y otra fórmula más actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente propilenglicol.	4,0
Oleoil macrogol-6-glicéridos	2,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	5,0
Isomalt	88,0
Agente aromatizante de menta	1,0
Total	100,0
Concentración de GTN	0,2 %

Y otra fórmula actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN 5 % en diluyente etanol.	4,0
Monooleato de glicerol	4,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	5,0
Isomalt	89,8
Agente aromatizante de menta	1,0
Total	103,8
Concentración de GTN después de la evaporación del etanol	0,2 %

5

Y otra fórmula más actualmente preferida comprende:

Contenido	Cantidad [g]
GTN	0,2
Oleoil macrogol-6-glicéridos	4,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	5,0
Isomalt	89,8

Contenido	Cantidad [g]
Agente aromatizante de menta	1,0
Total	100,0
Concentración de GTN	0,2 %

El método como se describe en la presente invención comprende la mezcla de un concentrado de un producto químico volátil, tal como por ejemplo un concentrado de GTN en el cual el GTN se disuelve en un diluyente adecuado con un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es más alto que aproximadamente 60 °C hasta que se obtiene una solución homogénea. En ciertas realizaciones, los ésteres estabilizantes que ya no están en forma líquida a temperatura ambiente se calientan a una temperatura máxima de aproximadamente 10 °C por encima de su punto de fusión y después se mezclan con el concentrado de GTN como se ha descrito anteriormente a esta temperatura. Esta solución intermedia se mezcla entonces con un material portador que se pulveriza o se granula y se mezcla mecánicamente hasta que se forma un absorbato homogéneo fluido en polvo o granulado. Para los fines de la presente invención, absorbato fluido en polvo o granulado significa un absorbato que no tiene una consistencia húmeda u oleosa o pegajosa o que no es un líquido. En otra realización, el concentrado de GTN se puede combinar en primer lugar con un material portador capaz de absorber cantidades especialmente grandes de aceite, por ejemplo, hasta el 100 % de su propio peso, y después se pueden añadir los otros componentes, tales como el estabilizante. Por lo tanto, en ciertas realizaciones en las que la sustancia activa contenida ahora en un material portador se mezcla con el estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C, es posible prescindir enteramente del uso de disolventes volátiles e inflamables, durante el procedimiento de producción. Esto hace posible la producción de una realización preferida del absorbato según la invención sin etapas de secado de elevado consumo energético ni procedimientos complejos de recuperación de disolventes. Por lo tanto, una realización preferida del procedimiento de producción de la presente invención es especialmente adecuada a escala industrial. Este es un avance significativo con beneficios industriales inalcanzables hasta ahora.

Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, otras realizaciones del procedimiento de producción como se describe en la presente memoria contemplan el uso de concentrados de GTN que comprenden un disolvente volátil tal como el etanol. Incluso en el caso de este procedimiento particular de producción, todavía puede ser fabricado satisfactoriamente un absorbato estabilizado fluido hasta ahora inalcanzable sin ninguna desventaja o compromiso en el absorbato resultante. En el caso de una realización del método de producción en la que se usa un concentrado de GTN en un diluyente volátil, el concentrado es absorbido por un material portador sólido y, al mismo tiempo o en una segunda etapa, se añade el éster estabilizante líquido o licuado. La suspensión resultante se seca, por ejemplo, a una temperatura de 30 °C. Después, se añaden los otros excipientes y se mezclan hasta que se forma un absorbato homogéneo fluido en polvo o granulado.

En otra realización más del método de producción como se describe en la presente memoria, el GTN se puede diluir con atención cuidadosa del riesgo de explosión directamente en el éster estabilizante. Esta mezcla es absorbida después por un material portador sólido. Entonces, se añaden los otros excipientes y se mezclan hasta que se forma un absorbato homogéneo fluido en polvo o granulado. Este procedimiento es más adecuado cuando el estabilizante es un líquido.

En cualquiera de los métodos de producción propuestos descritos en la presente memoria, se puede emplear una etapa de tamizado o disgregación para mejorar el comportamiento de fluidez de la mezcla en polvo.

En otra realización más del método de producción como se describe en la presente memoria, el método puede diferir del anterior en que en primer lugar un concentrado de GTN es absorbido por un material portador sólido y en segundo lugar se añade el éster estabilizante líquido o licuado. Entonces, se añaden los otros excipientes y se mezclan hasta que se forma un absorbato homogéneo fluido en polvo o granulado. Este procedimiento es especialmente eficaz si el estabilizante y el GTN en el diluyente no se pueden mezclar de forma homogénea, por ejemplo, triglicéridos sólidos como estabilizantes y GTN en diluyente propilenglicol.

En el contexto de la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que la administración del dador de NO de acción corta trinitrato de glicerilo (denominado también nitroglicerina) es particularmente adecuada para promover la circulación colateral. Esto podría explicarse por la dilatación a corto plazo del vaso colateral inducida por los dadores de NO de acción corta que, a su vez, tiene un efecto significativamente mejorado sobre la arteriogenesis cuando se aplica repetitivamente. El efecto mejorado del dador de NO de acción corta trinitrato de glicerilo (nitroglicerina) sobre la formación de nuevos vasos colaterales y, por lo tanto, sobre la promoción de la circulación colateral se ejemplifica en detalle en el Ejemplo 15 de la presente solicitud.

Según la invención, el dador de NO se administra en una cantidad capaz de inducir la arteriogenesis. Los expertos apreciarán que esta cantidad dependerá del sujeto al que se administra el dador de NO. En general, la cantidad a administrar puede ser entre 0,1 y 8 mg al día, pero esto puede variar debido al peso del sujeto, a su respuesta

hemodinámica al dador de NO y/o a la gravedad de la enfermedad.

En una realización preferida, la cantidad del dador de NO se aplica en una dosis de 0,2 hasta 0,8 mg (0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8) durante al menos 1 vez hasta un máximo de 4 veces al día, dando como resultado una dosis máxima diaria de 3,2 mg.

5 Según la invención, el término "administración de un dador de NO" significa que se administra una dosis dada del dador de NO. Dependiendo de la forma de administración, los expertos apreciarán que la administración puede necesitar algún tiempo. En una realización preferida, el dador de NO se administra en forma de una cápsula masticable, aerosol o polvo inhalable, gránulos, polvo o un comprimido, lo que significa que la administración se puede completar en segundos. Sin embargo, la administración del dador de NO también puede necesitar más tiempo, por ejemplo, si el dador de NO se administra al paciente por perfusión o mediante una pomada o parche. Los modos de administración del dador de NO se exponen adicionalmente más adelante.

Además, según la invención, el dador de NO se administra de una manera capaz de inducir la arteriogénesis.

Como se muestra en los ejemplos, los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que un dador de NO es capaz de inducir la arteriogénesis cuando se administra de manera intermitente.

15 Según la invención, el término "manera intermitente" significa que el dador de NO se administra de un modo que sus niveles plasmáticos sólo se elevan a corto plazo después de la administración del dador de NO, pero después vuelven a disminuir. Esto se puede lograr, por ejemplo, si la administración de GTN va seguida de un período de tiempo sin administración y después el NO de acción corta se administra de nuevo al sujeto. Además, esta forma de administración evita que el sujeto desarrolle tolerancias para el dador de NO y que el sujeto desarrolle una disfunción endotelial.

20 La inducción de disfunción endotelial es un parámetro que tiene importancia para el pronóstico en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias. El desarrollo de tolerancias, así como la inducción de disfunción endotelial, son desventajas bien conocidas causadas por la exposición sostenida a largo plazo a dadores de NO (Uxa A. *et al.*, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2010, 56 (4): 354- 359).

25 Además, la administración de un dador de NO de acción corta de manera intermitente tiene el efecto mejorado de que imita la situación fisiológica del organismo, por ejemplo, comparable a la liberación endógena de NO en el entrenamiento físico. En otras palabras, el dador de NO de la presente invención actúa como un biomimético cuando se aplica de manera intermitente. Esto representa claramente una mejora sobre la técnica donde la inducción de la arteriogénesis hasta ahora solo se ha observado al administrar dadores de NO de acción prolongada por medio de una administración continua y, por lo tanto, no intermitente.

30 En una realización preferida, los niveles plasmáticos del dador de NO son elevados durante no más de 180, 120 o 60 minutos, o durante no más de 50, 40, 30, 15, 10 o 5 minutos.

35 Además, esto implica también que el dador de NO se puede administrar de manera crónica, es decir, sin tener en cuenta el desarrollo de la enfermedad que implica un tratamiento agudo con el dador de NO. Además, implica también que se puede establecer un plan de terapia sin tener en cuenta el desarrollo de la enfermedad que implica un tratamiento agudo con el dador de NO.

40 En el contexto de la presente invención, el dador de NO se administra, entre otras cosas, para inducir la arteriogénesis. Esto implica que el dador de NO se puede administrar también en momentos determinados o en períodos de tiempo en los que no hay necesidad de vasodilatación ni de alivio de los síntomas tal como el alivio del dolor.

45 Esto contrasta con las aplicaciones pasadas en las que se ha utilizado un dador de NO, por ejemplo, nitroglicerina, para lograr un alivio o una 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 alcanzó mediante la vasodilatación y el alivio resultante del dolor y/o de la disnea. Sin embargo, el objetivo de la administración del dador de NO era, como se ha expuesto anteriormente, el tratamiento de la enfermedad subyacente, por que era bien sabido que las enfermedades no se pueden tratar con vasodilatación o alivio del dolor.

50 La identificación de un dador de NO como agente pro-arteriogénico, por lo tanto, también hace posible que el dador de NO se administre en momentos determinados o periodos de tiempo en los que no se necesita un alivio de síntomas tales como el alivio del dolor. En una realización preferida adicional, el dador de NO también se puede administrar en casos en que no hay síntomas correspondientes como disnea o dolor o en casos en los que no es de esperar tales síntomas.

55 En el contexto de la presente invención, el término "intermitentemente" significa también que el dador de NO se administra de forma continua. Más bien, este término significa también que hay un intervalo entre dos administraciones del dador de NO, y que el dador de NO se administra varias veces, por ejemplo, al menos 1, 2, 3,

4, 5, 6, 8, 9, 12 o 16 veces al día.

Como apreciarán los expertos, una administración del dador de NO puede incluir una administración en una o más formas farmacéuticas, por ejemplo, comprimidos. Por ejemplo, una administración puede incluir la administración de dos comprimidos.

- 5 En cuanto al programa de administración, los expertos apreciarán que hay muchas maneras de lograr esta administración intermitente. Por ejemplo, es posible administrar el dador de NO al menos una vez al día y al menos un día a la semana durante al menos dos semanas. Sin embargo, también es posible administrar el dador de NO sólo durante una semana si el dador de NO se administra varias veces durante esa semana.

- 10 Preferiblemente, el dador de NO se administra una vez, dos veces o tres veces al día, en donde el período de tiempo aún más preferido entre dos administraciones del dador de NO es al menos 4 horas, en particular 8 horas, en particular al menos 10 horas o 12 horas

Aunque es posible, no es necesario que los períodos de tiempo entre dos administraciones del dador de NO sean los mismos. Más bien, es preferible que estos períodos de tiempo difieran, dependiendo del programa de administración individual.

- 15 El dador de NO se administra al menos un día a la semana. Sin embargo, el dador de NO también se puede administrar 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días a la semana. En una realización especialmente preferida, el dador de NO se administra al menos 3 o 4 días a la semana.

- 20 Según la invención, es posible administrar el dador de NO durante un período de varias semanas o meses. Esto es particularmente preferido para inducir la arteriogénesis de manera eficiente, aunque también es posible una administración más corta de una o dos semanas.

En una realización preferida, el dador de NO se administra durante 2 a 8 semanas. Se prefiere igualmente administrar el dador de NO durante 3 a 6, 3 a 8, 3 a 10 o 4 a 8, 4 a 10 o 4 a 12 semanas. Estos números son solamente ejemplos y pueden variar dependiendo del programa individual del sujeto.

- 25 En una realización preferida, el dador de NO se toma al menos una vez a la semana durante al menos 8 semanas, en particular durante al menos 12 semanas.

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

- 30 En el contexto de tales administraciones a largo plazo, es preferible que el dador de NO se administre una vez o dos veces a la semana o al menos una vez o dos veces a la semana.

Se ha descrito previamente que una estimulación exógena de las fuerzas cortantes pulsátiles en un individuo puede producir arteriogénesis. Además, se ha descrito cómo se pueden medir las fuerzas cortantes pulsátiles (documento WO 2010/072416).

- 35 Por consiguiente, en una realización preferida, el dador de NO se administra junto con una estimulación exógena de las fuerzas cortantes pulsátiles en la arteria.

- 40 Con respecto a dicha realización de la invención, el dador de NO se debe administrar de manera que esté activo en el cuerpo del sujeto cuando se aplica la estimulación exógena. En este contexto, activo significa que la liberación de NO aún no está terminada o que la liberación de NO a partir del dador de NO está todavía presente y activa. Dependiendo del dador específico de NO que se use, de su semivida fisiológica en el sujeto y de su formulación, los expertos serán capaces de determinar cuándo se debe administrar el dador de NO al sujeto para asegurar que esté activo en el momento de la estimulación exógena.

En el caso de la nitroglicerina, su semivida y su persistencia en el cuerpo del sujeto se han estudiado intensamente, por ejemplo, después de la aplicación intravenosa o sublingual, donde es de 2 a 5 minutos en el plasma sanguíneo, véase Armstrong PW *et al.*, *Circulation*, 1979, 59: 585-588 o Armstrong PW *et al.*, *Circulation*, 1980, 62: 160-166.

- 45 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 dador de NO en el cuerpo del sujeto, en particular en el plasma sanguíneo del sujeto.

En una realización preferida, el dador de NO se administra en el período de tiempo de 30, preferiblemente de 1 a 10 minutos antes del inicio de la estimulación exógena hasta 30, preferiblemente de 1 a 10 minutos después de la terminación de la estimulación exógena.

- 50 Más preferiblemente, el dador de NO se administra en el período de tiempo de 15 minutos, preferiblemente 5 minutos, más preferiblemente 2 minutos antes de la estimulación exógena hasta 30, preferiblemente 15, más preferiblemente 5 minutos después del inicio de la estimulación exógena.

En una realización adicional preferida, el dador de NO se administra una vez al día, cinco veces a la semana durante 6 semanas 2-5 minutos antes de la estimulación exógena.

5 La estimulación exógena de las fuerzas cortantes pulsátiles se puede lograr de cualquier forma conocida. Esto incluye una estimulación con la ayuda de medicamentos tales como los medicamentos que aumentan la tensión arterial.

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

10 Según la invención, el término "ejercicio físico" significa cualquier entrenamiento del sujeto, incluyendo pero sin limitarse a entrenar en gimnasios, correr, caminar, marcha nórdica, nadar, bailar, andar en bicicleta o ir de excursión. Los expertos apreciarán que cualquier ejercicio será útil en el contexto de la invención, siempre que se realice junto con la administración del dador de NO. Preferiblemente, el término "ejercicio físico" no incluye los movimientos rutinarios no supervisados ni prescritos, tales como paseos ocasionales o tareas domésticas.

15 Como se expuso anteriormente, se ha encontrado en el contexto de la presente invención que un dador de NO es capaz de inducir la arteriogénesis. Esto no sólo permite el tratamiento de una enfermedad ya existente. Más bien, en el contexto de la presente invención, también es posible prevenir la enfermedad. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, el método se dirige a la prevención de dicha insuficiencia arterial.

20 Como se muestra en la sección de ejemplos, en el contexto de la presente invención, ha sido posible reducir el tamaño del infarto en caso de una oclusión ya existente. Además, ha sido posible reducir las arritmias en los sujetos. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, el método da como resultado una reducción del tamaño del infarto, una reducción de las arritmias o una disminución de la elevación del segmento ST.

El dador de NO se puede administrar en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaríngea u oral para que se pueda incorporar al sujeto.

Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, el dador de NO se administra de forma lingual, sublingual, bucal o transmucosal.

25 En caso de administración lingual o sublingual, es preferible que el dador de NO se administre con la ayuda de una cápsula masticable o en la forma de un comprimido, polvo o gránulos, o incluso mediante un dispositivo inhalador, desde el cual el dador de NO pueda ser fácilmente inhalado y adsorbido. Es igualmente preferible que el dador de NO se administre en la forma de un aerosol o polvo.

30 Preferiblemente, la administración del dador de NO es una administración no tópica, es decir, que el dador de NO no se administra a la piel del sujeto. En el contexto de la presente invención, el término "piel" excluye las membranas mucosas del sujeto.

35 En una realización preferida, el dador de NO se formula de una manera que permite una liberación rápida del dador de NO desde la formulación. Esto incluye, por ejemplo, formulaciones que no retienen al dador de NO durante un período de tiempo prolongado, sino que liberan al dador de NO antes de, por ejemplo, 10, 5 minutos o 1 minuto o incluso en algunos segundos, por ejemplo, 5 segundos.

A través de la invención, se prefiere que el sujeto al que se aplica el dador de NO sea un sujeto humano.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere también a un dador de NO como se ha definido anteriormente para su uso en un método para la prevención o tratamiento de una insuficiencia arterial, en donde el dador de NO se administra en una cantidad y manera eficaces para la inducción de la arteriogénesis.

40 Todas las características y realizaciones preferidas expuestas anteriormente para el método de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial se aplican también al dador de NO como se ha definido antes para su uso según este aspecto de la invención.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere también a un dador de NO para uso en un método de eliminación de los efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que es antiarteriogénico o que inhibe la arteriogénesis, que comprende administrar a un sujeto sometido a dicho tratamiento un dador de NO como se ha definido antes en una cantidad y manera eficaces para la inducción de la arteriogénesis.

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

50 Es sabido en la técnica que el ácido acetilsalicílico es un inhibidor de la arteriogénesis (Singer E. *et al.*, Vasa, 2006, 35 (3): 174-177). Por consiguiente, el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares con ASA, aunque es una terapia estándar, tiene importantes efectos secundarios y desventajas. En el contexto de la presente invención, se ha encontrado que los dadores de NO son capaces de superar los efectos genitivos asociados con el tratamiento con ASA (véase la sección de ejemplos). En base a estos hallazgos, los inventores concluyen que también se

pueden reducir los efectos secundarios negativos asociados con otras medicaciones como el tratamiento con los antagonistas de la gluco proteína IIb/IIIa o el tratamiento con etanercept.

Además, la presente invención se refiere también a un dador de NO como se ha definido antes para su uso en un método de reducción de los efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que es antiarteriogénico o que inhibe la arteriogénesis en donde el dador de NO se administra a un sujeto sometido a dicho tratamiento en una cantidad y manera eficaces para la inducción de la arteriogénesis.

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

Todas las características y realizaciones preferidas expuestas anteriormente para el método de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial se aplican también al método para la eliminación de efectos negativos o a dicho dador de NO para uso según este aspecto de la invención.

En un aspecto adicional, se describe un método para la prevención o el tratamiento de una arritmia cardíaca, en donde un dador de NO como se ha definido antes se administra a un sujeto en una cantidad y manera eficaces para el tratamiento de dicha arritmia cardíaca. Además, la presente invención se refiere también a un dador de NO para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una arritmia cardíaca, en donde el dador de NO se administra a un sujeto en una cantidad y manera eficaces para el tratamiento de dicha arritmia cardíaca.

En el contexto de la presente invención, los inventores han encontrado que los dadores de NO son capaces de prevenir y tratar las arritmias (véase la sección de ejemplos).

Todas las características y realizaciones definidas anteriormente con respecto al dador de NO y su formulación y administración se aplican también a este método o NO o dador para uso según la invención.

Se describe también un método para promover la circulación colateral que comprende la etapa de exponer un sujeto a una cantidad terapéuticamente eficaz de un dador de NO como se ha definido antes, en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del dador de NO promueve la suficiente arteriogénesis para aumentar la circulación colateral en una condición fisiológica o patológica.

El término circulación colateral describe la circulación de la sangre a través de los llamados 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 no sea capaz por sí misma de abastecer suficientemente a un tejido, por ejemplo, debido a una oclusión arterial, estos vasos colaterales son reclutados y se pueden desarrollar en grandes arterias de conductancia, para esquivar el sitio de una oclusión arterial y/o compensar el flujo sanguíneo a los territorios isquémicos abastecidos por la arteria insuficiente. En el contexto de la presente invención, la promoción de la circulación colateral se produce a través de la arteriogénesis.

Según la invención, el término "condición fisiológica" indica cualquier condición del sujeto que no esté relacionada con ninguna enfermedad.

Según la invención, el término "condición patológica" indica cualquier condición del sujeto que esté relacionada con una enfermedad.

Preferiblemente, el sujeto padece una insuficiencia arterial.

Todas las características y realizaciones preferidas expuestas anteriormente para el método de tratamiento o prevención de una insuficiencia arterial se aplican también al método de promover la circulación colateral.

Con respecto a los aspectos definidos anteriormente en los que el dador de NO se administra de una manera suficiente para inducir la arteriogénesis, esta manera es preferiblemente una manera intermitente como se ha definido antes.

La invención se describe adicionalmente mediante las figuras y ejemplos adjuntos, que pretenden ilustrar, pero no limitar la invención.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (= oclusión final para inducir el infarto) de los grupos de control de 5 y 10 días. El gráfico de ECG en gris medio indica PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $0,104 \pm 0,016$  mV; el gráfico de ECG en negro indica PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 8:  $0,134 \pm 0,034$  mV; el gráfico de ECG en gris claro indica PBS RIP 10 DÍAS, n = 7:  $0,055 \pm 0,033$  mV; el gráfico de ECG en gris oscuro indica PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS, n = 7:  $0,124 \pm 0,039$  mV.

El ECG se registró 90 minutos después de la FPO. El curso de la elevación del segmento ST por latido en los primeros 1200 latidos no reveló diferencias entre los grupos de simulación de 5 y 10 días y el grupo RIP de 5 días. Solamente en el grupo RIP de 10 días se observó una elevación más baja del segmento ST.



- Figura 2: Elevación del segmento ST de los grupos de control de 5 y 10 días. La columna 1 muestra la elevación del segmento ST del grupo PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS; la columna 2 muestra la elevación del segmento ST del grupo PBS RIP 5 DÍAS; la columna 3 muestra la elevación del segmento ST del grupo PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS; la columna 4 muestra la elevación del segmento ST del grupo PBS RIP 10 DÍAS; la desviación estándar se indica en barras de error; un asterisco indica significativo en comparación con PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS (valor p nominal <0,025); el doble asterisco indica significativo en comparación con PBS RIP 5 DÍAS (valor p nominal <0,025).
- El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. Después de 5 días no se encontraron diferencias significativas entre RIP y Simulación. Después de 10 días en el grupo RIP, la elevación del segmento ST fue significativamente más baja en comparación con la simulación (\*) y el control RIP de 5 días (\*\*) (\*, \*\* valor p nominal <0,025).
- Figura 3: Curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (módulo 1: operación de Simulación sin el RIP). El gráfico de ECG en negro indica PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 8:  $0,134 \pm 0,034$  mV; el gráfico de ECG en gris claro indica NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 7:  $0,124 \pm 0,058$  mV; el gráfico de ECG en gris medio indica NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS, 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 los grupos de control de simulación y los grupos tratados después de 5 días.
- Figura 4: Elevación del segmento ST (módulo 1: operación de simulación sin el RIP). La columna 1 muestra PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS; la columna 2 muestra NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS; la columna 3 muestra NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS; la desviación estándar se indica mediante barras de error.
- El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. No se encontraron diferencias en la elevación máxima del segmento ST entre el control de simulación y los grupos tratados.
- Figura 5: Curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (módulo 2: NO intermitente (NTG, nitroglicerina)). El gráfico de ECG en gris claro indica PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $0,104 \pm 0,016$  mV; el gráfico de ECG en gris medio indica NTG-PLACEBO 5 DÍAS, n = 6:  $0,096 \pm 0,061$  mV; el gráfico de ECG en negro indica NTG RIP 5 DÍAS, n = 7:  $0,052 \pm 0,030$  mV. En comparación con el tratamiento de control con PBS o NTG-Placebo, se detectó un curso de elevación del segmento ST más bajo después del tratamiento con NTG de 5 días después del RIP.
- En el grupo NTG ("NTG RIP 5 DÍAS") la elevación del segmento ST está significativamente reducida en comparación con el grupo PBS y NTG-Placebo. No hay diferencia significativa entre el grupo PBS y el grupo NTG -Placebo.
- Figura 6: Elevación del segmento ST (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS; la columna 2 muestra NTG-PLACEBO 5 DÍAS; la columna 3 muestra NTG RIP 5 DÍAS; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica una reducción significativa de la elevación del segmento ST en comparación con el grupo PBS y NTG-Placebo (valor p nominal <0,017).
- El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. Después del tratamiento con NTG, la elevación máxima del segmento ST se redujo significativamente en comparación con el tratamiento con PBS y NTG-PLACEBO 5 DÍAS después de RIP (\*valor p nominal <0,017).
- Figura 7: Curso de la elevación del segmento ST por latido después de la FPO (módulo 3: NO continuo (ISDN (dinitrato de isosorbida) retard)). El gráfico de ECG en gris claro indica PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $0,104 \pm 0,016$  mV; el gráfico de ECG en gris medio indica ISDN-PLACEBO 5 DÍAS, n = 7:  $0,110 \pm 0,069$  mV; el gráfico de ECG en negro indica ISDN RIP 5 DÍAS, 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 más bajo después del tratamiento con ISDN 5 días después de RIP.
- La elevación del segmento ST en el grupo ISDN ("ISDN RIP 5 DÍAS") se reduce en comparación con el grupo PBS, pero no tiene importancia significativa, así como entre el grupo PBS e ISDN-Placebo.
- Figura 8: Elevación del segmento ST (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS; la columna 2 muestra ISDN-PLACEBO RIP 5 DÍAS; la columna 3 muestra ISDN RIP 5 DÍAS; la desviación estándar se indica mediante barras de error.
- El diagrama muestra la media de la elevación máxima del segmento ST por grupo. Después del tratamiento con ISDN, la elevación máxima del segmento ST no se redujo significativamente en comparación con el tratamiento con PBS e ISDN-Placebo 5 días después del RIP.
- Figura 9: 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 PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $0,104 \pm 0,016$  mV; el gráfico de ECG en gris medio indica ASA + PBS RIP 5 DÍAS, n = 7:  $0,138 \pm 0,098$  mV; el gráfico de ECG en gris oscuro indica ASA + NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS, n = 6:  $0,144 \pm 0,091$  mV; el gráfico de ECG en negro indica NTG + ASA RIP 5 DÍAS, 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.

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

Figura 10: Elevación del segmento ST (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS; la columna 2 muestra PBS + ASA RIP 5 DÍAS; la columna 3 muestra NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS; la columna 4 muestra NTG-PLACEBO + ASA RIP 5 DÍAS; la columna 5 muestra NTG RIP 5 DÍAS; la columna 6 muestra NTG + ASA RIP 5 DÍAS; la desviación estándar se indica mediante barras de error.

10 El diagrama muestra la media de la elevación máxima 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.

15 Figura 11: Arritmias durante la FPO (módulo 1: Operación de simulación (sin el RIP)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS; la columna 2 muestra NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS; la columna 3 muestra NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS.

Según la clasificación de Lown, todos los grupos de Simulación fueron escalados predominantemente a grado IVb.

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

Figura 12: 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 PBS RIP 5 DÍAS; la columna 2 muestra NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS; la columna 3 muestra NTG RIP 5 DÍAS.

25 Mientras que las arritmias en ambos grupos de control, PBS y NTG-Placebo, se escalaron predominantemente hasta grado IVb, el grupo tratado con NTG fue escalado con mayor frecuencia a grado 0.

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

30 Figura 13: Arritmias durante la FPO (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). Los números de columnas se dan en orden consecutivo de las columnas en el grupo IVb. La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS; la columna 2 muestra ISDN-PLACEBO RIP 5 DÍAS; La columna 3 muestra ISDN RIP 5 DÍAS.

En todos los grupos, las arritmias también se escalaron a grado IVb.

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

Figura 14: 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 ASA + PBS RIP 5 DÍAS; la columna 2 muestra ASA + NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS; la columna 3 muestra ASA + NTG RIP 5 DÍAS.

40 Las arritmias se escalaron de manera similar a grado IVb en todos los grupos.

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

45 Figura 15: Puntuación VBP (latidos ventriculares prematuros). La columna 1 muestra PBS SIMULACIÓN; la columna 2 muestra NTG-Placebo SIMULACIÓN; la columna 3 muestra NTG SIMULACIÓN; la columna 4 muestra PBS RIP; la columna 5 muestra NTG-Placebo RIP; la columna 6 muestra NTG RIP; la columna 7 muestra PBS RIP; la columna 8 muestra ISDN-Placebo RIP; la columna 9 muestra ISDN RIP; la columna 10 muestra PBS + ASA RIP; la columna 11 muestra NTG-Placebo + ASA RIP; la columna 12 muestra NTG + ASA RIP.

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

50 La puntuación VBP muestra el porcentaje de cada grado de Lown de cada grupo. Los grupos de Simulación tienen puntuaciones VBP más altas. En comparación 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 puntuación de VPB más baja. La puntuación de VPB en los grupos tratados con ASA solo o con NTG + ASA es mayor en comparación con los controles (tratados con PBS).

5 Figura 16: Tamaño del infarto de los grupos de control de 5 días y 10 días. La columna 1 muestra PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 8:  $13,36 \pm 5,22$  %; la columna 2 muestra PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12$  %; la columna 3 muestra PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS, n = 7:  $13,71 \pm 6,04$  %; la columna 4 muestra PBS RIP 10 DÍAS, n = 6:  $6,57 \pm 3,26$  %; la desviación estándar se indica mediante barras de error; el asterisco indica diferencia significativa en comparación con las simulaciones (valor p nominal  $<0,013$ ).

10 Después de un protocolo isquémico de 5 días, no hay un tamaño de infarto significativamente más pequeño que sea medible, pero después de un RIP de 10 días, el área infartada disminuye significativamente en comparación con las simulaciones (valor p nominal  $<0,013$ ).

15 Después de 90 minutos de oclusión de LAD (arteria coronaria descendente anterior izquierda) y 20 minutos de reperfusión, se analizó el tamaño del infarto. El grupo "PBS RIP 10 DÍAS" tiene un área de infarto significativamente más pequeña en comparación con el grupo "PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS". No hay diferencia significativa entre ambos grupos de 5 días.

Figura 17: Tamaño del infarto (módulo 1: Operación de simulación (sin el RIP)). La columna 1 muestra PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 8:  $13,36 \pm 5,22$  %; la columna 2 muestra NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 6:  $14,21 \pm 5,79$  %; la columna 3 muestra NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 7:  $14,09 \pm 5,18$  %; la desviación estándar se indica mediante barras de error.

20 El tamaño del infarto no muestra diferencia entre los grupos de Simulación.

No hay ninguna diferencia significativa entre los tres grupos de Simulación.

25 Figura 18: Tamaño del infarto (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12$  %; la columna 2 muestra NTG-PLACEBO 5 DÍAS: n = 6:  $9,80 \pm 6,79$  %; la columna 3 muestra NTG RIP 5 DÍAS, n = 7:  $3,61 \pm 2,08$  %; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica un valor significativo de PBS RIP 5 DÍAS (valor p nominal  $<0,017$ ).

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

En comparación con el "PBS RIP 5 DÍAS", se observa un área de infarto significativamente más pequeña en el grupo "NTG RIP 5 DÍAS". No hay diferencia significativa entre el grupo PBS y el grupo NTG-Placebo.

30 Figura 19: Tamaño del infarto (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12$  %; la columna 2 muestra ISDN-PLACEBO 5 DÍAS, n = 6:  $9,97 \pm 3,65$  %; la columna 3 muestra ISDN RIP 5 DÍAS, n = 7:  $7,59 \pm 4,38$  %; la desviación estándar se indica mediante 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 hay diferencia significativa.

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

40 Figura 20: Tamaño del infarto (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12$  %; la columna 2 muestra ASA + PBS RIP 5 DÍAS, n = 6:  $12,51 \pm 3,05$  %; la columna 3 muestra NTG-PLACEBO 5 DÍAS: n = 6:  $9,80 \pm 6,79$  %; la columna 4 muestra NTG-PLACEBO + ASA RIP 5 DÍAS, n = 6:  $13,92 \pm 1,71$  %; la columna 5 muestra NTG RIP 5 DÍAS, n = 7:  $3,61 \pm 2,08$  %; la columna 6 muestra NTG + ASA RIP 5 DÍAS, n = 6:  $13,00 \pm 3,82$  %; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica que es significativo en comparación con los NTG RIP 5 DÍAS (valor p nominal  $<0,017$ ).

El tamaño del infarto después del tratamiento con NTG más ASA aumenta significativamente en comparación con el tratamiento con solo NTG (valor p nominal  $<0,017$ ).

45 El tamaño del infarto en el grupo tratado con ASA ("ASA + PBS 5 DÍAS") se incrementa 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 NTG es significativamente más pequeña en comparación con el grupo ASA + NTG.

50 Figura 21: Tinción con TTC. Las imágenes muestran cortes de tres niveles. El tejido infartado está teñido de un blanco pálido ya que carece de las enzimas con las que reacciona el TTC. Así, las áreas de necrosis son claramente discernibles y cuantificables.

Figura 22: Diámetros colaterales de ROI (región de interés) (módulo 1: Operación de simulación (sin el RIP)). La

columna 1 muestra PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 3: 82,7 ± 3,7 µm; la columna 2 muestra NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 3: 89,6 µm ± 10,6 µm; la columna 3 muestra NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 3: 86,8 ± 9,0 µm; la desviación estándar se indica mediante barras de error.

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

5 No hay ninguna diferencia significativa entre los tres grupos de Simulación.

Figura 23: Diámetros colaterales de ROI (módulo 2: NO intermitente (NTG)). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS, n = 3: 129,8 ± 6,9 µm; la columna 2 muestra NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS: n = 3: 127,0 ± 12,1 µm; la columna 3 muestra NTG RIP 5 DÍAS, n = 3: 158,4 ± 9,2 µm; la desviación estándar se indica mediante barras de error, el asterisco indica una diferencia significativa en comparación con NTG RIP 5 DÍAS (valor p nominal <0,033).

10 Los diámetros de las colaterales aumentan significativamente con el tratamiento con NTG en comparación con los controles (tratados con PBS o NTG-Placebo) (valor p nominal <0,033).

En comparación con el "PBS RIP 5 DÍAS", los diámetros de las colaterales en el ROI en el grupo "NTG RIP 5 DÍAS" aumentan significativamente. No hay diferencia entre el grupo PBS y el grupo NTG-Placebo.

15 Figura 24: Diámetros colaterales de ROI (módulo 3: NO continuo (ISDN retard)). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS, n = 3: 129,8 ± 6,9 µm; la columna 2 muestra ISDN-PLACEBO 5 DÍAS, n = 3: 133,0 ± 11,5 µm; la columna 3 muestra ISDN RIP 5 DÍAS, n = 3: 148,2 ± 11,3 µm; la desviación estándar se indica mediante barras de error.

No hay diferencias medibles en el diámetro de las colaterales después del tratamiento con ISDN o ISDN-Placebo.

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

20 Figura 25: Diámetro colateral del ROI (módulo 4: NO intermitente más ASA). La columna 1 muestra PBS RIP 5 DÍAS, n = 3: 129,8 ± 6,9 µm; la columna 2 muestra PBS + ASA RIP 5 DÍAS, n = 3: 102,5 ± 8,0 µm; la columna 3 muestra NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS: n = 3: 127,0 ± 12,1 µm; la columna 4 muestra NTG-PLACEBO + ASA 5 DÍAS, n = 3: 97,1 ± 8,6 µm; la columna 5 muestra NTG RIP 5 DÍAS, n = 3: 158,4 ± 9,2 µm; la columna 6 muestra ASA + NTG RIP 5 DÍAS, n = 3: 124,4 ± 5,6 µm; la desviación estándar se indica mediante barras de error, un asterisco indica significativo en comparación con PBS RIP 5 DÍAS (valor p nominal <0,039); el doble asterisco indica significativo en comparación con ASA + NTG RIP 5 DÍAS (valor p nominal <0,039).

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

30 Los diámetros en el grupo tratado con PBS y ASA son significativamente más pequeños en comparación con el grupo control de PBS, pero no hay diferencia significativa en comparación con el grupo ASA + NTG-Placebo. En el grupo ASA + NTG, los diámetros aumentaron significativamente en comparación con el grupo tratado con PBS y ASA.

35 Figura 26: imagen MicroCT de "ROI": (A) "PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS"; (B) "NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS"; (C) "ISDN RIP 5 DÍAS"; (D) "PBS RIP 5 DÍAS"; (E) "NTG RIP 5 DÍAS"; (F) "ASA + PBS RIP 5 DÍAS"; (G) "ASA + NTG RIP 5 DÍAS".

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

45 Figura 27: Diagrama de flujo del estudio. La duración del período de la línea base se estima en aproximadamente 2 semanas. La duración del período de intervención será de seis semanas. El período de seguimiento incluirá una investigación inmediata (un día hasta tres días como máximo después del período de intervención) y una investigación de seguimiento a largo plazo (1 mes después del período de intervención).

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran, entre otras cosas, la producción de diversas formulaciones según la invención sin reducir el alcance de la invención a estos ejemplos.

50 Ejemplo comparativo 1

Los comprimidos de GTN disponibles en el mercado, cada uno con un peso total de 35 mg, que contienen 0,4 mg de

## ES 2 704 649 T3

GTN y lactosa monohidrato, monoestearato de glicerol, almidón preaglutinado, estearato de calcio y dióxido de silicio coloidal como excipientes, se envasaron individualmente en *stick packs* con película y se conservaron a 40 °C/75 % de humedad relativa durante tres meses.

### Ejemplo comparativo 2

Contenido	Cantidad [g]
GTN en diluyente de lactosa monohidrato al 10 %	0,60
Polietilenglicol 400	0,36
Isomalt	16,81
Xilitol	12,01
Dióxido de silicio (Aeroperl®)	0,25
Total	30,03
Concentración de GTN	0,20 %

5

La sustancia activa triturada se mezcló bien con el polietilenglicol líquido; se añadieron las otras sustancias en la secuencia listada anteriormente y se mezclaron. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 40 °C/75 % de humedad relativa durante tres meses.

### Ejemplo 1

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	1,033
Citrato de trietilo	1,032
Isomalt	16,513
Xilitol	6,248
Dióxido de silicio (Aeroperl®)	0,207
Total	25,033
Concentración de GTN	0,207 %

10

El citrato de trietilo se mezcló con GTN flegmatizado en un diluyente de triglicéridos de cadena media (MCT). Se mezcló bien la solución con isomalt. Después se añadieron xilitol y finalmente dióxido de silicio y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 40 °C/75 % de humedad relativa durante tres meses.

15 La concentración de GTN se cuantificó después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento utilizando análisis por HPLC. Las dosis individuales se disolvieron en un disolvente adecuado para realizar el análisis. El GTN se detectó utilizando un detector UV-VIS a una longitud de onda de 225 nm.

Concentración de GTN después del almacenamiento a 40 °C/75 % de humedad relativa				
Producto según	0 meses	2 semanas	1 mes	3 meses
Ejemplo comparativo 1	0,391 mg	0,079 mg	0,065 mg	*
Ejemplo comparativo 2	0,407 mg	n.c.	0,305 mg	0,245 mg

Concentración de GTN después del almacenamiento a 40 °C/75 % de humedad relativa				
Producto según	0 meses	2 semanas	1 mes	3 meses
Ejemplo 1	0,415 mg	n.c.	n.c.	0,394 mg

\* El ensayo terminó después de un mes porque ya se había perdido más del 80 % de la sustancia activa.

n.c. - no realizado

Este ensayo comparativo inicial prueba que ni el comprimido disponible comercialmente, ni una mezcla de polvo con las sustancias contenidas en un comprimido convencional, ni una preparación con polietilenglicol son adecuadamente estables en un *stick pack*. El único nivel aceptable de estabilidad de almacenamiento se alcanzó con la adición del éster estabilizante según la invención junto con un concentrado de GTN flegmatizado en MCT

5

Ejemplo 2

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	2,00
TPGS	1,00
Aluminometasilicato de magnesio	2,50
Isomalt	44,5
Total	50,00
Concentración de GTN	0,20 %

El TPGS se fundió a 50 °C y se mezcló con GTN concentrado en un diluyente de MCT. Mientras aún estaba caliente, se mezcló bien la mezcla con el aluminometasilicato de magnesio. Después se añadió isomalt y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 25 °C/60 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

10

Duración/temperatura del almacenamiento	0 meses	3 meses/25 °C	6 meses/25 °C
Concentración de GTN	0,400 mg	0,398 mg	0,392 mg

15 Ejemplo 3

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	2,02
Monocaprilcaprato de glicerol Ph. Eur.	0,52
Aluminometasilicato de magnesio	1,50
Isomalt	45,99
Total	50,03
Concentración de GTN	0,20 %

El monocaprilcaprato de glicerol se fundió a 40 °C y se mezcló con un concentrado de GTN en diluyente MCT.

Mientras aún estaba caliente, se mezcló bien la mezcla con el aluminometasilicato de magnesio. Después se añadió isomalt y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 40 °C/75 % de humedad relativa y a 25 °C/60 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

5

Duración/temperatura del almacenamiento	0 meses	6 meses/25 °C	6 meses/40 °C
Concentración de GTN	0,397 mg	0,383 mg	0,355 mg

Ejemplo 4

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	79,35
Monocaprilcaprato de glicerol Ph. Eur.	19,85
Fosfato dibásico de calcio anhidro	100,80
Isomalt	1800,00
Total	2000,00
Concentración de GTN	0,2 %

El monocaprilcaprato de glicerol se fundió a 40 °C y se mezcló con un concentrado de GTN en un diluyente MCT. Mientras aún estaba caliente, se mezcló bien la mezcla con el fosfato dibásico de calcio anhidro. Después se añadió isomalt y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 40 °C/75 % de humedad relativa y a 25 °C/60 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

10

Duración del almacenamiento	0 meses	3 meses	6 meses
Concentración de GTN a 40 ° C	0,380 mg	0,380 mg	0,383 mg
Concentración de GTN a 25 ° C	0,380 mg	0,380 mg	0,379 mg

15

Ejemplo comparativo 3

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	1,193
Fosfato dibásico de calcio anhidro	1,513
Isomalt	19,80
Xilitol	7,50
Total	30,006
Concentración de GTN	0,2 %

El concentrado de GTN en el diluyente MCT se mezcló bien con el fosfato dibásico de calcio anhidro. Después se añadieron isomalt y xilitol y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs*

y se conservaron a 40 °C/75 % de humedad relativa y a 25 °C/60 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Duración del almacenamiento	0 meses	3 meses
Concentración de GTN a 40 ° C	0,410 mg	0,340 mg
Concentración de GTN a 25 ° C	0,410 mg	0,363 mg

- 5 Una comparación entre los datos del Ejemplo 4 según la invención y la preparación no estabilizada según el Ejemplo comparativo 3 revela que se produjo una pérdida media clínicamente significativa del 17 % y 11 % sin estabilización después de un período de almacenamiento de tres meses a 40 °C y 25 °C, respectivamente. Un producto que tiene este grado de susceptibilidad al deterioro y pérdida del ingrediente activo no es comercialmente adecuado para su venta como un producto farmacéutico. En marcado contraste, el contenido de la sustancia activa en el Ejemplo 4 se mantuvo casi constante durante seis meses en presencia de un estabilizante según la presente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente el beneficio de las fórmulas estabilizadas según la invención. Además, los siguientes ejemplos demuestran los beneficios de las mezclas de los estabilizantes contemplados en la presente invención. Es importante destacar que los siguientes ejemplos ilustran la estabilización obtenida a temperaturas aún más elevadas, es decir, 50 °C:

- 15 Ejemplo 5:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	43,9
Monocaprilcaprato de glicerol Ph. Eur.	16,6
TPGS	16,6
Aluminometasilicato de magnesio	54,9
Isomalt	957,0
Agente aromatizante de menta	11,0
Total	1100,00
Concentración de GTN	0,2 %

- 20 El monocaprilcaprato de glicerol y TPGS se fundieron a 50 °C y se mezclaron con concentrado de GTN en diluyente MCT. Mientras aún estaba caliente, se mezcló bien la mezcla con el aluminometasilicato de magnesio. Luego se añadieron isomalt y un agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1.

- Ejemplo 6:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Triglicéridos sólidos	20,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	49,9
Isomalt	880,1



Contenido	Cantidad [g]
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,00
Concentración de GTN	0,2 %

- 5 Los triglicéridos sólidos se fundieron a 50 °C y se mezclaron con concentrado de GTN en diluyente MCT. Mientras aún estaba caliente, se mezcló bien la mezcla con el fosfato dibásico de calcio anhidro. después se añadió isomalt en porciones seguidas por el agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 7:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Triglicéridos sólidos	10,0
Monocaprilcaprato de glicerol Ph. Eur.	10,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	880,0
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,00
Concentración de GTN	0,2 %

- 10 Los triglicéridos sólidos y el monocaprilcaprato de glicerol se fundieron a 50 °C y se mezclaron con un concentrado de GTN en un diluyente de MCT. Mientras aún estaba caliente, se mezcló bien la mezcla con el fosfato dibásico de calcio anhidro. Después se añadió isomalt en porciones seguidas por el agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 8:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Oleoil macrogol-6-glicéridos	20,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	880,0
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,00
Concentración de GTN	0,2 %

## ES 2 704 649 T3

5 Los oleoil macrogol-6-glicéridos se mezclaron con GTN en MCT. Se mezcló bien la mezcla con el fosfato dibásico de calcio anhidro. Después se añadió isomalt en porciones seguidas por el agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 9:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Monooleato de glicerol	20,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	880,0
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,00
Concentración de GTN	0,2 %

10 El monooleato de glicerol se fundió a 50 °C y se mezcló con un concentrado de GTN en un diluyente de MCT. Se mezcló bien la mezcla con el fosfato dibásico de calcio anhidro. Después se añadió isomalt en porciones seguidas por el agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa. La concentración de GTN se cuantificó inmediatamente después de la producción y en varios puntos durante el almacenamiento como se describe en el Ejemplo 1.

15 Los resultados de las pruebas de almacenamiento con las preparaciones de los Ejemplos 5-9 se presentan en la siguiente tabla:

Duración de almacenamiento a 50 °C	0 meses	1 mes	2 meses
Ejemplo 5	0,404 mg	0,380 mg	0,369 mg
Ejemplo 6	0,394 mg	0,390 mg	0,384 mg
Ejemplo 7	0,391 mg	0,393 mg	0,389 mg
Ejemplo 8	0,394 mg	0,392 mg	0,388 mg
Ejemplo 9	0,390 mg	0,376 mg	0,377 mg

En conjunto, los resultados muestran sin ambigüedad que la pérdida de GTN se reduce significativamente mediante la adición de un estabilizante éster no volátil en comparación con la composición libre de estabilizante de los Ejemplos comparativos 2 y 3.

20 Ejemplo 10:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Oleoil macrogol-6-glicéridos	10,0
Triglicéridos	10,0

ES 2 704 649 T3

Contenido	Cantidad [g]
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	880,0
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,0
Concentración de GTN	0,2 %

- 5 Los oleoil macrogol-6-glicéridos y triglicéridos se mezclaron con GTN flegmatizado en MCT. Se mezcló bien la mezcla con el fosfato dibásico de calcio anhidro. después se añadió isomalt en porciones seguidas por el agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa.

Ejemplo 11:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,0
Monooleato de glicerol	10,0
Mono y diglicéridos	10,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	880,0
Agente aromatizante de menta	10,0
Total	1000,0
Concentración de GTN	0,2 %

- 10 El monooleato de glicerol y los mono y diglicéridos (tipo Geleol) se fundieron a 50 °C y se mezclaron con un concentrado de GTN en un diluyente MCT. Se mezcló bien la mezcla con el fosfato dibásico de calcio anhidro. Después se añadió isomalt en porciones seguidas por el agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa.

Ejemplo 12:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente MCT	40,1
Lactato de miristilo	20,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	50,0
Isomalt	879,9
Agente aromatizante de menta	10,1
Total	1000,1
Concentración de GTN	0,2 %

- 5 El lactato de miristilo se mezcló con un concentrado de GTN en diluyente MCT. Se mezcló bien la mezcla con el fosfato dibásico de calcio anhidro. Después se añadió isomalt en porciones seguidas por el agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa.

Ejemplo 13:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente propilenglicol	4,0
Monocaprilocaprato de glicerol Ph. Eur.	1,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	5,0
Isomalt	89,0
Agente aromatizante de menta	1,0
Total	100,00
Concentración de GTN	0,2 %

- 10 El concentrado de GTN en diluyente propilenglicol se mezcló bien con el fosfato dibásico de calcio anhidro. En un recipiente separado, se fundió el monocaprilocaprato de glicerol a 40 °C y se añadió al GTN absorbido diluido. Después se añadió isomalt en porciones seguidas por el agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa.

Ejemplo 14:

Contenido	Cantidad [g]
GTN (5 %) en diluyente propilenglicol	4,0
Oleoil macrogol-6-glicéridos	2,0
Fosfato dibásico de calcio anhidro	5,0
Isomalt	88,0
Agente aromatizante de menta	1,0
Total	100,0
Concentración de GTN	0,2 %

- 15 El concentrado de GTN en diluyente propilenglicol se mezcló bien con el fosfato dibásico de calcio anhidro, se añadieron oleoil macrogol-6-glicéridos al GTN absorbido diluido. Después se añadió isomalt en porciones, seguido del agente aromatizante de menta y se continuó mezclando. Se llenaron porciones de 200 mg del polvo suelto en *stick packs* y se conservaron a 50 °C y a 40 °C/75 % de humedad relativa.

- 20 Es de esperar que las formulaciones que contienen GTN de los Ejemplos 10-14 demuestren de nuevo las ventajas de la inclusión de un estabilizante en las composiciones de absorbato de GTN descritas anteriormente, incluso cuando se mantienen a temperaturas de almacenamiento estresantes, tales como 50 °C.

- 25 Tal como se describe en otra parte de la presente memoria, las preparaciones dadas anteriormente a modo de ejemplos según la invención se pueden suministrar como una dosis única en forma de un *stick pack*, una cápsula o un sobre. Además, es posible fabricar comprimidos, mini-comprimidos o pelets para la administración bucofaríngea o sublingual a partir de los polvos o gránulos estabilizados, según sea necesario, seguido de la adición de otros

agentes de carga, disgregantes, deslizantes, aglutinantes y lubricantes utilizando protocolos rutinarios y habituales.

Ejemplo 15

Estudio preclínico

1. Introducción

- 5 Un mecanismo importante de la arteriogénesis es la inducción de estrés cortante a través de las arterias colaterales reclutadas.

El NO desempeña un papel fundamental en este escenario, ya que regula la capacidad vasodilatadora de la arteria, así como los aspectos terapéuticos de proliferación sobre las células musculares lisas de las arterias colaterales.

- 10 Aquí se evalúan los efectos de Nitrolingual akut® Spray (G. Pohl-Boskamp GmbH & Co.KG, Hohenlockstedt, Alemania; nombre de marca en Estados Unidos Nitrolingual® Pumpspray) en un modelo único de arteriogénesis sin infarto de miocardio. El crecimiento colateral en este modelo se induce mediante una oclusión repetitiva de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD). El tamaño del infarto en estos animales se midió como el criterio de valoración al final del experimento. Por lo tanto, ninguna interferencia entre el infarto de miocardio y la arteriogénesis ha debilitado el experimento. Además, se evaluó el efecto del ácido acetilsalicílico (ASA) en este modelo de oclusión coronaria repetitiva como un posible inhibidor de la arteriogénesis. Se evaluó si una aplicación concomitante de NO (uso intermitente de nitroglicerina) puede compensar este efecto negativo del ASA.

2. Materiales y métodos

1.1. Preparación de los animales

- 20 Se utilizan para los experimentos ratas Sprague-Dawley machos (300 g de peso corporal al inicio del estudio; n = 182). Para la cirugía (día 0), las ratas son premedicadas (ketamina 50 mg/ml más xilacina 4 mg/ml intraperitonealmente) e intubadas. La intubación oral (tubo de polietileno 14-G) se realiza bajo observación directa de las cuerdas vocales con un otoscopio. La anestesia general se introduce y se mantiene por inhalación de isoflurano (1,0 % a 2,0 %, con 100 % de oxígeno). La temperatura corporal se controla a 37 °C mediante una mesa de calefacción eléctrica. La cirugía se realiza utilizando técnica aséptica. Se coloca el animal 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), se monitorizan los parámetros (frecuencia cardíaca) de ECG y se registran durante la cirugía. El corazón se expone por toracotomía izquierda. Se implanta un oclisor de lazo mini-neumático (véase la sección Oclisor de lazo mini-neumático para detalles) alrededor de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) de medio a proximal. La confirmación de que el oclisor es funcional, es decir, que produce isquemia miocárdica, se determina inicialmente por la observación de la palidez 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 de simulación

Módulo 2: NO intermitente (nitroglicerina)

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

Módulo 4: NO intermitente más ASA

- 40 Después de la instrumentación y las medidas, el tórax se cierra bajo una presión positiva al final de la aspiración, y la cavidad torácica es evacuada de aire. Los oclisores se canalizan por vía subcutánea y se exteriorizan entre las escápulas. Estos catéteres están protegidos por una bobina de resorte de acero inoxidable conectada a un anillo que está asegurado subcutáneamente entre las escápulas. Después de la cirugía, se administran analgésicos (buprenorfina 0,05 mg/kg SC) y antibióticos (enrofloxacino 10 mg/kg SC). Las ratas se observan en una jaula de recuperación durante 2 horas y después se transfieren a la instalación de cuidado de animales en donde son monitorizadas continuamente por técnicos. Después de la operación, se administra buprenorfina (0,5 mg/kg SC) para el dolor dos veces al día durante 8 con respecto a 13 días. En el tercer día después de la cirugía (día 3), se inició el protocolo isquémico. Después de 5 con respecto a 10 días (solo en el módulo 1A y 2A) del protocolo experimental (día 8 con respecto a día 13), las ratas se anestesian y se abre el tórax por toracotomía media. En el grupo de micro-CT, los corazones se escinden inmediatamente. Para la detección del tamaño final del infarto, la LAD se ocluye permanentemente (oclusión final permanente, FPO) y el tamaño del infarto se mide mediante tinción con TTC.

- 50 1.2. Oclisor de trampa mini-neumático para el corazón de rata

Se utiliza un oclisor de lazo mini-neumático que consiste en un mini-balón, tubo de vaina, sutura y catéter. El balón (7 mm de largo) está hecho de membrana de látex blando y es suficientemente flexible para ejercer una fuerza física despreciable sobre los vasos coronarios durante la deflación del balón. El balón se monta dentro de una funda de

paraguas (3,2 o 4,8 mm de diámetro, 12 mm de longitud; protege al balón de la infiltración fibrosa). Se pasa Prolene (5-0) alrededor de la LAD y se une a la vaina, asegurando el ocluidor al corazón, de modo que la isquemia de miocardio se produce por el inflado del balón. El volumen del inflado es pequeño (0,2 a 0,25 mL de aire), pero la oclusión se produce mediante 2 acciones físicas: "ondulando" la LAD hacia arriba/hacia afuera y comprimiendo la LAD con el balón/vaina inflado. El balón se conecta a un catéter (PE-50) que se exterioriza. El inflado y la deflación del balón se controlan desde fuera de la jaula de las ratas.

### 1.3. Medidas de los parámetros del electrocardiograma (ECG)

En los cuatro módulos (1-4) al principio (día 3) y al final (día 8 con respecto a día 13) del protocolo experimental (RIP), se realiza la oclusión coronaria durante 40 segundos (equivalente a una oclusión en el RIP; véase la página 6) y durante una FPO de 90 minutos (día 8 con respecto a día 13) se miden los parámetros de ECG para examinar la frecuencia cardíaca y la elevación del ST. Además, se determinan las arritmias que aparecen durante la FPO. Según la clasificación de Lown, cada animal muestra un cierto grado. Cuanto más alto es el 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 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. Los porcentajes de las calificaciones respectivas se multiplican con el factor apropiado que conduce a los resultados individuales que luego se suman hasta la puntuación VPB de todo el grupo. Por consiguiente, un grupo de animales con grados de Lown más altos tiene una puntuación VPB correlativamente alta.

### 1.4. Imagen microvascular coronaria con Micro-CT

Además, la Micro-CT se utiliza como un factor de valoración final adicional para la imagen de colaterales. Se prepara un grupo de ratas (3 ratas de cada grupo en cada módulo; un total de 36 ratas) para la visualización vascular coronaria mediante micro-CT. La circulación coronaria se llena con medio de contraste (microfil amarillo) mediante la modificación de la metodología para el estudio con micro-CT en ratas. La viscosidad del medio de contraste permite llenar hasta el nivel arteriolar coronario con un llenado mínimo o nulo de los capilares. El corazón escindido se canula inmediatamente con una cánula aórtica, y la circulación coronaria se perfunde retrógradamente a 85 mm de Hg. Se utiliza un perfundido (solución salina con 2 % de procaína de 25 °C a 27 °C) para evitar la contracción metabólica del miocardio y dilatar al máximo la vasculatura coronaria. Se inserta el tubo de polietileno en el ventrículo izquierdo a través de un apéndice izquierdo a través de la válvula mitral para descargar el ventrículo izquierdo. Se inyecta el medio de contraste templado (42 °C) a una presión de 85 mm de Hg durante 3 minutos mientras se controla la presión de perfusión. El corazón se enfría por inmersión en solución salina fría (de 0 °C a 4 °C) hasta que se solidifique (microfil amarillo). Después, se extrae el corazón y se fija en solución de paraformaldehído al 4 % (4 °C) durante la noche. Se utilizan corazones enteros para imágenes por micro-CT del crecimiento colateral coronario. La vasculatura coronaria se visualiza con micro-CT. En resumen, se escanea todo el corazón en incrementos de 1° alrededor de 360° aproximadamente en su eje longitudinal de ápice a base. La resolución espacial seleccionada en el presente estudio tiene un tamaño en vóxeles de 18\*18\*18 m<sup>3</sup> para enfocarse sobre el tamaño de los vasos colaterales y para minimizar las señales de los vasos más pequeños. Finalmente, los datos de CT (tomografía calculada) se reconstruyen como imágenes 3D. El objetivo principal de estas imágenes es establecer la presencia o ausencia de conexiones anastomóticas arterio-arteriales. Los vasos colaterales, es decir, las conexiones anastomóticas arterio-arteriales, se miden por observadores independientes de 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 inflado automático del ocluidor utilizando el siguiente protocolo: 40 segundos de oclusión cada 20 minutos durante 2 horas y 20 minutos, seguido de un período de "reposo" (deflación) durante 5 horas 40 minutos. Este conjunto de 8 horas se repite 3 veces al día durante 5 con respecto a 10 días (solo en el módulo 1A y 2A). La LAD es ocluida automáticamente mediante inflado remoto o deflación a través del catéter. En las ratas con simulación (véase el módulo 1), se implanta el balón, pero no se aplica el RIP. Las ratas bajo el protocolo de isquemia repetitiva 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 final permanente. Después de 5 con respecto a 10 días (solo en el módulo 1A y 2A) del protocolo experimental, el ocluidor se infla permanentemente durante 90 minutos. El tamaño del infarto se mide por tinción TTC (n = 10/grupo). Por lo tanto, las ratas se anestesian y se someten nuevamente al registro de ECG para confirmar la oclusión (elevación del ST) y para calcular los parámetros de ECG y los números de arritmias. En los animales sin colaterales, la oclusión coronaria causa el deterioro de la hemodinámica sistémica y arritmias, que incluyen contracciones ventriculares prematuras, taquicardia ventricular y fibrilación ventricular; en animales con colaterales bien desarrolladas, no se observan tales efectos adversos. Los parámetros de ECG se registraron y se analizaron mediante un programa de ordenador (Lab chart 7).

5 Se abre el tórax mediante toracotomía media. El corazón se extirpa inmediatamente y se secciona desde el ápice hasta la base en cortes transversales de 2 mm de espesor paralelos al surco atrioventricular. Las secciones se incuban con tampón de fosfato de sodio de 0,09 mol/L que contiene 1,0 % de cloruro de trifetil tetrazolio (TTC) y 8 % de dextrano durante 20 minutos a 37 °C. Las secciones se fijan en formaldehído al 10 % y después se fotografían con una cámara digital montada en un estereomicroscopio. El tamaño infartado se cuantifica utilizando un programa de ordenador planométrico (Adobe Photoshop). El área infartada se identifica como el tejido negativo a TTC y se expresa como un porcentaje del área del ventrículo izquierdo (LV).

1.7. Detalles sobre los compuestos de ensayo

ASA	Merck Chemicals
NO intermitente (NTG (nitroglicerina))	solución de nitroglicerina; Nitrolingual akut® Spray, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Germany
NO continuo (ISDN retard)	Pelets de isosorbida dinitrato retard; Nitrosorbon® retard; G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Germany
Compuesto portador para NO intermitente (NTG-Placebo)	solución placebo de Nitrolingual akut® Spray, Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Germany
Compuesto portador para NO continuo (ISDN-Placebo)	pelets neutros de Nitrosorbon® retard; G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt, Germany
Tampón control	PBS (solución salina con tampón de fosfato)

10 1.8. Vía, tiempo y concentración de la administración a los animales

Todos los medicamentos (ASA y NTG e ISDN retard) se administran por adelantado al siguiente tiempo de oclusión del dispositivo. El tampón de control (PBS) se administra de la misma manera antes de las dos primeras oclusiones.

NO intermitente (NTG)

15 Se prepara una nueva solución de ensayo cada mañana a las ocho en punto. La solución se toma de los viales por medio de jeringas.

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

20 Debido a la instrumentación crónica de las ratas y para evitar más estrés, se administra NTG a través de la aplicación bucal. Se administran por aplicación bucal 50 µl de la solución de ensayo preparada diariamente que contiene 17,37 µg de nitroglicerina (equivalente a una dosis humana de 0,8 mg, calculada por la fórmula  $\text{dosis/animal [mg]} = \text{peso corporal metabólico [kg}^{0.75}] * \text{dosis humana [mg/kg]} * \text{factor de recálculo [kg/kg}^{0.75}]$  según Löscher, W., Ungemach, FR, Kroker, R., 1998, Blackwell Science, tercera edición) en el módulo 1, 2 y 4. El momento determinado de la aplicación es directamente por adelantado al inflado del balón a las 9 a.m. y a las 5 p.m., por lo tanto, con efectos máximos sobre las arterias colaterales reclutadas.

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

25 La solución de compuesto portador sirvió como solución stock para la preparación de la solución de ensayo.

Compuesto portador para NO intermitente (NTG-Placebo)

El compuesto portador se administra de manera idéntica al NO intermitente.

NO continuo (ISDN retard)

30 La medicación para la administración prolongada de NO (preparación retard de dinitrato de isosorbida = nitrato ISDN de acción prolongada) se administra como pelets retardados 1x al día.

Para la preparación retard se elige ISDN en una dosis de 2,6 mg ISDN/rata. Por lo tanto, se suspenden 13 mg de pelets en 0,5 ml de agua de bebida y se aplican por sonda a las 9 a.m. cada mañana (equivalente a una dosis humana de 2 mg/kg de peso corporal).

Compuesto portador de NO continuo (ISDN-Placebo)

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

NO intermitente más ASA (ácido acetilsalicílico)

Cada mañana, a las 9,30 a.m., se administran 2,22 mg de ASA por rata en 0,5 ml de agua de bebida por sonda directamente en el estómago.

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

1.9. Animales y grupos

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

10 Grupo d: 3 animales adicionales se tratan con las misma medicación y esquema de ligación que los correspondientes grupos a, b y c, pero sin FPO. Estos 9 animales por módulo se utilizan para imágenes de micro CT.

Módulo 1: Operación de simulación (sin el RIP):

- A. Tampón de control (PBS, solución salina tamponada con fosfato) con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 20
  - 1. n = 10: "PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS"
  - 15 2. n = 10: "PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS"
- B. Compuesto portador sin NO más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 10: "NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS"
- C. NTG con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 10: "NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS"
- 20 D. A1.) n = 3 A2.) n = 3 B) n = 3 C) n = 3 para imágenes de micro CT n = 12 total: n = 52

Módulo 2: NO intermitente:

- 25 A. Tampón de control intermitente con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 20
  - 1. n = 10: "PBS RIP 5 DÍAS"
  - 2. n = 10: "PBS RIP 10 DÍAS"
- B. Compuesto de portador intermitente más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 10: "NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS"
- 30 C. NTG intermitente con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 10: "NTG RIP 5 DÍAS"
- D. A1.) n = 3 A2.) n = 3 B) n = 3 C) n = 3 para imágenes de micro CT n = 12 total: n = 52

35 Módulo 3: NO continuo:

- A. Tampón de control continuo (agua de bebida) con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 10: "DW RIP 5 DÍAS"
- B. Compuesto portador continuo más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto n = 10: "ISDN-PLACEBO RIP 5 DÍAS"



C. NO continuo con FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

n = 10: "ISDN RIP 5 DÍAS"

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

n = 9

5 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: "PBS + ASA RIP 5 DÍAS"

B. Compuesto portador de NO intermitente + ASA más FPO funcional para la detección del tamaño del infarto

10 n = 10: "NTG-PLACEBO + ASA RIP 5 DÍAS"

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

n = 10: "NTG+ASA RIP 5 DÍAS"

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

n = 9

15 total: n = 39

## 2. Análisis estadístico

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

20 Los resultados obtenidos al medir la elevación del segmento ST, el tamaño del infarto y los diámetros de los vasos se analizan para su significación estadística utilizando el paquete de software SPSS 20 (IBM SPSS Statistics, NY, USA). Se utiliza ANOVA con corrección de la tasa de falsos descubrimientos, FDR. Los valores de p se ajustan para pruebas múltiples utilizando un procedimiento de FDR para lograr una significación para todo el experimento de  $p \leq 0,05$ . La FDR tiene en cuenta el número de hipótesis nulas rechazadas y se ha demostrado que aumenta el poder estadístico en comparación con la corrección de Bonferroni.

## 3. Resultados

### 25 3.1 Oclusión final permanente

La oclusión de la LAD permitió un estudio prospectivo de la función de los vasos colaterales. Dichos vasos pueden proteger el tejido miocárdico en riesgo de isquemia después de la oclusión coronaria.

30 Al final del protocolo de isquemia repetitiva, la oclusión permanente de la LAD se realiza en un subgrupo de todos los grupos y se miden los parámetros de 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 de ECG

Las manifestaciones electrocardiográficas de isquemia iniciadas por la oclusión de la LAD son menos pronunciadas cuando hay vasos colaterales.

### 3.3. Elevación del segmento ST

35 Durante la oclusión de la LAD, existe una correlación inversa entre la magnitud de la elevación del segmento ST y la extensión del suministro colateral.

40 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 del segmento ST reversible durante la oclusión aguda de la LAD se relaciona con una función arterial colateral inadecuada. En pacientes con depresión del segmento ST reversible, la función colateral coronaria parece que es mejor y, en consecuencia, muestra menos resultados de isquemia.

Durante los 90 minutos de oclusión, la elevación del segmento ST en "PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS" es significativamente más alta en comparación con el grupo de "PBS RIP 10 DÍAS" (SIMULACIÓN 10 DÍAS, n = 7:  $0,124 \pm 0,039$  mV; RIP 10 DÍAS, n = 7:  $0,055 \pm 0,033$  mV). En contraste, la elevación del segmento ST en "PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS" es similar al grupo de "PBS RIP 5 DÍAS" (SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 8:  $0,134 \pm 0,034$  mV; RIP

5 DÍAS, n = 8:  $0,104 \pm 0,016$  mV) (Figuras 1 y 2).

Módulo 1: Operación de simulación (sin el RIP)

5 No hay significancia estadística entre los tres grupos de Simulación (PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 8:  $0,134 \pm 0,034$  mV; NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 6:  $0,131 \pm 0,043$  mV; NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 7:  $0,124 \pm 0,058$  mV) (Figuras 3 y 4).

Módulo 2: NO intermitente (NTG)

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

Módulo 3: NO continuo (ISDN retard)

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

Módulo 4: NO intermitente más ASA

20 La elevación del segmento ST en el grupo tratado con PBS y ASA es más alta en comparación con el grupo control de PBS (ASA + PBS RIP 5 DÍAS, n = 7:  $0,138 \pm 0,098$  mV; PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $0,104 \pm 0,016$  mV), pero no hay diferencia significativa, así como entre el grupo ASA + NTG-Placebo (ASA + NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS, 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 (NTG + ASA RIP 5 DÍAS, n = 7:  $0,088 \pm 0,071$  mV) (Figuras 9 y 10).

### 3.4. Arritmias ventriculares

25 La importancia de los latidos ventriculares prematuros (los VPB) se debe a su posible asociación con un mayor riesgo de muerte súbita cardíaca. Los VPB fueron estratificados según la clasificación de Lown. Se ha demostrado que un alto grado de Lown predice la mortalidad después de un infarto de miocardio agudo.

Grado 0: sin latidos ectópicos ventriculares

Grado I: VPB ocasionales y aislados

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

Grado III: VPB multiformes

30 (a) VPB

(b) Bigéminos

Grado IV: VPB repetitivos

(a) Ritmo bigeminado

(b) Salvos

35 Grado V: VPB tempranos

Módulo 1: Operación de simulación (sin el RIP)

40 En el grupo "PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS", el 87,5 % de las ratas tienen arritmias clase IVb y el 12,5 % clase IVa. En el grupo "NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS", el 83,3 % tiene arritmias IVb y el 16,7 % clase IVa y en el grupo "NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS" el 85,7 % tiene arritmias IVb y el 14,3 % arritmias clase IIIa (Fig. 11).

Módulo 2: NO intermitente (NTG)

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

Módulo 3: NO continuo (ISDN retard)

En el grupo de "ISDN-PLACEBO 5 DÍAS", el 57,1 % de las ratas tienen arritmias clase IVb, el 14,3 % clase IVa y el 28,6 % clase IIIb. El grupo "ISDN RIP 5 DÍAS" muestra arritmias menos graves con 57,1 % clase IVb, 28,6 % clase IIIb y 14,3 % de arritmias clase 0 (Fig. 13).

5 Módulo 4: NO intermitente más ASA

En el grupo "ASA + PBS RIP 5 DÍAS", en el grupo tratado con ASS + NTG-PLACEBO y en el grupo de "ASS + NTG RIP 5 DÍAS" el 83,3 % de las ratas tiene arritmias clase IVb y el 16,7 % clase IIIa (Fig. 14).

Con respecto al porcentaje de cada grado de Lown de cada grupo, se puede determinar una puntuación de VBP. Cuantos más animales muestran un grado más alto, mayor es la puntuación de VBP (Fig. 15).

10 Figura 15: Puntuación VPB

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

Tabla 1: Puntuación VPB

3.5. Tamaño del infarto

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

15 El grupo "PBS RIP 10 DÍAS" tiene un área de infarto significativamente más pequeña en comparación con el grupo "PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS" (PBS RIP 10 DÍAS, n = 6: 6,57 ± 3,26 %; PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS, n = 7: 13,71 ± 6,04 %). No hay diferencia significativa entre ambos grupos de 5 días (PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 8: 13,36 ± 5,22 %; PBS RIP 5 DÍAS, n = 8: 11,05 ± 5,12 %) (Fig. 16).

Módulo 1: Operación de simulación (sin el RIP)

20 No hay diferencia significativa entre los tres grupos de Simulación (PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 8: 13,36 ± 5,22 %; NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 6: 14,21 ± 5,79 %; NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 7: 14,09 ± 5,18 %) (Fig. 17).

## Módulo 2: NO intermitente (NTG)

5 En comparación con el "PBS RIP 5 DÍAS", se observa un área de infarto significativamente más pequeña en el grupo "NTG RIP 5 DÍAS" (PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12$  %; NTG RIP 5 DÍAS, n = 7:  $3,61 \pm 2,08$  %). No hay diferencia significativa entre el grupo de PBS y NTG-Placebo (NTG-PLACEBO 5 DÍAS: n = 6;  $9,80 \pm 6,79$  %) (Fig. 18).

## Módulo 3: NO continuo (ISDN retard)

El tamaño del infarto en el grupo ISDN ("ISDN RIP 5 DÍAS") es más pequeño en comparación con el grupo PBS (PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12$  %; ISDN RIP 5 DÍAS, n = 7:  $7,59 \pm 4,38$  %), así como el grupo ISDN-Placebo (ISDN-PLACEBO 5 DÍAS, n = 6:  $9,97 \pm 3,65$  %) (Fig. 19).

## 10 Módulo 4: NO intermitente más ASA

15 El tamaño del infarto en el grupo tratado con ASA ("ASA + PBS de 5 días") se aumenta mínimamente en comparación con el grupo control de PBS (ASA + PBS RIP 5 DÍAS, n = 6:  $12,51 \pm 3,05$  %; PBS RIP 5 DÍAS, n = 8:  $11,05 \pm 5,12$  %), así como el grupo ASA + NTG-Placebo (ASA + NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS, n = 6:  $13,92 \pm 1,71$  %). No hay diferencia entre el grupo ASA + NTG y el grupo tratado con ASA y PBS (Fig. 20). Sin embargo, el área de infarto en el grupo NTG es significativamente más pequeña en comparación con el grupo ASA + NTG (NTG RIP 5 DÍAS, n = 7:  $3,61 \pm 2,08$  %; NTG + ASS RIP 5 DÍAS, n = 6:  $13,00 \pm 3,82$  %) (Fig. 20).

## 3.6. Imagen microvascular coronaria con micro-CT

20 Las arterias colaterales son vasos preexistentes que corren paralelos a una arteria principal. En 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 esta área (ROI, región de interés) comienzan a crecer en longitud (claramente visible por el patrón de tornillo de corcho) y lo más notablemente en su diámetro. Así se mide el diámetro de las colaterales en la región de interés.

## Módulo 1: Operación de simulación (sin el RIP)

25 No hay diferencia significativa entre los tres grupos de Simulación (PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 3:  $82,7 \pm 3,7$   $\mu\text{m}$ ; NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 3:  $89,6 \mu\text{m} \pm 10,6$   $\mu\text{m}$ ; NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS, n = 3:  $86,8 \pm 9,0$   $\mu\text{m}$ ) (Figuras 22 y 26).

## Módulo 2: NO intermitente (NTG)

30 En comparación con el "PBS RIP 5 DÍAS", los diámetros de las colaterales en la región de interés en el grupo "NTG RIP 5 DÍAS" aumentan significativamente (PBS RIP 5 DÍAS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9$   $\mu\text{m}$ ; NTG RIP 5 DÍAS, n = 3:  $158,4 \pm 9,2$   $\mu\text{m}$ ). No hay diferencia entre el grupo de PBS y NTG-Placebo (NTG-PLACEBO 5 DÍAS: n = 3;  $127,0 \pm 12,1$   $\mu\text{m}$ ) (Figuras 23 y 26).

## Módulo 3: NO continuo (ISDN retard)

35 El diámetro de las colaterales en el grupo ISDN ("ISDN RIP 5 DÍAS") se mejora en comparación con el grupo PBS (PBS RIP 5 DÍAS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9$   $\mu\text{m}$ ; ISDN RIP 5 DÍAS, n = 3:  $148,2 \pm 11,3$   $\mu\text{m}$ ), así como en comparación con el grupo ISDN-Placebo (ISDN-PLACEBO 5 DÍAS, n = 3:  $133,0 \pm 11,5$   $\mu\text{m}$ ) (Figuras 24 y 26).

## Módulo 4: NO intermitente más ASA

40 El diámetro en el grupo tratado con PBS y ASA es significativamente más pequeño en comparación con el grupo control de PBS (PBS + ASA RIP 5 DÍAS, n = 3:  $102,5 \pm 8,0$   $\mu\text{m}$ ; PBS RIP 5 DÍAS, n = 3:  $129,8 \pm 6,9$   $\mu\text{m}$ ), pero no hay diferencia significativa en comparación con el grupo de ASA + NTG- Placebo (NTG-PLACEBO + ASA 5 DÍAS, n = 3:  $97,1 \pm 8,6$   $\mu\text{m}$ ). En el grupo ASA + NTG los diámetros están significativamente aumentados en comparación con el grupo tratado con PBS y ASA (ASA + NTG RIP 5 DÍAS, n = 3:  $124,4 \pm 5,6$   $\mu\text{m}$ ) (Figuras 25 y 26).

## 4. Conclusión

45 Se examinaron los grupos "PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS" y "PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS", cada uno sin un RIP (protocolo de isquemia repetitiva) y los grupos "PBS RIP 10 DÍAS" y "PBS RIP 5 DÍAS", 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 final permanente) reveló áreas infartadas significativamente más pequeñas en el grupo RIP 10 DÍAS que en el grupo "SIMULACIÓN 10 DÍAS". En contraste, después de un RIP de cinco días, no se observaron diferencias en el grupo de SIMULACIÓN y de RIP.

50 Además, se utilizaron por primera vez los parámetros de ECG para los exámenes y evaluación. Se encontró la

máxima elevación del ST después que la FPO de la LAD no presentaba todavía diferencias cruciales entre "PBS RIP 5 DÍAS" y los grupos de SIMULACIÓN. Sin embargo, después de 10 días, las elevaciones de ST disminuyeron significativamente en el grupo del RIP.

5 Aparte de la medida de la elevación del ST durante la FPO, se pudieron analizar y evaluar las arritmias de manera diferenciada.

En base a estas nuevas percepciones sobre la caracterización del modelo de RMI de ratas, se decidió utilizar un RIP de 5 días en caso de una estimulación esperada de la arteriogénesis. El grado de aumento de la elevación de ST y el volumen del infarto después de un RIP de 10 días aún se pueden obtener con sustancias pro-arteriogénicas dentro de un RIP de 5 días.

10 Esto proporciona parámetros adicionales que hacen posible aprobar los resultados de medida del volumen del infarto.

15 La aplicación intermitente de la solución de NTG (dos veces al día en la mucosa bucal) disminuyó las arritmias graves del corazón de rata durante la FPO en comparación con el grupo control. Además, el volumen del infarto se reduce en más del 50 % después de 90 minutos de FPO en comparación con el grupo 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 solución de NTG atenuó significativamente la elevación del ST durante la FPO. En base a los análisis de  $\mu$ CT, las arterias colaterales agrandadas significativamente fueron medibles.

20 El tratamiento de las ratas con ISDN retard (una vez al día por vía intragástrica) también llevó a disminuciones en la elevación de ST durante la FPO, menos arritmias y reducción del volumen del infarto. Sin embargo, estas mejoras de los parámetros del infarto son menos marcadas en comparación con el tratamiento con NTG. Más aún, no mostraron ninguna significancia estadística.

25 En comparación con los controles, el tratamiento con ASA mostró un deterioro de los parámetros de ECG y un aumento de los volúmenes del infarto debido al deterioro del crecimiento colateral. Estos efectos negativos de ASA sobre la arteriogénesis también son conocidos. Curiosamente, se pueden eliminar parcialmente mediante un tratamiento adicional con NTG (dos veces al día en la mucosa bucal). Por lo tanto, los diámetros colaterales se ampliaron en la ROI y se mejoraron los parámetros de ECG. Sin embargo, los volúmenes de infarto después de FPO no mostraron reducción. Los grupos de Simulación no diferían entre sí. Además, no hubo diferencias medidas entre los grupos de placebo y sus correspondientes grupos control.

30 En conclusión, los resultados presentados indican que un tratamiento intermitente con solución de NTG disminuye el tamaño de un infarto de miocardio inducido experimentalmente. Además, los efectos sobre la frecuencia cardíaca pueden mejorar. Estas ideas son de gran relevancia para los aspectos clínicos.

#### Ejemplo 16

##### Estudio clínico

35 El objetivo de este estudio es investigar los efectos de un programa de ejercicios estandarizado supervisado, controlado por un médico para el tratamiento sintomático, la mejora funcional y el aumento de la capacidad arteriogénica en pacientes con CAD crónica estable.

#### 1. Diseño del estudio

##### 1.1 Hipótesis y brazos del estudio.

##### 1.1.1 Hipótesis

40 I El entrenamiento con ejercicio activo controlado por un médico con aplicación intermitente de GTN es superior al entrenamiento con ejercicio activo controlado por un médico sin GTN.

(A+) > (A-)

II El entrenamiento con ejercicio pasivo controlado por un médico (CardioAccel®) con aplicación intermitente de GTN es superior al entrenamiento con ejercicio pasivo controlado por un médico sin GTN.

45 (P+) > (P-)

III La terapia conservadora de CAD con aplicación intermitente de GTN es superior a la terapia conservadora de CAD sin GTN.

(C+) > (C-)

##### 1.1.2 Brazos de estudio

- A+ Entrenamiento con ejercicio activo controlado por un médico con aplicación intermitente de GTN
- A- Entrenamiento con ejercicio activo controlado por un médico
- P+ Entrenamiento con ejercicio pasivo controlado por un médico (CardioAccel®) con aplicación intermitente de GTN
- 5 P- Entrenamiento con ejercicio pasivo controlado por un médico (CardioAccel®)
- C+ Terapia conservadora de CAD con aplicación intermitente de GTN
- C- Terapia conservadora de CAD

Los pacientes pueden usar GTN en caso de angina de pecho, sin embargo, se les administrará un GTN adicional de estudio para uso en el estudio.

- 10 Entrenamiento con ejercicio activo controlado por un médico con aplicación intermitente de GTN.

La mejor terapia médica y el cuidado habitual como se detalla en las recomendaciones actuales (AHA, ESC) para el cuidado de pacientes con angina crónica estable. Intervalos diarios (de lunes a viernes) de ejercicio físico (cinta de correr) de 30 min ( $\geq 1$  W/kg de peso corporal, después de la estratificación del riesgo y el cálculo y ajuste individual de la intensidad del entrenamiento como se detalla en las recomendaciones actuales de la EACPR, durante un total de seis semanas. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de los episodios de angina de pecho. Además, se administra GTN 0,4 mg 2-5 min antes del inicio del ejercicio.

- 15

Entrenamiento con ejercicio activo controlado por un médico.

La mejor terapia médica y el cuidado habitual según se detalla en las recomendaciones actuales (AHA, ESC) para el cuidado de pacientes con angina crónica estable. Intervalos diarios de ejercicio físico (de lunes a viernes) (cinta de correr) de 30 min ( $\geq 1$  W/kg de peso corporal), después de la estratificación del riesgo y el cálculo individual y ajuste de la intensidad de entrenamiento como se detalla en las recomendaciones actuales de EACPR, durante un total de seis semanas. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina de pecho.

- 20

Entrenamiento con ejercicio pasivo controlado por un médico (CardioAccel®) con aplicación intermitente de GTN.

La mejor terapia médica y el cuidado habitual según se detalla en las recomendaciones actuales (AHA, ESC) para el cuidado de pacientes con angina crónica estable. Intervalos diarios de tratamiento con CardioAccel® (de lunes a viernes) de una hora al día durante un total de seis semanas, como ha sido detallado (Arora RR, Chou TM, Jain D, Fleishman B, Crawford L, McKiernan T, Nesto RW. The multicenter study of enhanced external counterpulsation (MUST-EECP): effect of EECP on exercise-induced myocardial ischemia and anginal episodes. J Am Coll Cardiol. 1999 Jun; 33 (7): 1833-40). Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina de pecho. Además, se administra GTN 0,4 mg 2-5 minutos antes del inicio del ejercicio. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina.

- 25
- 30

Entrenamiento con ejercicio pasivo controlado por un médico (CardioAccel®).

La mejor terapia médica y el cuidado habitual según se detalla en las recomendaciones actuales (AHA, ESC) para el cuidado de pacientes con angina crónica estable. Intervalos diarios de tratamiento (de lunes a viernes) con CardioAccel® de una hora al día durante un total de seis semanas, como ha sido detallado (Arora *et al.*, *supra*). Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina de pecho.

- 35

Terapia conservadora de CAD con aplicación intermitente de GTN.

La mejor terapia médica y el cuidado habitual según se detalla en las recomendaciones actuales (AHA, ESC) para el cuidado de pacientes con angina crónica estable. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina de pecho. Además, se administra GTN 0,4 mg una vez al día, preferiblemente antes del inicio de una actividad voluntaria de la vida diaria.

- 40

Terapia conservadora de CAD.

La mejor terapia médica y el cuidado habitual según se detalla en las recomendaciones actuales (AHA, ESC) para el cuidado de pacientes con angina crónica estable. Se permite el uso de GTN para el tratamiento de episodios de angina.

- 45

1.2 Diseño de ensayo clínico

1.2.1 Diseño de ensayo clínico - general

El estudio está diseñado como un ensayo clínico

- prospectivo
- 5 • aleatorizado
- multicéntrico (sitio de Alemania, sitio de Estados Unidos)

para evaluar los efectos del trinitrato de glicerilo (Nitrolingual®) sobre la capacidad de ejercicio, siendo el mecanismo patofisiológico propuesto una inducción de efectos pro-arteriogénicos.

1.2.2 Criterios de valoración del estudio

10 Principal

Cambios en

la capacidad de ejercicio funcional, según lo medido en la visita 3 por el pico de volumen de consumo de oxígeno (VO<sub>2</sub> máximo) y el consumo máximo de oxígeno en el umbral anaeróbico (VO<sub>2</sub> máximo en AT) desde la línea base en una prueba estandarizada de ejercicio en cinta de correr (sETT).

15 Secundario

Cambios en

- (1) Tiempo hasta la isquemia inducida por el ejercicio medida por el tiempo hasta una depresión del segmento ST > 1 mm en una prueba estandarizada de ejercicio en cinta de correr (sETT),
- 20 (2) las respuestas hemodinámicas a la prueba sETT, cuantificadas por el producto de tensión-frecuencia cardíaca (RPP)<sup>1</sup>, que se define como la tensión arterial sistólica (mm de Hg) multiplicada por la frecuencia cardíaca (bpm). La frecuencia cardíaca, la tensión arterial y las tendencias del segmento ST se miden electrónicamente en el punto J + 60 ms,
- (3) el número de episodios de angina al día,
- (4) duración del ejercicio en la prueba sETT,
- 25 (5) Índice de la pendiente relativa del pico (RPSI),
- (4) Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler [ACCmax],
- (5) Estado funcional CCS y NYHA,
- (6) Puntuación de Duke de la cinta de correr<sup>2</sup>,

---

<sup>1</sup> El producto presión-frecuencia cardíaca (RPP) es un índice sensible del consumo de oxígeno en el miocardio (mVO<sub>2</sub>). Los pacientes se clasifican por el producto de presión frecuencia cardíaca (RPP) que existía en el momento de la depresión máxima del ST. En ausencia de depresión ST, se registra el máximo RPP.

<sup>2</sup> La puntuación de Duke de la cinta de correr calcula el riesgo; es igual al tiempo de ejercicio en minutos menos (5 veces la desviación del segmento ST, durante o después del ejercicio, en milímetros) menos (4 veces el índice de angina, que tiene un valor de "0" si no hay angina, "1" si aparece angina y "2" si la angina es la razón para interrumpir la prueba). Entre los pacientes ambulatorios con sospecha de CAD, los dos tercios de los pacientes con puntuaciones que indican un riesgo bajo tenían una tasa de supervivencia de cuatro años del 99 % (tasa media de mortalidad anual del 0,25 %), y el 4 % que tenía puntuaciones que indicaban un riesgo alto tenía una tasa de cuatro años tasa de supervivencia del 79 % (tasa media de mortalidad anual del 5 %). La puntuación funciona bien tanto para pacientes hospitalizados como ambulatorios, y los datos preliminares dan a entender que la puntuación funciona igual de bien para hombres y mujeres [Gibbons *et al.*, 2003 AHA / ACC Guideline]

(7) Incidencia de sucesos cardiovasculares durante la fase de tratamiento y

(8) igual que el criterio de valoración primario, pero un mes después del período de intervención.

### 1.2.3 Pacientes

5 Los pacientes elegibles deben ser clínicamente estables, y recibir antes de la inscripción una terapia antianginal y anti-CAD que esté en total acuerdo con las recomendaciones actuales de la ESC/AHA para el tratamiento de la CAD crónica estable.

#### Medicación prohibida

- nitratos de acción prolongada
- Sildenafil etc.
- 10 • Compuestos antiinflamatorios (distintos de la aspirina) tales como los esteroides o el etanercept, etc.

#### Criterios de inclusión

Edad > 18 años

15 Evidencia documentada de enfermedad arterial coronaria estable mediante pruebas de esfuerzo con ejercicio nuclear positivo, estenosis coronaria documentada angiográficamente o historia documentada de elevación del ST o infarto de miocardio

#### Criterios de exclusión

Intolerancia a los nitratos o intolerancia a cualquier componente de la medicación del estudio.

Medicación que tenga un riesgo de interacción farmacológica con GTN.

20 Síndrome coronario agudo o angina inestable ≤ 6 semanas antes.

Estenosis principal izquierda de ≥ 50 %.

PCI o CABG ≤ 3 meses antes.

Angiografía coronaria ≤ 3 semanas antes.

Insuficiencia cardíaca congestiva/EF de ≤ 30 %.

25 Valvulopatía o miocarditis.

Hipertensión no controlada con valores de tensión arterial ≥ 180/100 mm de Hg

PAD sintomática grave, varicosis, trombosis venosa profunda (actual o en el historial médico documentado), flebitis o úlcera.

Trastorno de la coagulación o anticoagulación terapéutica.

30 Arritmias cardíacas que interfieren con desencadenamiento de la ECP.

Características del ECG que invaliden la monitorización del segmento ST: depresión del segmento ST en la línea base, frecuencias cardíacas dependientes de marcapasos, duración de QRS > 0,12 s, arritmias distintas a la arritmia sinusal.

FEV1 < 1,51.

35 Participación actual en un programa de rehabilitación con ejercicio cardíaco.

#### Aleatorización

40 Los pacientes inscritos se asignan al azar en una relación de 1:1:1 para recibir/someterse a un entrenamiento activo, a terapia con CardioAccel® o al cuidado habitual, es decir, una continuación del tratamiento de la línea base según las recomendaciones actuales. Dentro de estos grupos, los pacientes se asignan al azar en una proporción de 1: 1 a un grupo "+ GTN" o a un grupo "-GTN" para recibir trinitrato de glicerol, además de su medicación estándar, o no.



1.2.4 Planificación del estudio, procedimiento y control.

El ensayo es planificado por Arteriogenesis Network Art.Net.

El control del estudio estará cubierto por Arteriogenesis Network Art.Net.

c/o Campus Technologies Freiburg GmbH

5 Technology Transfer of the University of Freiburg

CEO: Prof. Dr. Bernhard Arnolds

Stefan-Meier Straße 8, 79104 Freiburg (Germany)

Phone: +49 (0) 761 203 4990

Facsimile: +49 (0) 761 203 4992

10 El patrocinador del ensayo es CTF.

Las estructuras de informes y los esquemas de informes se detallarán una vez que los centros participantes hayan sido asignados.

Sitios de investigación

Centros participantes: a determinar.

15 Contacto en caso de dudas, difusión de información.

Contacto en caso de sucesos adversos, difusión de información.

1.2.5 Diagrama de flujo del estudio y protocolo

El diagrama de flujo del estudio se muestra en la Figura 27.

1.2.6 Asignación de tratamiento

20 La aleatorización se realizará en los centros de realización por medio de sobres.

La estratificación se realizará según grupos de edad, sexo y morbilidad.

Las visitas del estudio son realizadas por un investigador.

Los centros de estudio, por su parte, asignan investigadores ciegos que desconocen la aleatorización y que realizan los exámenes y análisis médicos en la línea de base y en el primer seguimiento.

25 En cada visita del estudio, los pacientes reciben instrucciones para completar un breve formulario de evaluación de calidad de vida estandarizado (SF-36<sup>3</sup>).

Los pacientes asignados a los grupos C + / C- son contactados regularmente por el personal del estudio para ayudar a controlar los efectos potenciales de sesgo, ya que estos sujetos no tienen contactos tan regulares con el personal del estudio como lo hacen los grupos de CardioAccel® o de ejercicio.

30 1.2.7 Visitas de estudio

Visita 1: Cribado de elegibilidad (día 1)

- Historial médico, incluyendo intervenciones previas, examen físico.
- Inscripción sí/no

Visita 2: Visita de línea base (hasta el día 14 (+3 días))

- 35
- Historial médico detallado y examen físico, incluyendo la evaluación del número de episodios de angina al día, el estado de CCS y NYHA y la evaluación de la actividad física voluntaria.
  - Pruebas en cinta para correr en un equipo estándar, calibrado, con capacidad de análisis cardiopulmonar (protocolo de Naughton modificado): capacidad de ejercicio funcional (VO<sub>2</sub> máximo y VO<sub>2</sub> máximo con AT),

<sup>3</sup> [http://www.rand.org/health/surveys\\_tools/mos/mos\\_core\\_36item.html](http://www.rand.org/health/surveys_tools/mos/mos_core_36item.html)

- tiempo hasta la isquemia inducida por el ejercicio medida por el tiempo hasta una depresión del segmento ST > 1 mm, producto de presión-frecuencia cardíaca (RPP), frecuencia cardíaca, presión arterial y tendencias del segmento ST medidas electrónicamente en el punto J + 60 ms, duración del ejercicio, puntuación DUKE de la cinta de correr, monitorización continua de signos vitales incluido ECG de 12 derivaciones y VO<sub>2</sub>, con VO<sub>2</sub> max definido como VO<sub>2</sub> en el nivel máximo de ejercicio que el paciente individual es capaz de alcanzar (relación respiratoria > 1, umbral anaeróbico)
- 5
- Índice de la pendiente relativa del pico (RPSI)
  - Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler [ACCmax]
  - Aleatorización
- 10 Visitas intermedias (no programadas)
- Se avisa a los pacientes que se pongan en contacto con el centro de estudio en cualquier momento con respecto a su condición médica. Se programó que los pacientes regresen para sus primeras visitas de seguimiento a las 6 semanas después de la asignación aleatoria.
- Visita 3: Seguimiento a corto plazo (1-3 días después del período de intervención)
- 15
- Historial médico y examen físico, incluyendo la evaluación del número de episodios de angina al día, el estado de CCS y NYHA y la evaluación de la actividad física voluntaria.
  - Pruebas en cinta de correr en un equipo de cintas de correr estándar, calibrado, con capacidad de prueba cardiopulmonar (protocolo de Naughton modificado):
- 20 la capacidad funcional de ejercicio (VO<sub>2</sub> máximo y VO<sub>2</sub> máximo en AT), el tiempo hasta la isquemia inducida por el ejercicio medida por el tiempo hasta una depresión del segmento ST > 1 mm, el producto de frecuencia cardíaca-tensión (RPP), la frecuencia cardíaca, la tensión arterial y las tendencias del segmento ST medidas electrónicamente en el punto J + 60 ms, la duración del ejercicio, la puntuación DUKE de la cinta de correr,
- 25 monitorización continua de signos vitales incluido ECG de 12 derivaciones y VO<sub>2</sub>, con VO<sub>2</sub> max definido como VO<sub>2</sub> en el nivel máximo de ejercicio que el paciente individual es capaz de alcanzar (relación respiratoria > 1, umbral anaeróbico)
- Índice de la pendiente relativa del pico (RPSI)
  - Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler [ACCmax]
  - Incidencia de sucesos cardiovasculares durante la fase de tratamiento.
- 30 Visita 4: Seguimiento a largo plazo (1 mes después del período de intervención)
- (La justificación de este momento del estudio es evaluar el efecto a largo plazo de la medicación del estudio después del período de intervención).
- Historial médico y examen físico, incluida la evaluación del número de episodios de angina al día, el estado de CCS y NYHA y la evaluación de la actividad física voluntaria.
- 35
- Pruebas en cinta de correr en un equipo de cintas de correr estándar, calibrado, con capacidad de prueba cardiopulmonar (protocolo de Naughton modificado):
- 40 La capacidad funcional de ejercicio (VO<sub>2</sub> máximo y VO<sub>2</sub> máximo en AT), el tiempo hasta la isquemia inducida por el ejercicio medido por el tiempo hasta una depresión del segmento ST > 1 mm, el producto de frecuencia cardíaca-tensión (RPP), la frecuencia cardíaca, la tensión arterial y las tendencias del segmento ST medidas electrónicamente en el punto J + 60 ms, la duración del ejercicio, la puntuación DUKE de la cinta de correr,
- monitorización continua de signos vitales incluido ECG de 12 derivaciones y VO<sub>2</sub>, con VO<sub>2</sub> max definido como VO<sub>2</sub> en el nivel máximo de ejercicio que el paciente individual es capaz de alcanzar (relación respiratoria > 1, umbral anaeróbico)
- 45
- Índice de la pendiente relativa del pico (RPSI)
  - Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler [ACCmax]

1.2.8 Consideraciones estadísticas

5 El principal parámetro de eficacia es la capacidad de ejercicio funcional, medida por el volumen máximo de consumo de oxígeno ( $VO_2$  max) y el consumo máximo de oxígeno en el umbral anaeróbico ( $VO_2$  máximo en AT) en una prueba estandarizada de ejercicio en cinta de correr (sETT). Se supone que no hay diferencias en la línea base, pero valores significativamente más altos en los grupos GTN en el seguimiento.

Métodos estadísticos

10 Hay dos fuentes principales de varianza a considerar en este ensayo: los efectos del tratamiento con GTN y los efectos del entrenamiento activo/entrenamiento pasivo/terapia conservadora. Por consiguiente, los datos serán analizados en una ANOVA de dos vías. Cualquier efecto de la terapia no relacionado con GTN se publicará de forma descriptiva sin estadística de inferencia.

Para los parámetros secundarios se aplicarán ensayos paramétricos o no paramétricos, según corresponda.

Tamaño/potencia de la muestra

15 Para establecer el tamaño de muestra necesario para la ANOVA bidireccional propuesta, se hicieron las siguientes suposiciones (en base a una revisión de las publicaciones y datos internos): poder estadístico = 80 %, desviación estándar para la medida de resultado = 15 % de la media, tamaño del efecto (diferencia de grupo en el cambio entre GTN sí/no) = 5 % de la media. La potencia estadística se estableció en una simulación de Monte Carlo basada en 10000 repeticiones por tamaño de muestra en un intervalo de n por grupo de 30 a 60 pacientes. Esta simulación estableció un tamaño mínimo de muestra de 48 sujetos por grupo, para permitir posibles abandonos, se propuso incluir 50 sujetos por grupo, lo que da como resultado un tamaño de muestra total de 300 pacientes.

20 1.3 Aspectos éticos y legales.

Los investigadores planifican y llevan a cabo experimentos con seres humanos, incluyendo muestras identificables tomadas de seres humanos y datos identificables, de conformidad con

(a) la Declaración de Helsinki (Principios éticos para la investigación médica con seres humanos) firmada por la Asociación Médica Mundial (WMA) en junio de 1964, según la última revisión;

25 (b) la Guía tripartita armonizada de la ICH: Guía para las buenas prácticas clínicas E6/Conferencia internacional sobre la armonización de los requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH E6, 1 de mayo de 1996), así como

30 (c) las regulaciones alemanas aplicables (por ejemplo, Arzneimittelgesetz) en sus formas actuales, así como las regulaciones aplicables de la FDA (por ejemplo, Guía para patrocinadores, investigadores, elementos de consentimiento informado, 21 CFR § 50,25 (c)).

5. Lista de abreviaturas

ACC<sub>max</sub>: Aceleración sistólica máxima derivada de Doppler

Art.Net.: Subcontratistas de la red de CTF

CAD: Enfermedad de las arterias coronarias

35 CardioAccel®: terapia personalizada de contrapulsación.

CCS: Canadian Class Society (clasificación de angina)

CTF: Campus Technologies Freiburg

FSS: esfuerzo cortante fluido

GTN: trinitrato de glicerilo

40 IABP: bomba de balón intraaórtica

NYHA: Asociación del Corazón de Nueva York

RPSI: Índice de la pendiente relativa del pico

sETT: una prueba estandarizada de ejercicio en cinta de correr

SMC: célula del músculo vascular liso.

45  $VO_2$  max: volumen máximo de consumo de oxígeno

VO<sub>2</sub> max AT: consumo máximo de oxígeno en el umbral anaeróbico

Además, se describen los siguientes elementos:

- 5 1. Un método para tratar o prevenir una insuficiencia arterial, en donde se administra un dador de NO de forma intermitente a un sujeto en una cantidad eficaz para la inducción de arteriogénesis, y en donde el dador de NO es trinitrato de glicerilo en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaringea u oral caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de trinitrato de glicerilo (GTN), al menos un diluyente, un material portador y al menos una sustancia que reduce la volatilidad del GTN, por lo que esta sustancia es un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C.
- 10 2. El método del punto 1, en donde la insuficiencia arterial es debida a un suministro insuficiente de oxígeno o de sangre de un tejido abastecido por la arteria o por un bypass o derivación durante el descanso o el ejercicio físico.
3. El método de cualquiera de los puntos 1 o 2, en donde la insuficiencia arterial es debida a un aumento de la demanda de oxígeno o de flujo sanguíneo de un tejido abastecido por la arteria o por un bypass o derivación.
4. El método de cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde la insuficiencia arterial se caracteriza por una oclusión parcial o completa de un vaso arterial.
- 15 5. El método de cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde la insuficiencia arterial es debida a la deposición de material en los vasos sanguíneos.
6. El método de cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde la insuficiencia arterial es debida a una compresión externa o interna de una arteria.
7. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una enfermedad vascular.
- 20 8. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en aterosclerosis, una enfermedad isquémica y una enfermedad arterial crónica adicional.
9. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial coronaria.
- 25 10. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial cerebral.
11. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial periférica.
12. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial intestinal.
- 30 13. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial urogenital.
14. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial nerviosa.
- 35 15. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial se encuentra en el contexto de la esclerodermia.
16. El método de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde la insuficiencia arterial es una insuficiencia de la arteria retiniana central.
17. El método de cualquiera de los puntos 1 a 16, en donde la insuficiencia arterial se caracteriza por la ausencia de una disfunción endotelial.
- 40 18. El método de cualquiera de los puntos 1 a 17, en donde la preparación contiene entre 0,1 y 1 % en peso de trinitrato de glicerilo.
19. El método de cualquiera de los puntos 1 a 18, en donde el éster no volátil es sólido o semisólido a una temperatura de 20 °C.
- 45 20. El método de cualquiera de los puntos 1 a 19, en donde el estabilizante éster no volátil se selecciona del grupo que consiste en: mono y diglicéridos, glicéridos polietoxilados, ésteres de ácido láctico, succinato de D-alfa tocoferil polietilenglicol 1000 y triglicéridos sólidos y mezclas de cualquiera de estas sustancias.
21. El método de cualquiera de los puntos 1 a 20, en donde la preparación contiene el estabilizante éster no volátil a una concentración de 0,2 a 10 % en peso, con respecto al peso total de la preparación.

22. El método de cualquiera de los puntos 1 a 21, en donde GTN, diluyente y estabilizante forman una solución homogénea.
23. El método de cualquiera de los puntos 1 a 22, en donde la relación en masa del estabilizante éster no volátil al GTN está entre 2 y 40.
- 5 24. El método de cualquiera de los puntos 1 a 23, en donde la relación en masa del diluyente al estabilizante éster no volátil está entre 1 y 9,5.
25. El método de cualquiera de los puntos 1 a 24, en donde el material portador se selecciona del grupo que consiste en: aluminometasilicato de magnesio, fosfato dibásico de calcio, isomalt y mezclas de cualquiera de los anteriores.
- 10 26. El método de cualquiera de los puntos 1 a 25, en donde la preparación incluye además al menos un excipiente adecuado para la administración sublingual, que se selecciona del grupo que consiste en: mono, di y polisacáridos solubles en agua, así como sus alcoholes.
- 15 27. El método de cualquiera de los puntos 1 a 26, en donde el excipiente adecuado para administración sublingual se selecciona del grupo que consiste en: fructosa, glucosa, isomalt, lactosa, maltosa, maltitol, manitol, sorbitol, sacarosa, trehalosa y xilitol y mezclas de cualquiera de los anteriores.
28. El método de cualquiera de los puntos 1 a 27, en donde el excipiente adecuado para la administración sublingual a ser incluido al mínimo es xilitol y/o isomalt en concentraciones entre 20 y 95 % en peso.
- 20 29. El método de cualquiera de los puntos 1 a 28, en donde el excipiente adecuado para la administración sublingual es isomalt, que está contenida a concentraciones entre 70 y 95 % en peso, con respecto al peso total de la preparación.
30. El método de cualquiera de los puntos 1 a 29, en donde la preparación está en forma de un polvo suelto o gránulos sueltos.
31. El método de cualquiera de los puntos 1 a 30, en donde la preparación se envasa como una dosis única en forma de un *stick pack* o un sobre.
- 25 32. El método de cualquiera de los puntos 1 a 31, en donde la preparación adicional comprende al menos 0,01 a 3,0 % en peso de un agente aromatizante.
- 30 33. Un método para tratar o prevenir una insuficiencia arterial, en donde un dador de NO se administra de manera intermitente a un sujeto en una cantidad eficaz para la inducción de la arteriogénesis, y en donde el dador de NO es GTN en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaríngea u oral caracterizada por que contiene un absorbato que comprende entre 0,05 y 2 % en peso de GTN y un estabilizante éster no volátil sobre un material portador.
34. El método del punto 33, con las características definidas en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 17.
35. El método de cualquiera de los puntos 1 a 34, en donde el dador de NO al menos una vez al día y al menos un día a la semana durante al menos dos semanas.
- 35 36. El método de cualquiera de los puntos 1 a 35, en donde el dador de NO se administra durante un período de varias semanas o meses.
37. El método de cualquiera de los puntos 1 a 36, en donde el dador de NO se administra junto con una estimulación exógena de las fuerzas cortantes pulsátiles en la arteria.
- 40 38. El método del punto 37, en donde el dador de NO se administra en el período de tiempo de 30 minutos antes del inicio de la estimulación exógena hasta 30 minutos después de la terminación de la estimulación exógena.
39. El método del punto 38, en donde el NO se administra en el período de tiempo de 15 minutos antes de la estimulación exógena hasta 30 minutos después del inicio de la estimulación exógena.
40. El método de cualquiera de los puntos 37 a 39, en donde dicha estimulación se logra mediante el ejercicio físico o la aplicación de una fuerza endógena al vaso arterial.
- 45 41. El método de cualquiera de los puntos 1 a 40, en donde el método tiene como objetivo la prevención de dicha insuficiencia arterial.
42. El método de cualquiera de los puntos 1 a 41, en donde el dador de NO se administra de forma lingual, sublingual, bucal o transmucosal.
43. Un dador de NO para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una insuficiencia arterial, en

donde el dador de NO se administra de manera intermitente en una cantidad eficaz para la inducción de la arteriogénesis, y en donde el dador de NO es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 33.

44. El dador de NO para uso según el punto 43, con las características definidas en cualquiera de los puntos 2 a 42.

5 45. Un método de eliminación de los efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que es antiarteriogénico o que inhibe la arteriogénesis, que comprende administrar a un sujeto sometido a dicho tratamiento un dador de NO en una cantidad y manera eficaces para la inducción de la arteriogénesis, y en donde el dador de NO es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 33.

10 46. Un dador de NO para uso en un método de eliminación de los efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que es antiarteriogénico o que inhibe la arteriogénesis, en donde el dador de NO se administra a un sujeto sometido a dicho tratamiento en una cantidad y una forma eficaz para la inducción de la arteriogénesis, y en donde el dador de NO es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 33.

47. El dador de NO para uso según el punto 46 o el método según el punto 45, con las características definidas en cualquiera de los puntos 2 a 42.

15 48. Un método para la prevención o el tratamiento de una arritmia cardíaca, en donde se administra un dador de NO a un sujeto en una cantidad y manera eficaces para el tratamiento de dicha arritmia cardíaca, y en donde el dador de NO es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 33.

49. El método del punto 48, con las características definidas en cualquiera de los puntos 18 a 42.

20 50. Un dador de NO para usar en un método para la prevención o el tratamiento de una arritmia cardíaca, en donde el dador de NO se administra a un sujeto en una cantidad y manera eficaces para el tratamiento de dicha arritmia cardíaca, y en donde el dador de NO es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 33.

51. El dador de NO para uso según el punto 50, con las características definidas en cualquiera de los puntos 18 a 42.

25 52. Un método para promover la circulación colateral que comprende la etapa de exponer a un sujeto a una cantidad terapéuticamente eficaz de un dador de NO en donde la cantidad terapéuticamente eficaz del dador de NO promueve la arteriogénesis de modo suficiente para aumentar la circulación colateral en una condición fisiológica o patológica y en donde el dador de NO es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 33.

53. El método del punto 52, en el que el sujeto padece una insuficiencia arterial.

54. El método del punto 53, con las características definidas en cualquiera de los puntos 2 a 42.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dador de NO para uso en un método para la prevención o el tratamiento de una insuficiencia arterial, en donde el dador de NO se administra de forma intermitente en una cantidad eficaz para la inducción de arteriogénesis, y en donde el dador de NO es trinitrato de glicerilo en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaríngea u oral caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de trinitrato de glicerilo (GTN), al menos un diluyente, un material portador y al menos una sustancia que reduce la volatilidad del GTN, por lo que esta sustancia es un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C, en donde el dador de NO se administra al menos una vez al día y al menos un día a la semana durante al menos dos semanas.
- 10 2. El dador de NO para uso según la reivindicación 1, en donde la insuficiencia arterial se caracteriza por una oclusión parcial o completa de un vaso arterial.
3. El dador de NO para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la insuficiencia arterial es debida a la deposición de material en los vasos sanguíneos, o en donde la insuficiencia arterial es debida a una compresión externa o interna de una arteria.
- 15 4. El dador de NO para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la insuficiencia arterial es una enfermedad vascular, o en donde la insuficiencia arterial es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en aterosclerosis, una enfermedad isquémica y una enfermedad arterial crónica adicional, o en donde la insuficiencia arterial es una insuficiencia arterial coronaria, una insuficiencia arterial cerebral, una insuficiencia arterial periférica, una insuficiencia arterial intestinal, una insuficiencia arterial urogenital, una insuficiencia de la arteria nerviosa, esclerodermia o una insuficiencia de la arteria retiniana central.
- 20 5. El dador de NO para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la preparación contiene entre 0,1 y 1 % en peso de trinitrato de glicerilo.
6. El dador de NO para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la relación en masa del estabilizante éster no volátil a GTN está entre 2 y 40.
- 25 7. El dador de NO para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el dador de NO se administra durante un periodo de varias semanas o meses.
8. El dador de NO para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el dador de NO se administra junto con una estimulación exógena de las fuerzas cortantes pulsátiles en la arteria
- 30 9. El dador de NO para uso de la reivindicación 8, en donde el dador de NO se administra en el periodo de tiempo de 30 minutos antes del inicio de la estimulación exógena hasta 30 minutos después de la terminación de la estimulación exógena.
10. El dador de NO para uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde dicha estimulación se logra mediante el ejercicio físico o la aplicación de una fuerza endógena al vaso arterial.
11. El dador de NO para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el método tiene como objetivo la prevención de dicha insuficiencia arterial.
- 35 12. El dador de NO para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el dador de NO se administra de manera lingual, sublingual, bucal o transmucosal.
13. El dador de NO para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el al menos un diluyente se selecciona del grupo que consiste en triglicéridos de cadena media (MCT), propilenglicol y etanol.
- 40 14. Un dador de NO para uso en un método de eliminación de los efectos negativos asociados con cualquier tratamiento de una insuficiencia arterial que es antiarteriogénico o que inhibe la arteriogénesis, en donde el dador de NO se administra a un sujeto sometido a dicho tratamiento en una cantidad y manera eficaces para la inducción de la arteriogénesis, en donde el dador de NO es trinitrato de glicerilo en una preparación farmacéutica sólida para administración bucofaríngea u oral caracterizada por que contiene entre 0,05 y 2 % en peso de trinitrato de glicerilo (GTN), al menos un diluyente, un material portador y al menos una sustancia que reduce la volatilidad del GTN, por lo que esta sustancia es un estabilizante éster no volátil cuyo punto de fusión no es superior a 60 °C, en particular en donde el dador de NO es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 12.
- 45

Figura 1

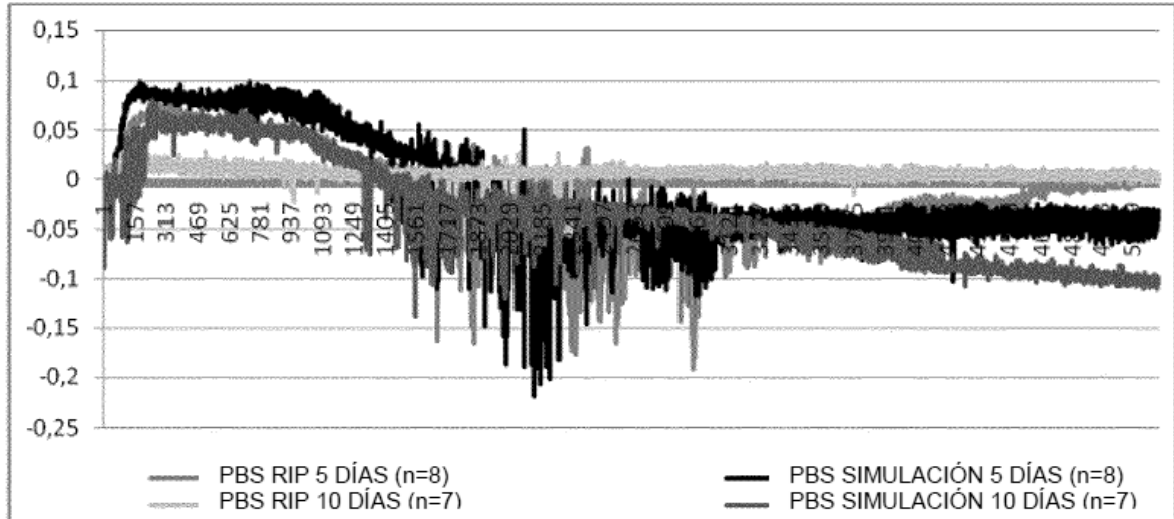




Figura 2

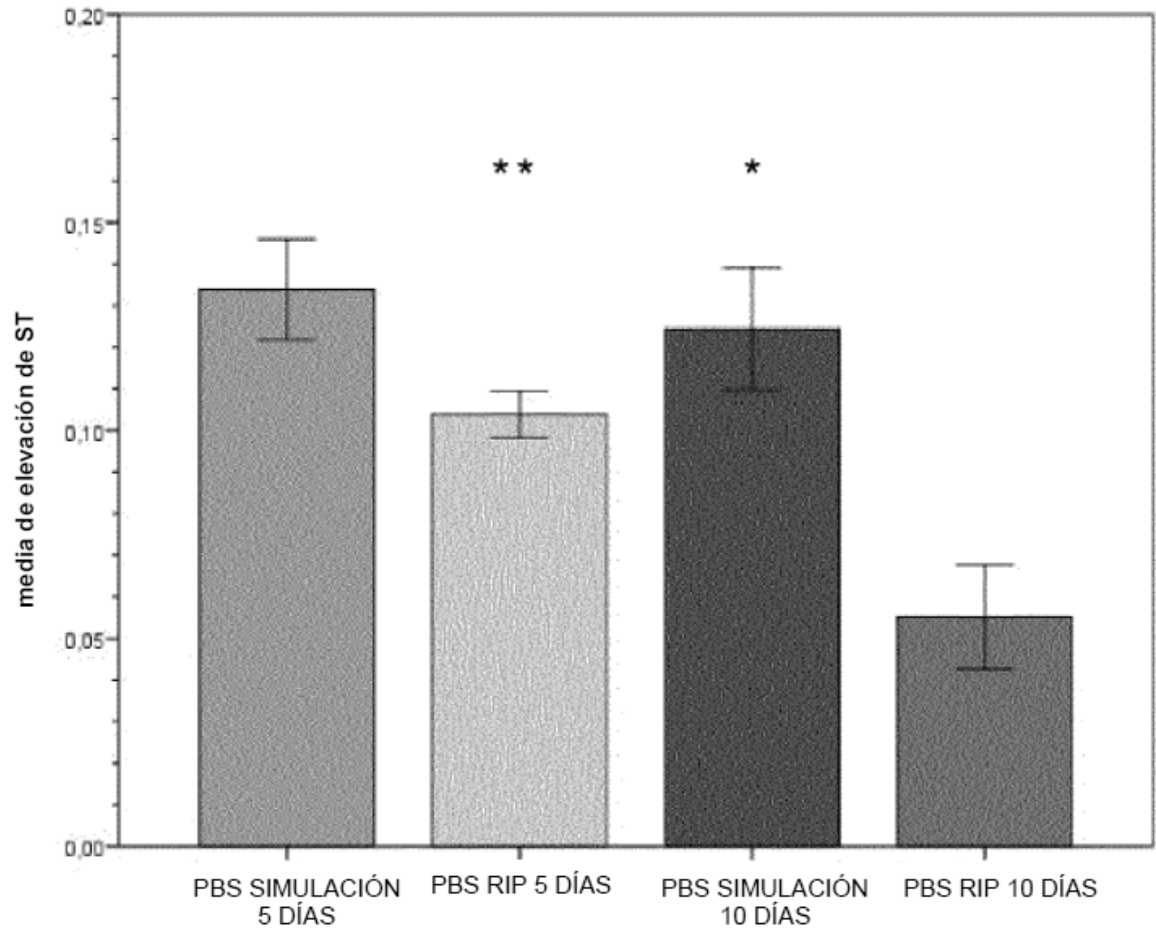


Figura 3

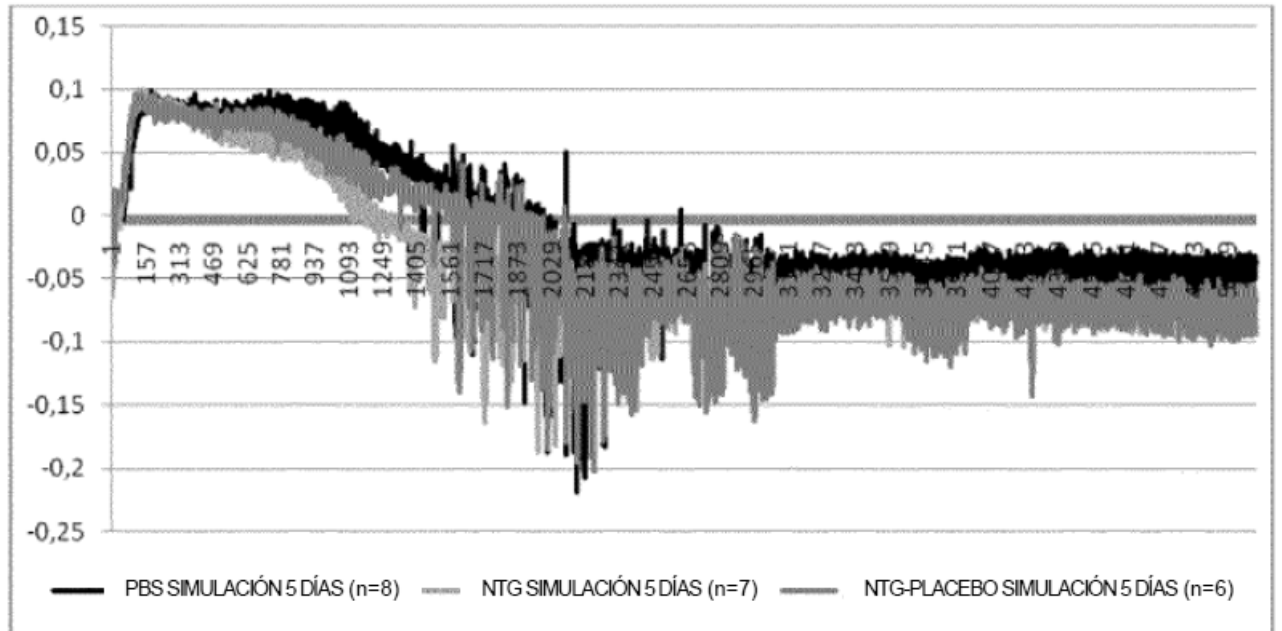


Figura 4

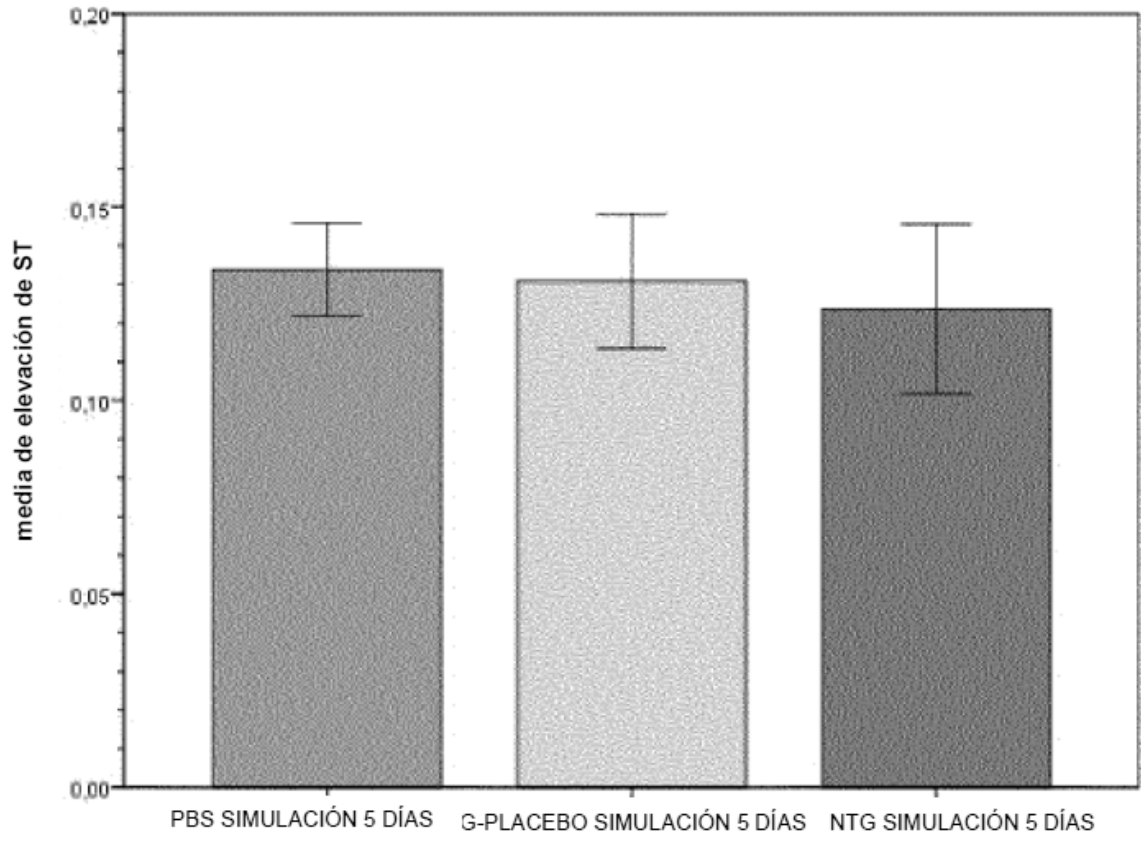


Figura 5

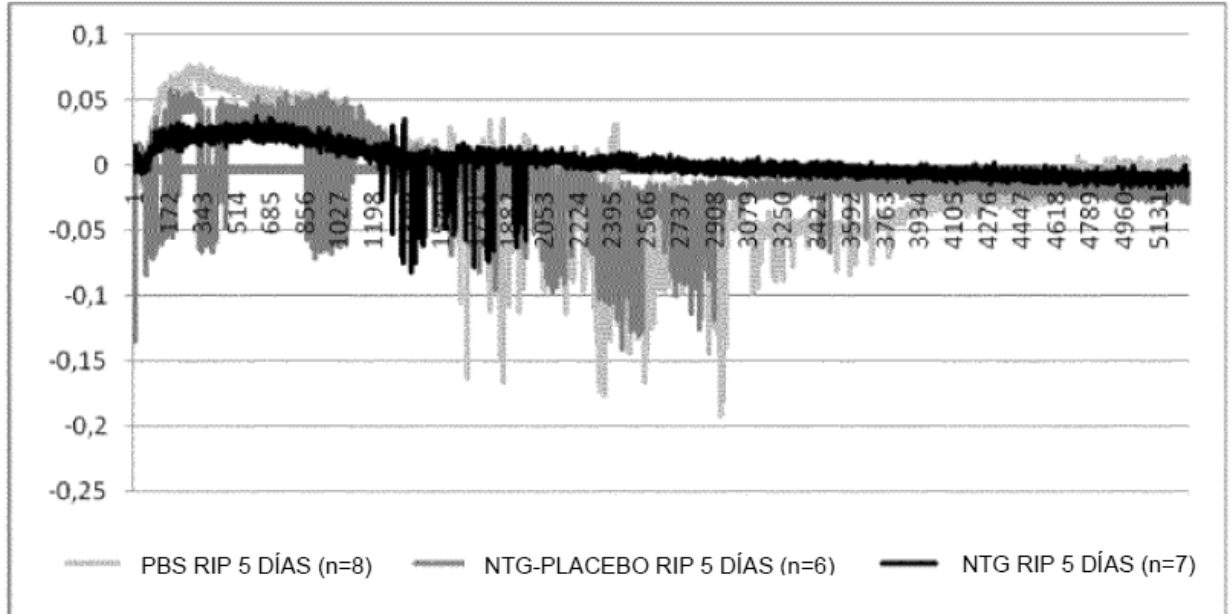


Figura 6

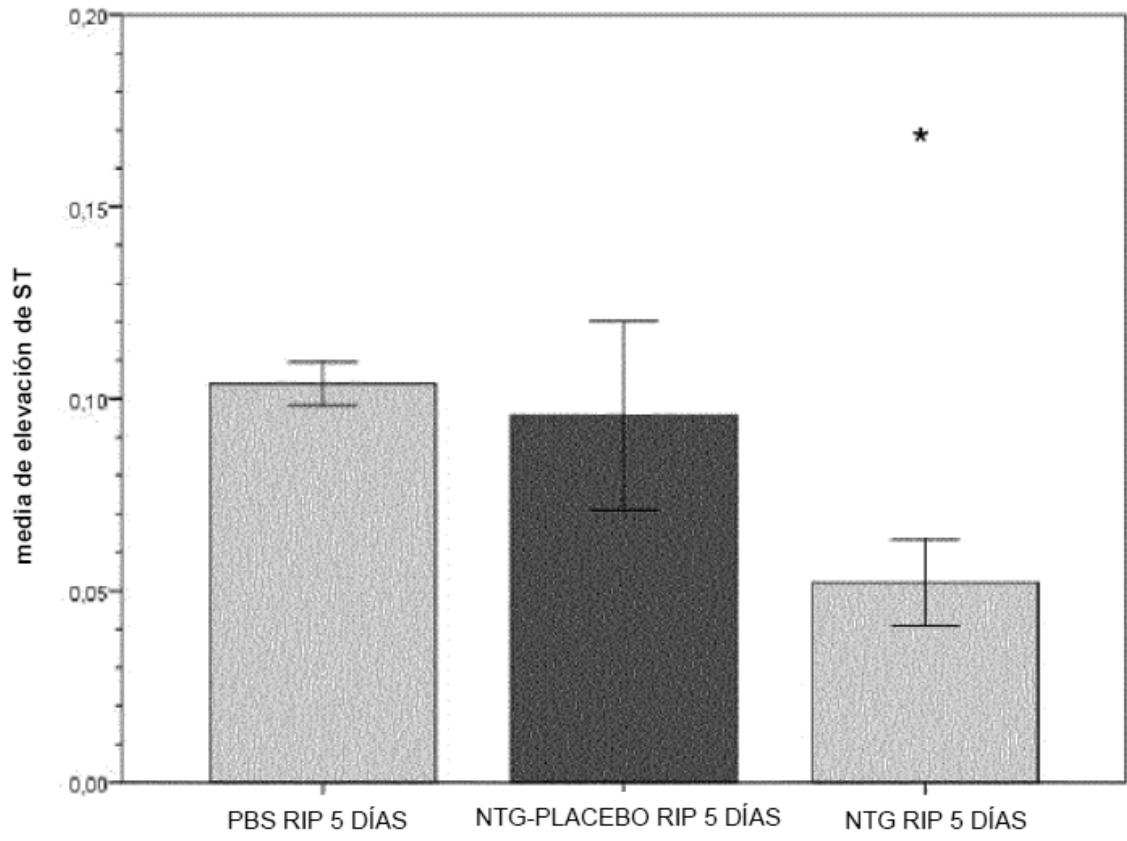


Figura 7

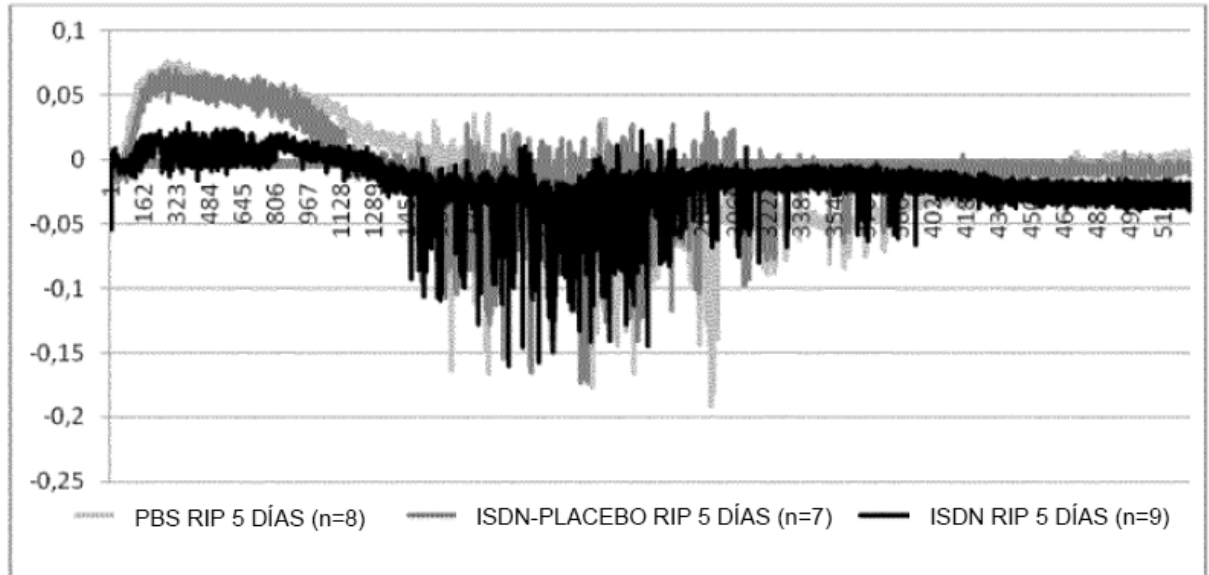


Figura 8

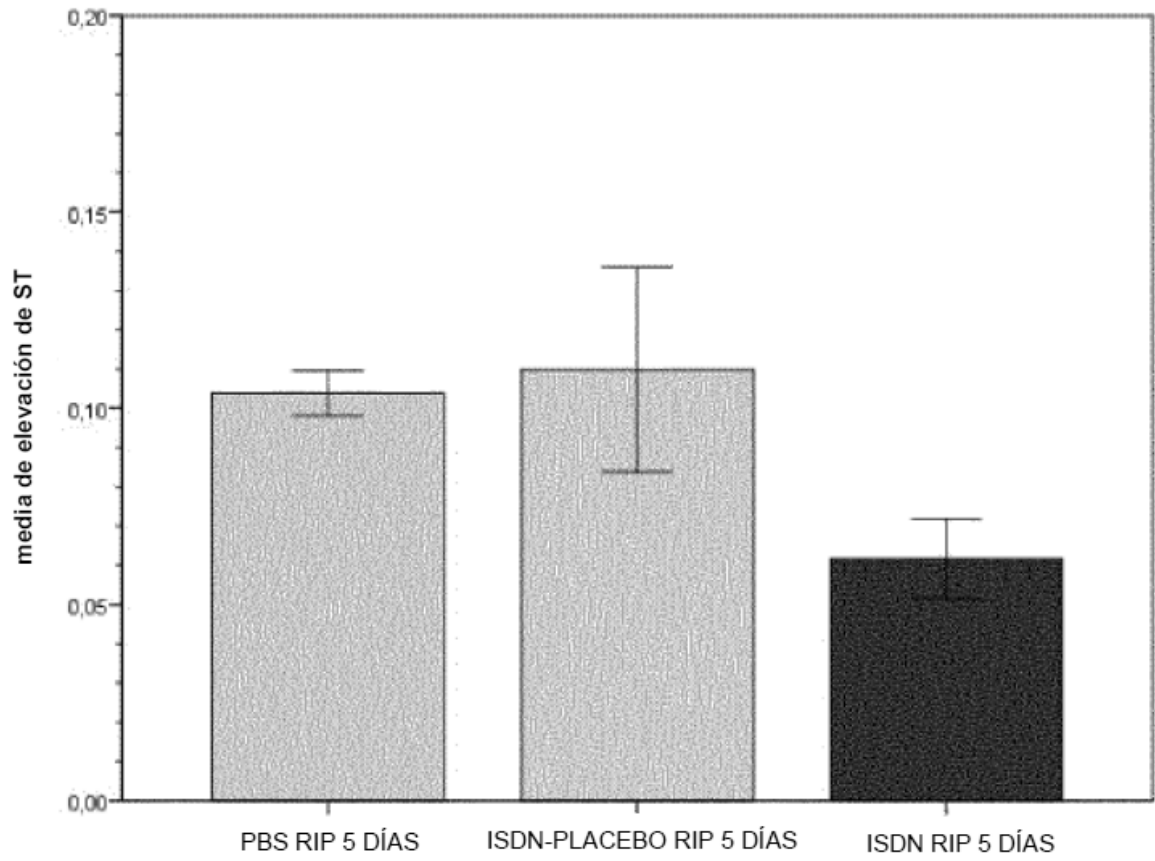


Figura 9

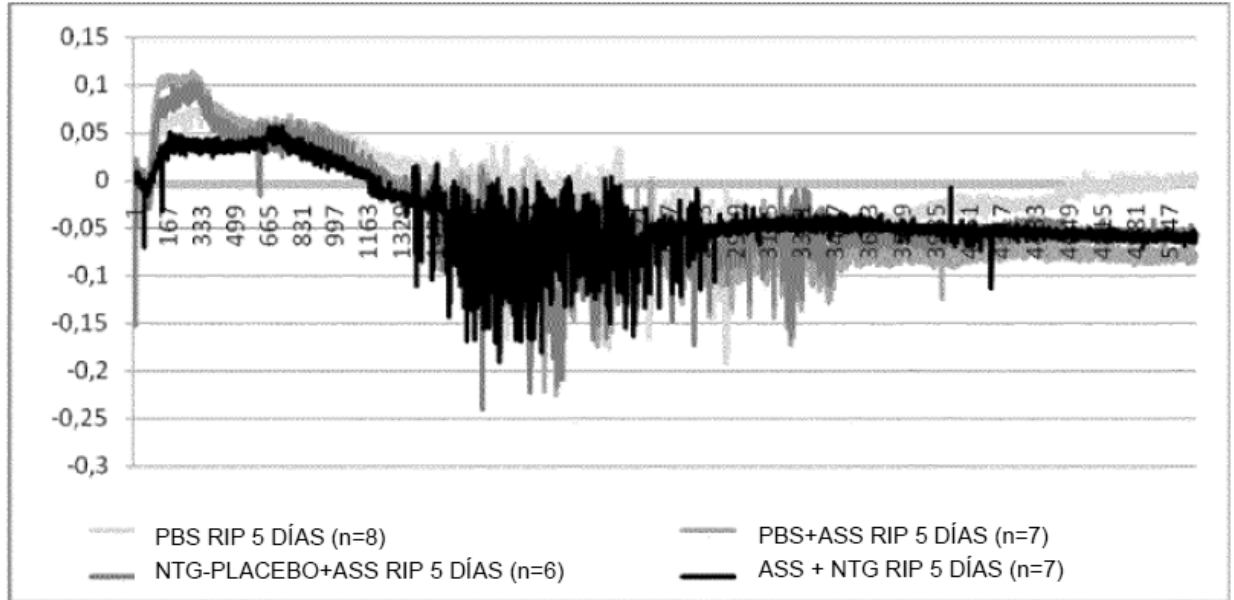




Figura 10

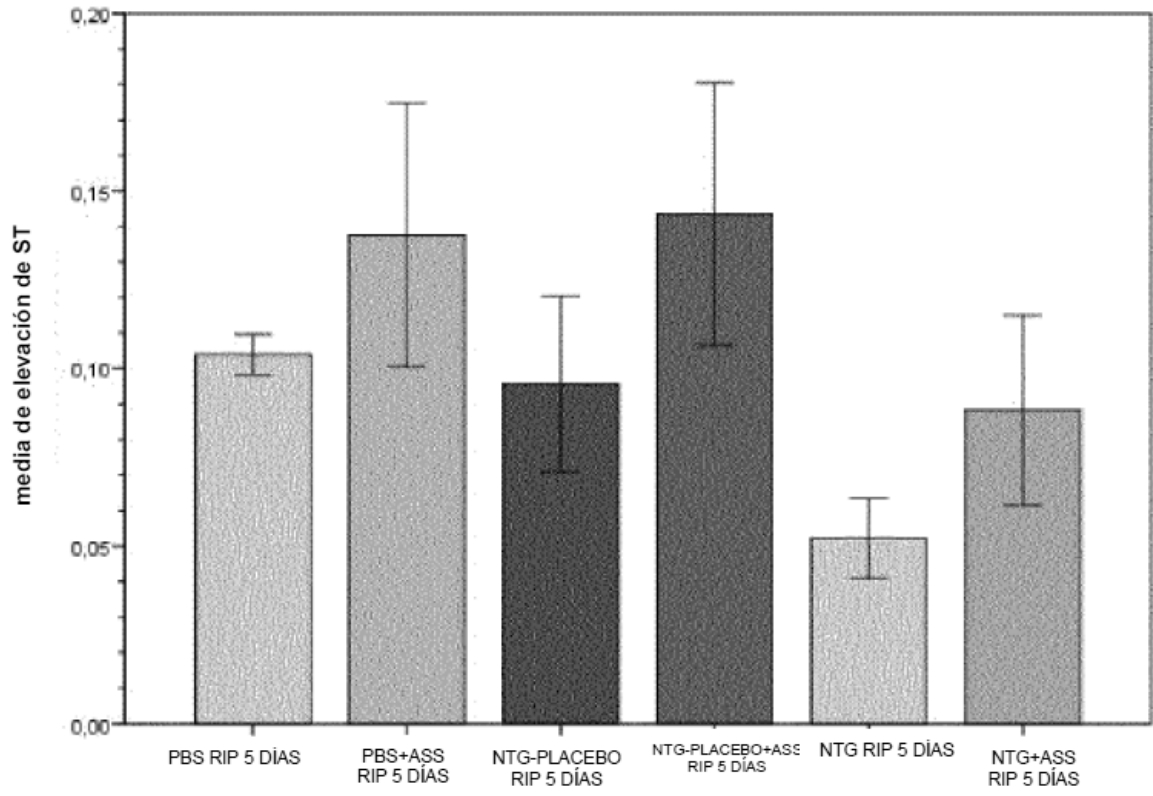


Figura 11

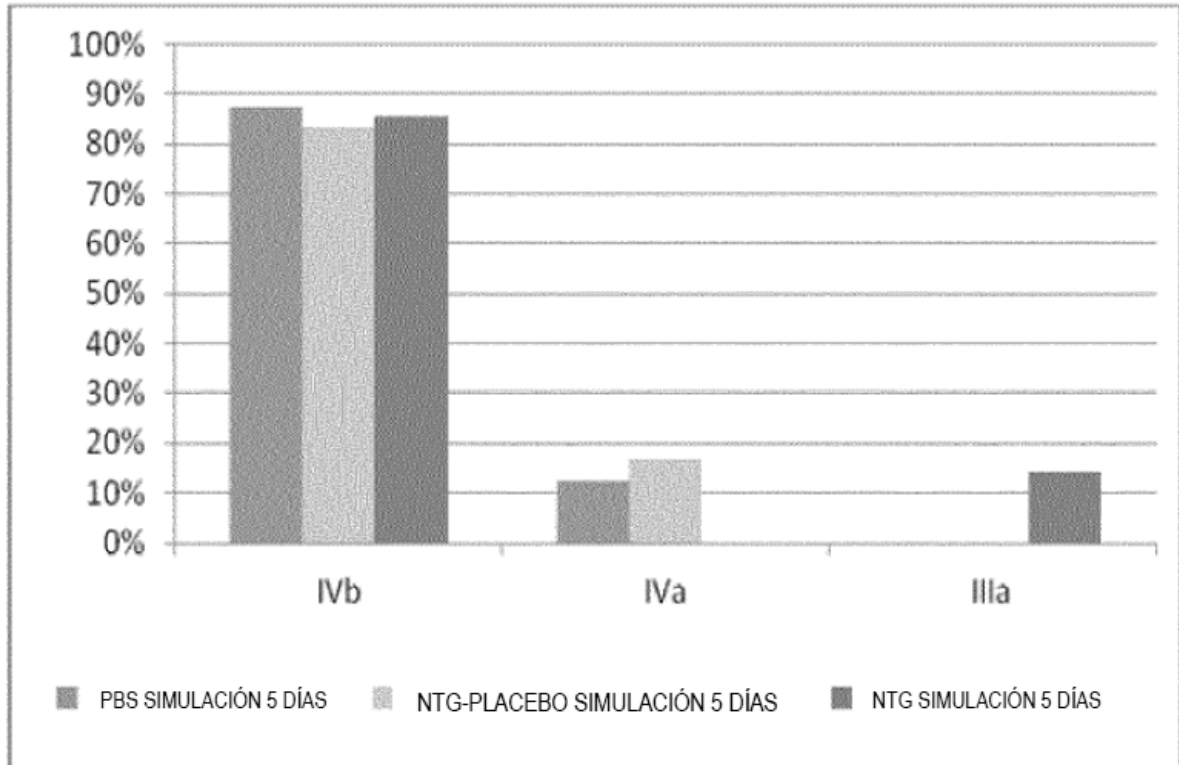


Figura 12

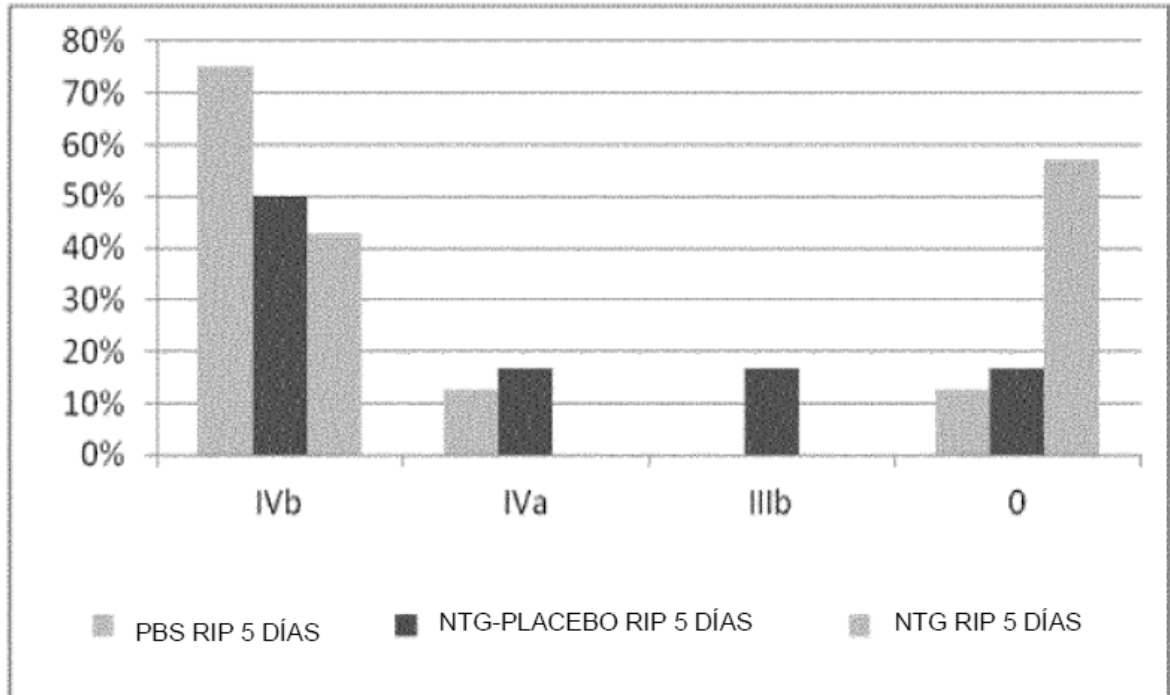


Figura 13

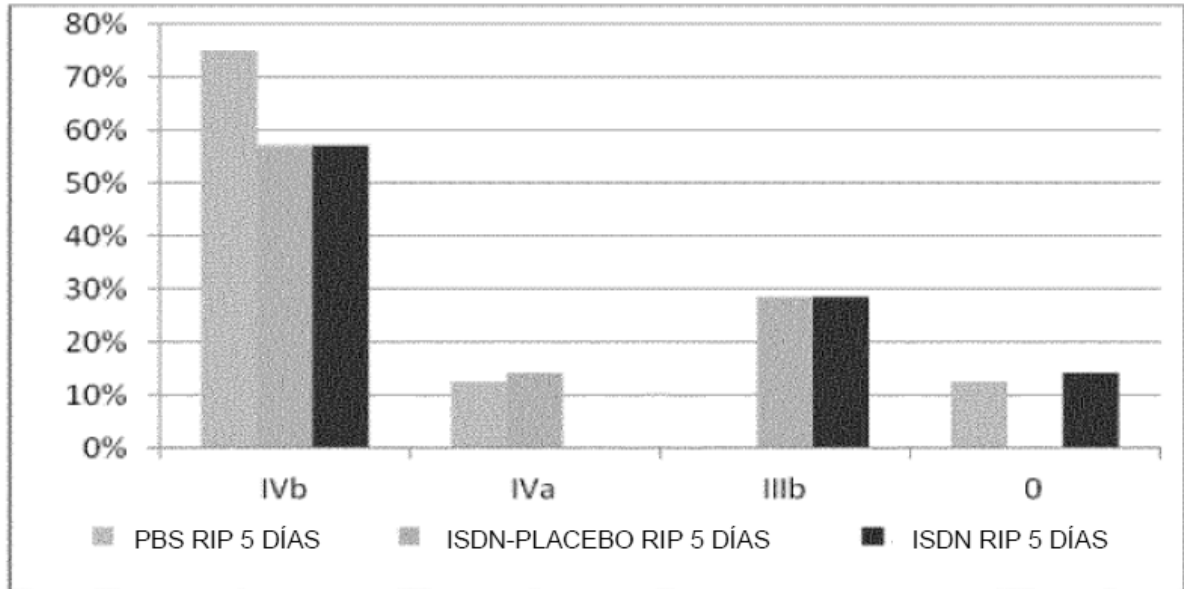


Figura 14

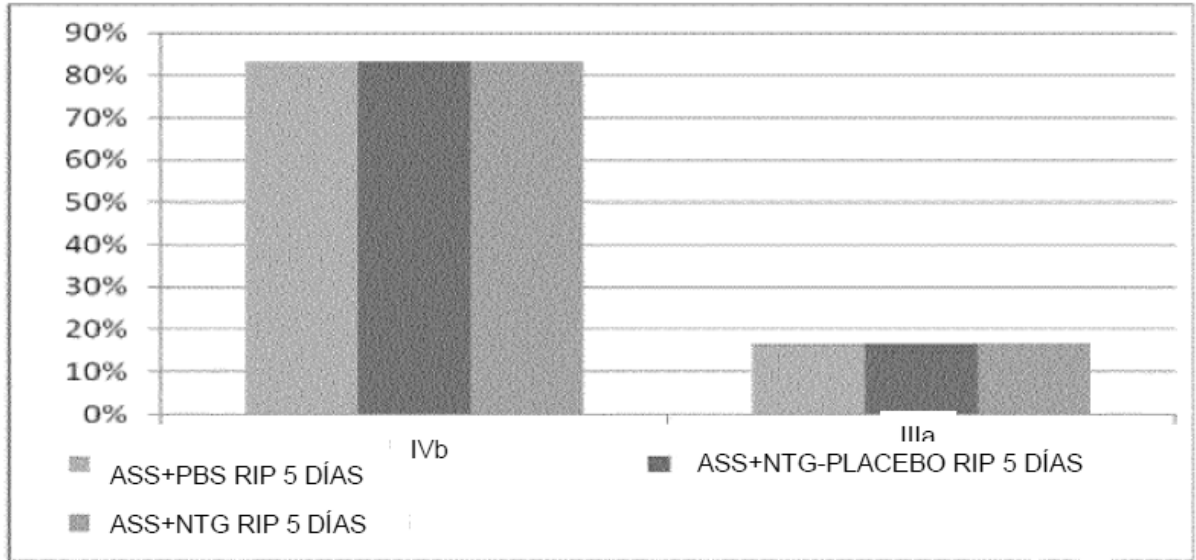


Figura 15

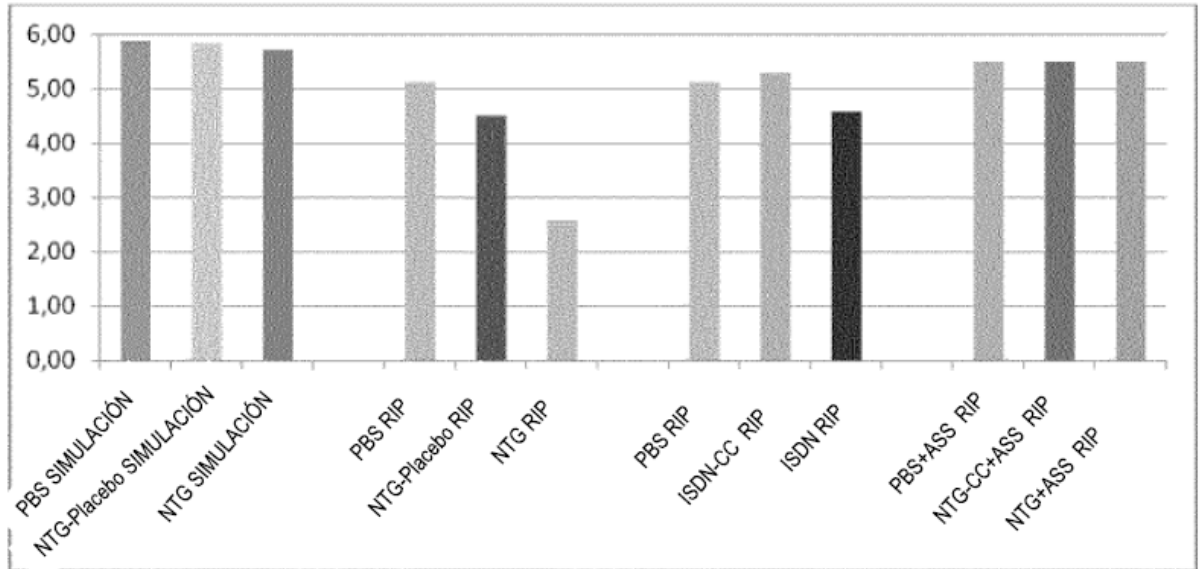


Figura 16

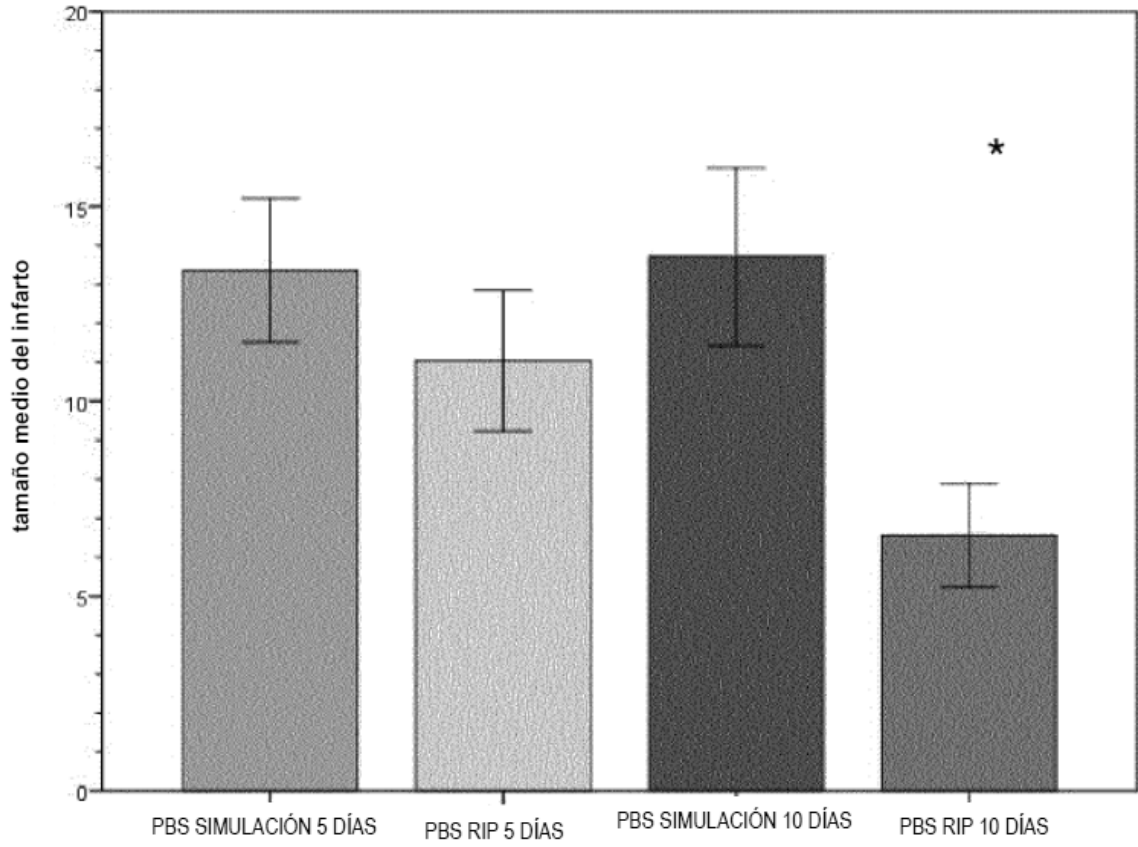


Figura 17

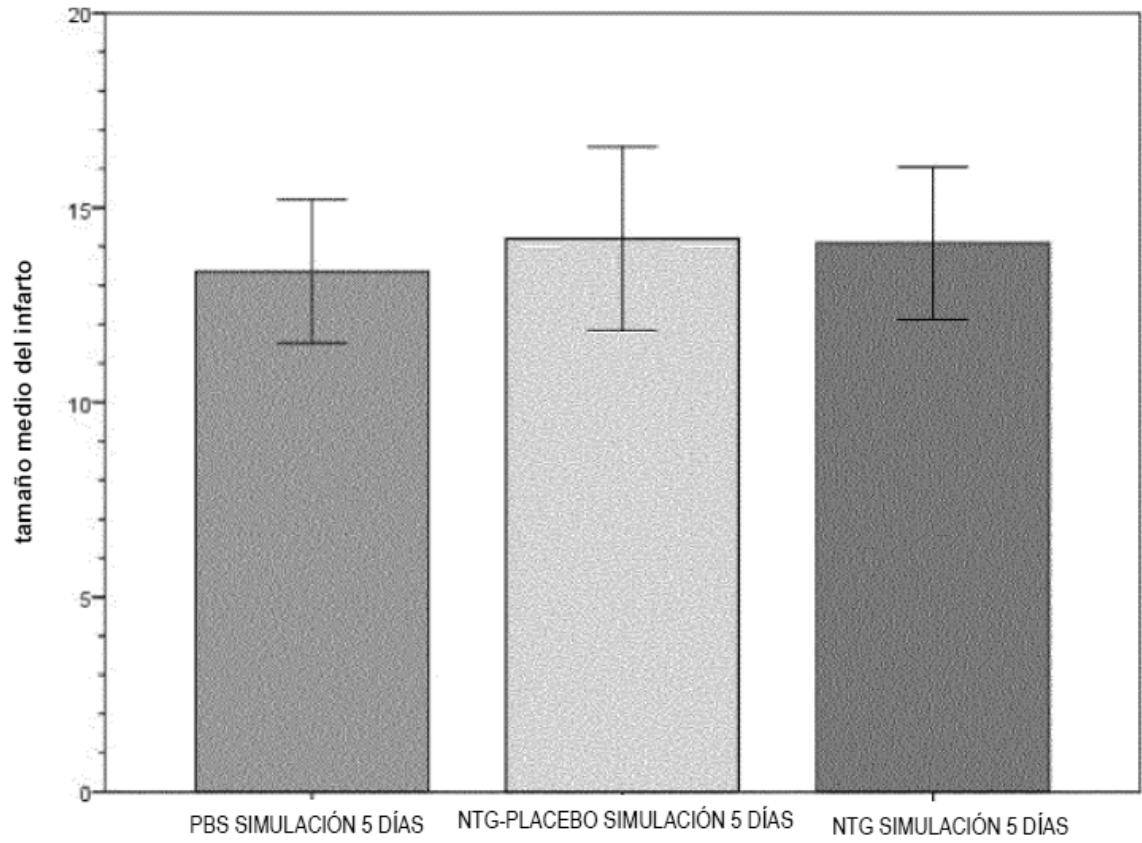




Figura 18

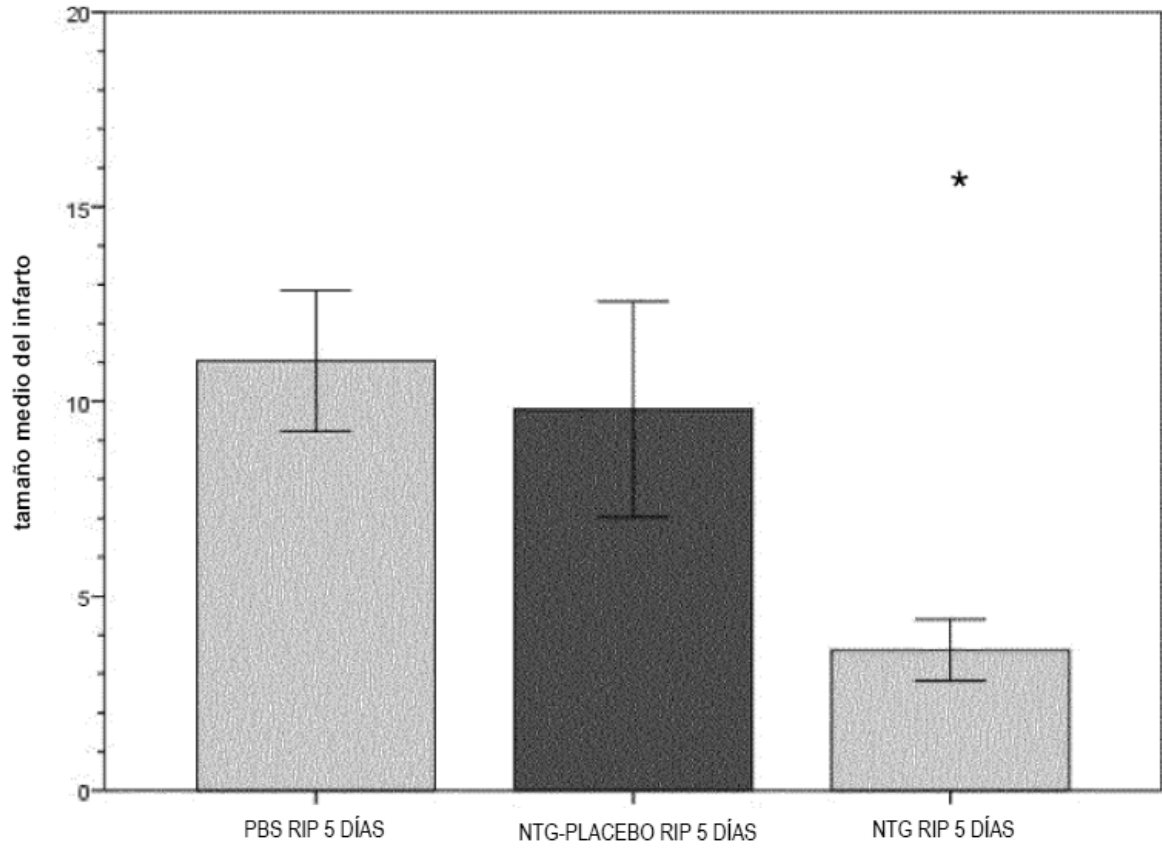


Figura 19

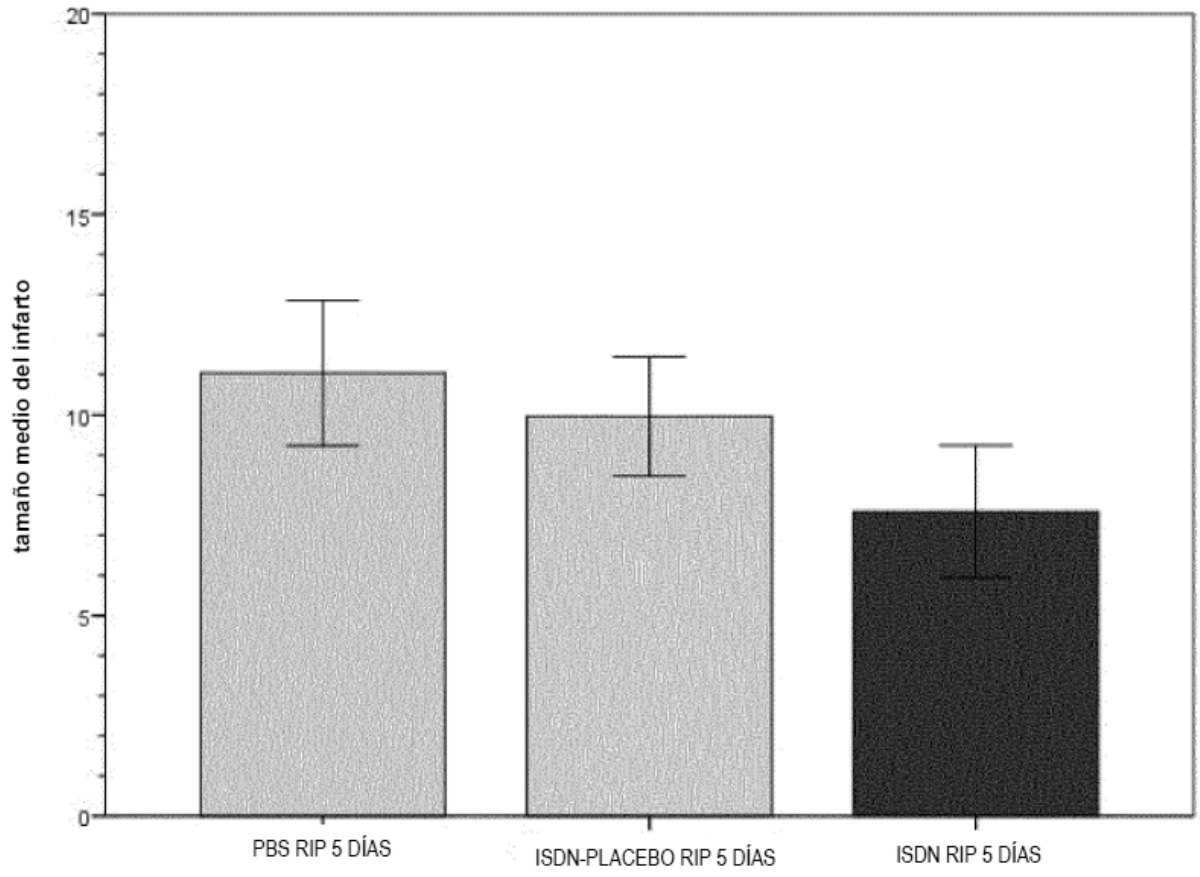
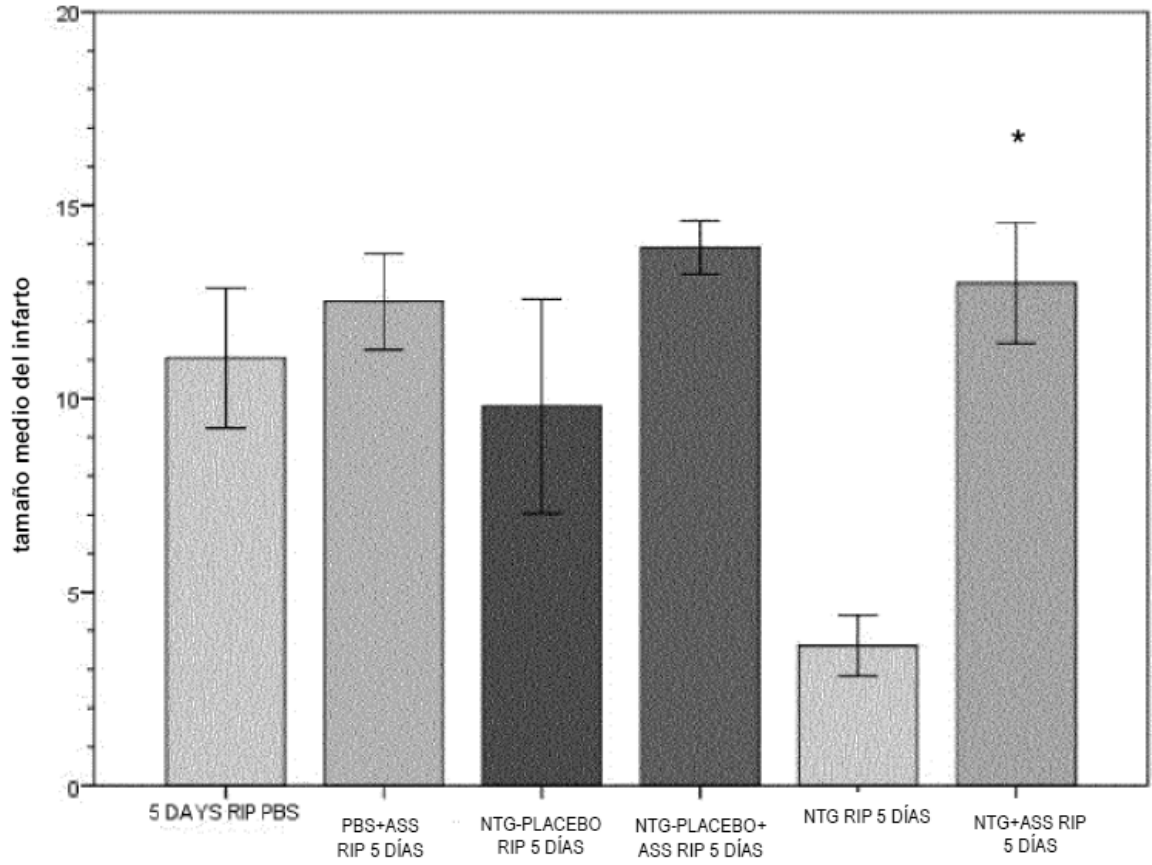
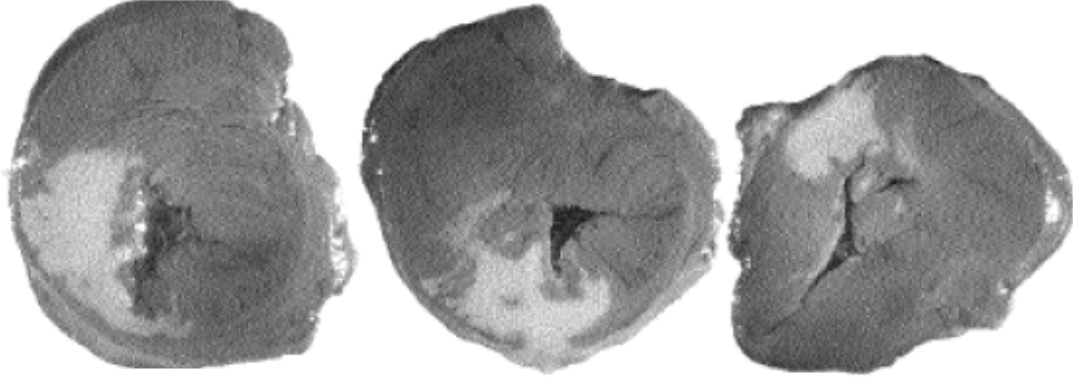


Figura 20

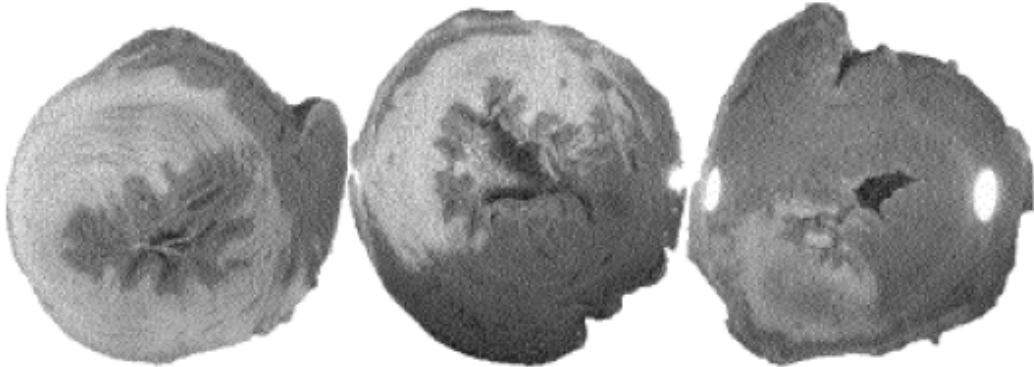


**Figura 21**

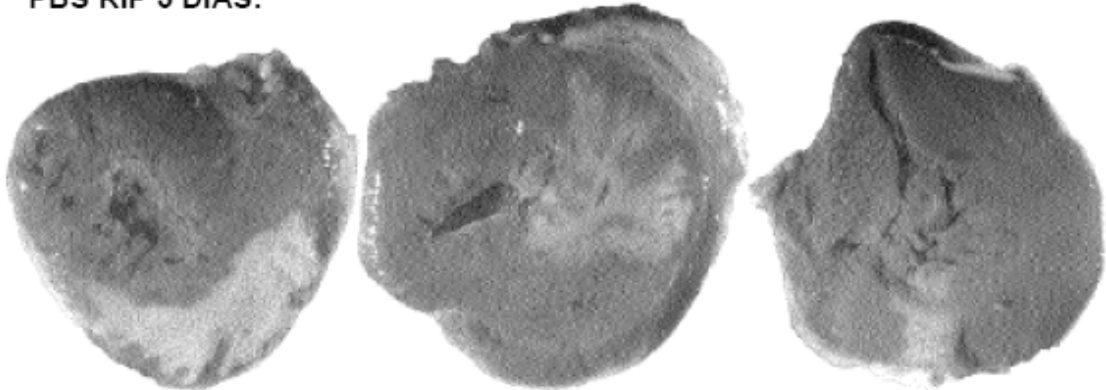
**PBS RIP 10 DÍAS:**



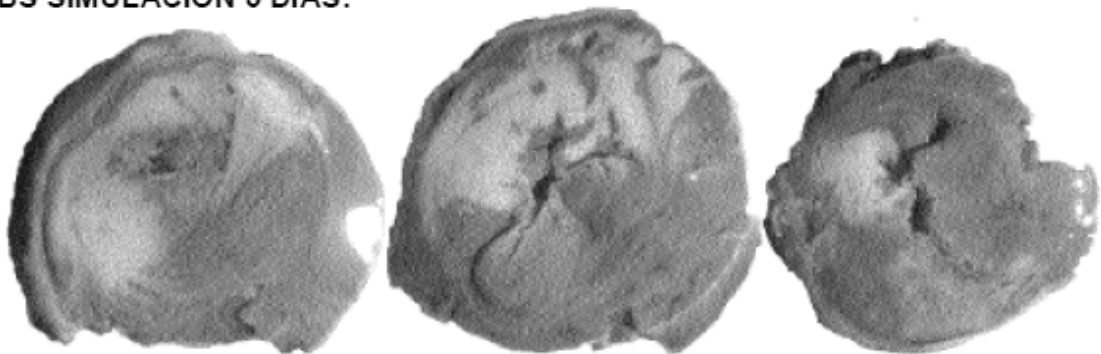
**PBS SIMULACIÓN 10 DÍAS:**



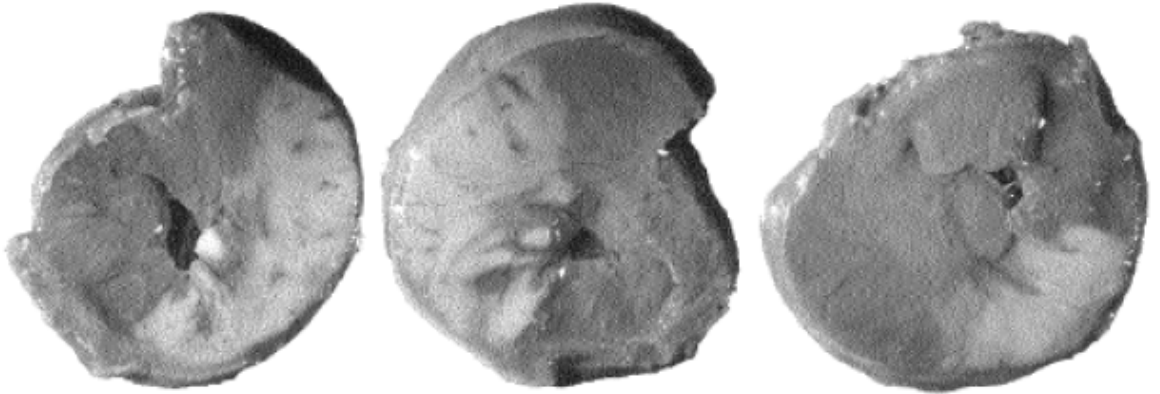
**PBS RIP 5 DÍAS:**



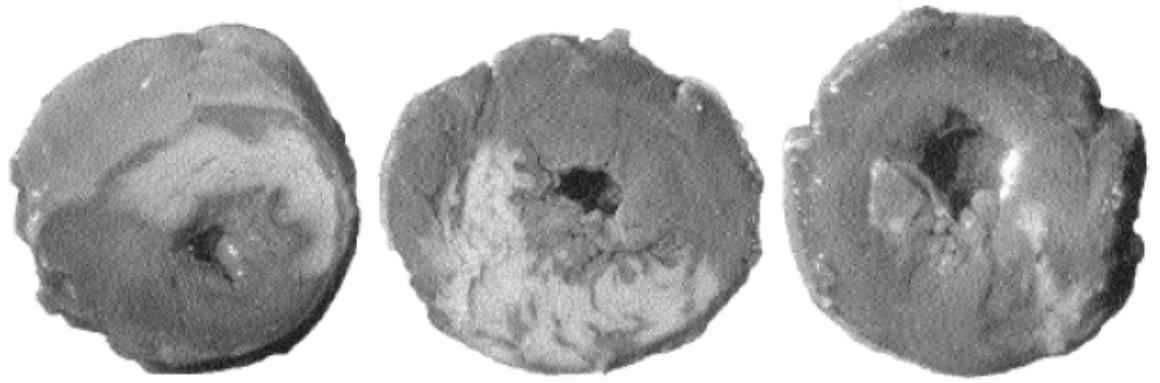
**PBS SIMULACIÓN 5 DÍAS:**



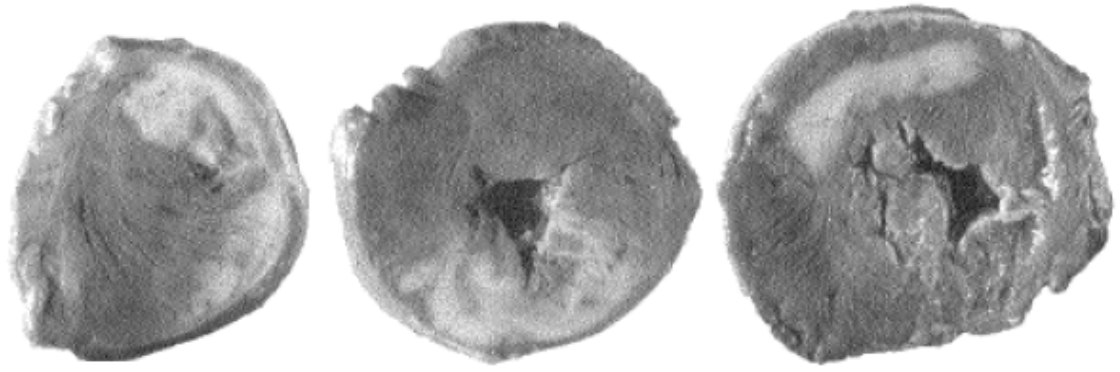
**NTG-PLACEBO SIMULACIÓN 5 DÍAS:**



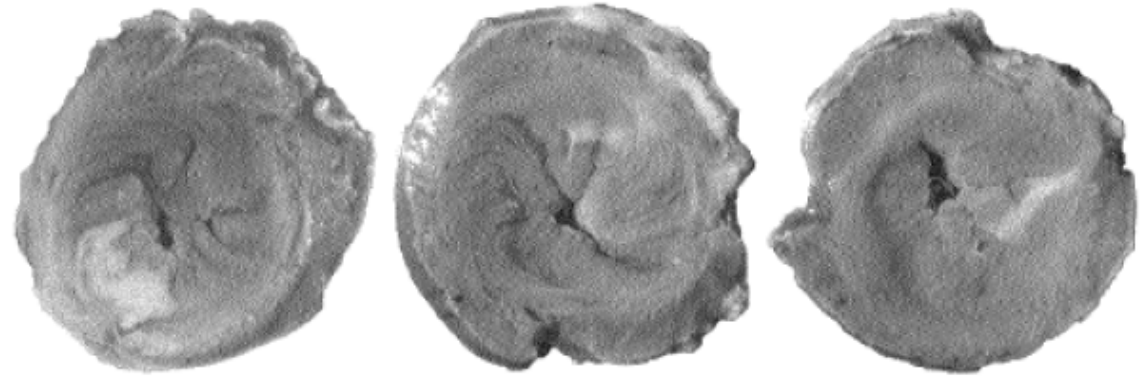
**NTG SIMULACIÓN 5 DÍAS:**



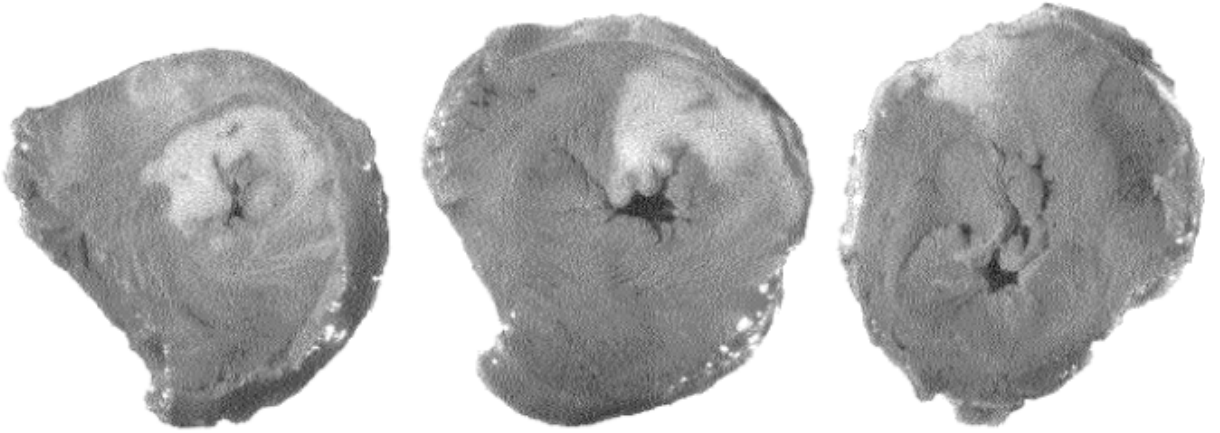
**NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS:**



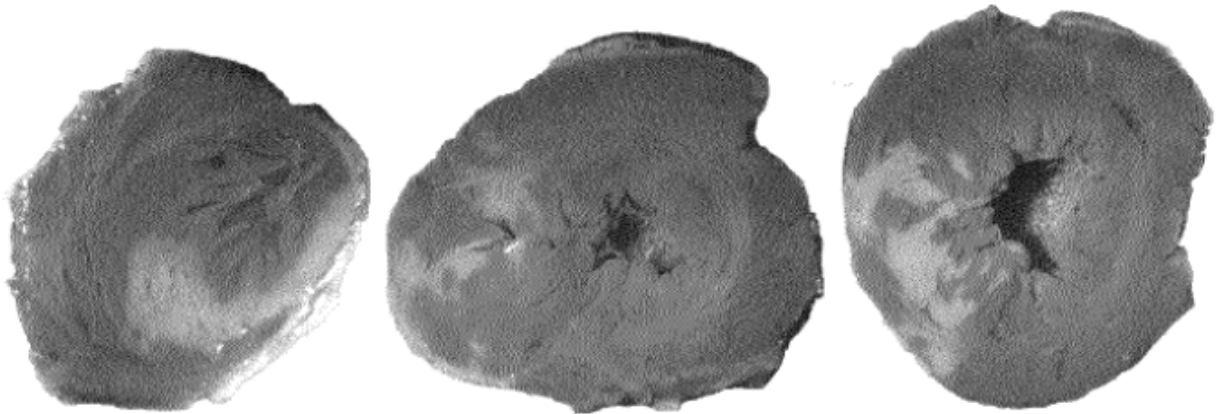
**NTG RIP 5 DÍAS:**



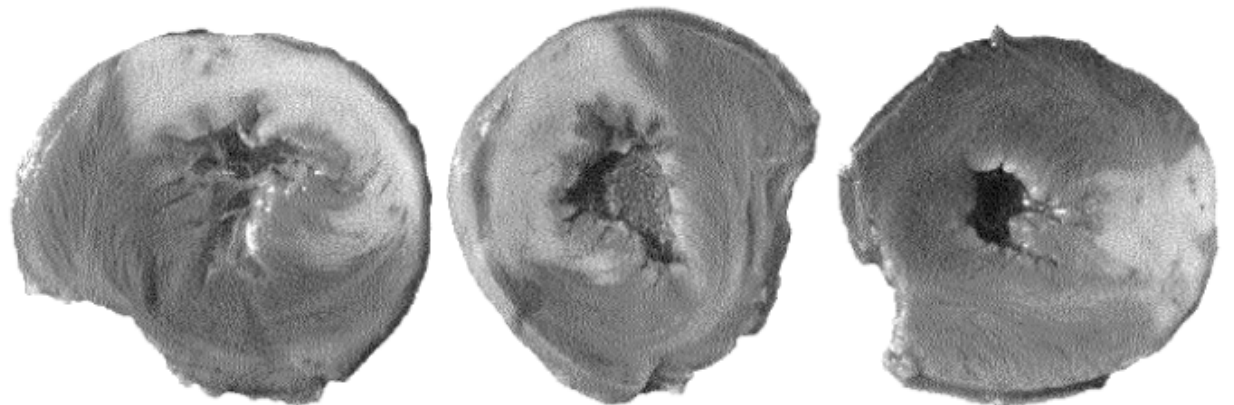
**ISDN-PLACEBO RIP 5 DÍAS:**



**ISDN RIP 5 DÍAS:**



**ASA + PBS RIP 5 DÍAS:**



**ASA + NTG-PLACEBO RIP 5 DÍAS:**



**ASA + NTG RIP 5 DÍAS:**



Figura 22

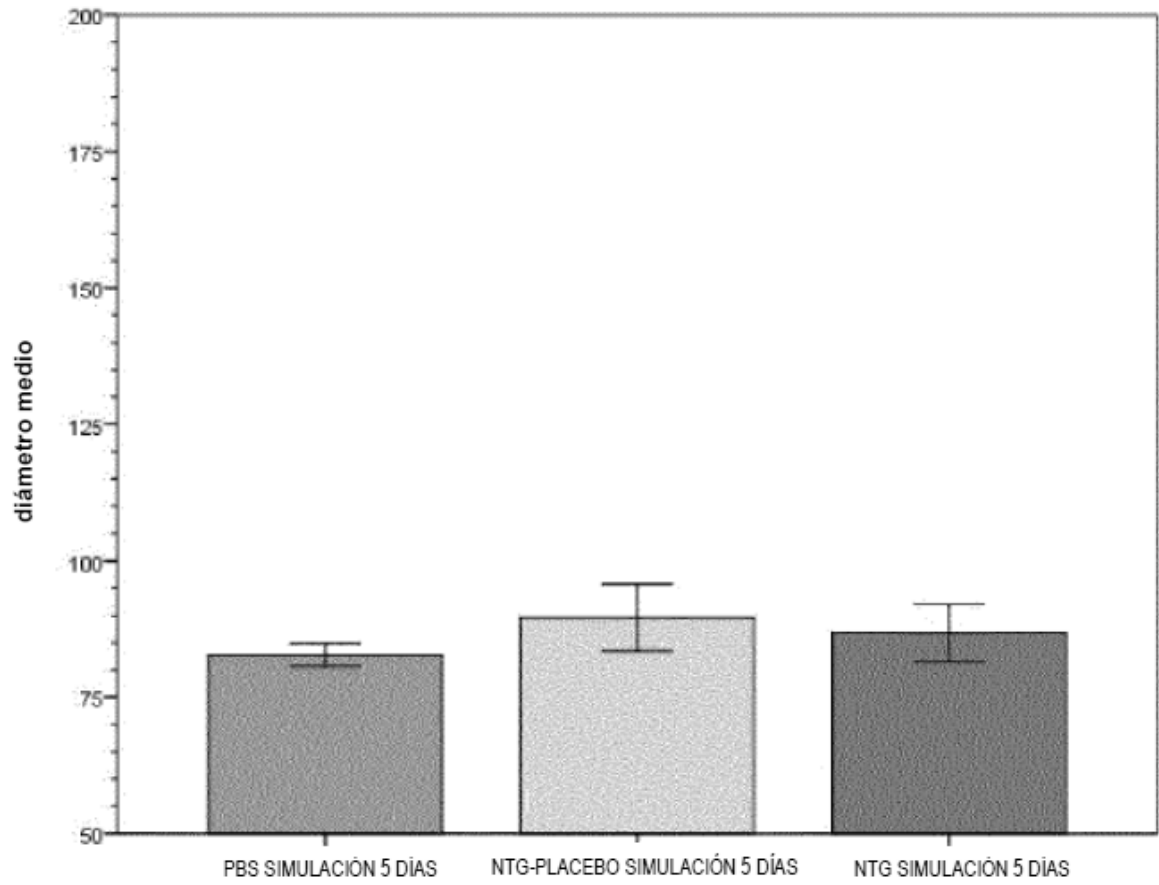




Figura 23

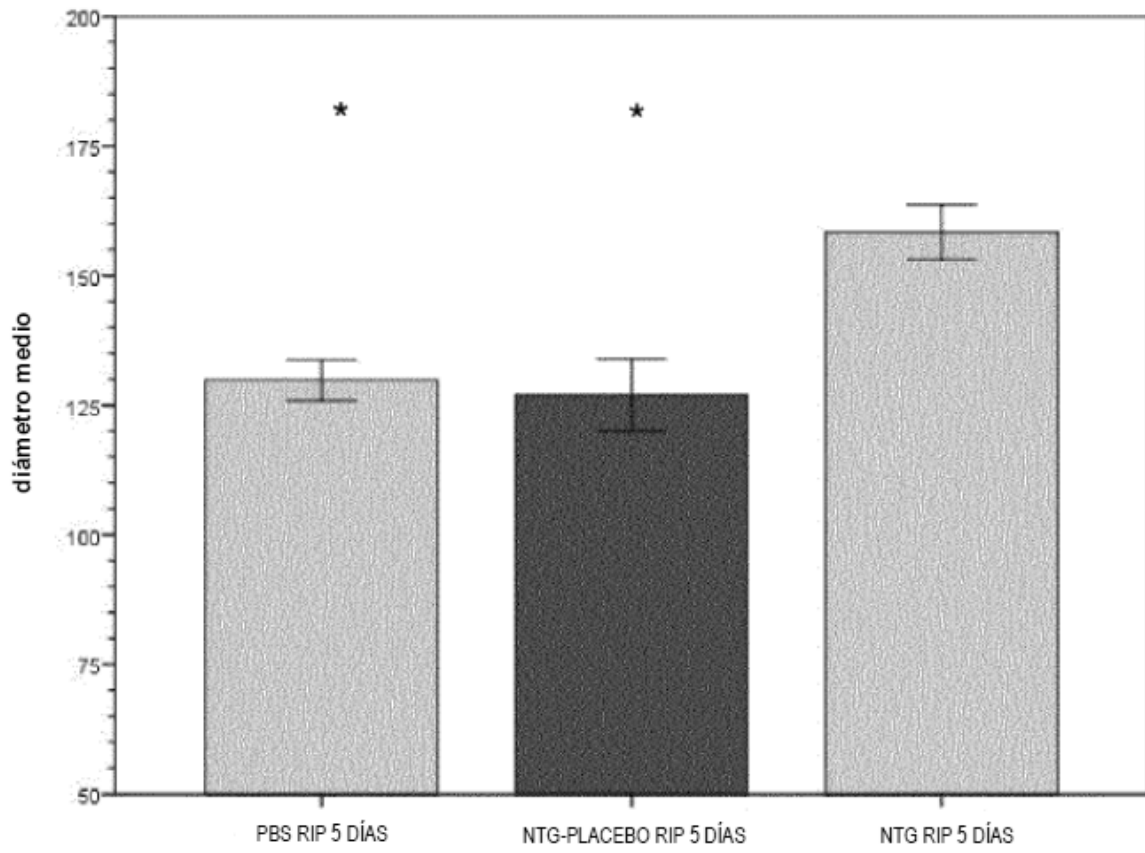


Figura 24

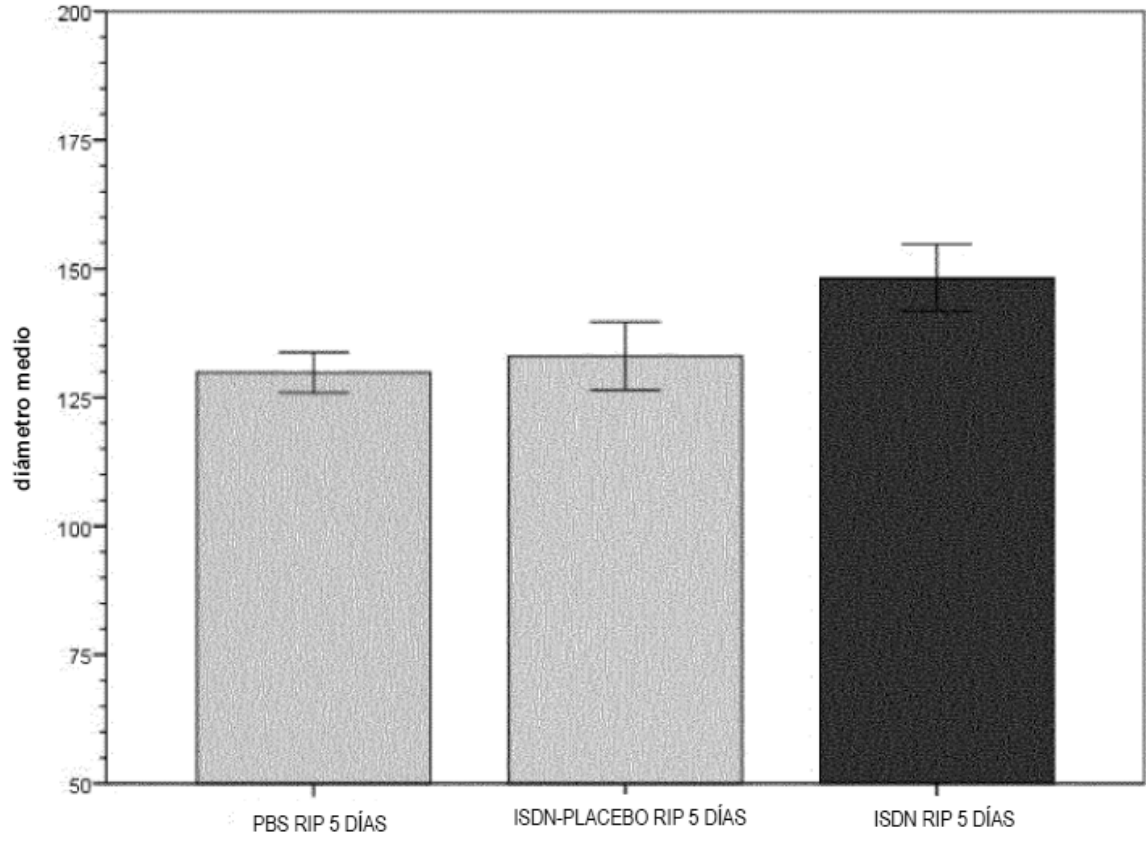


Figura 25

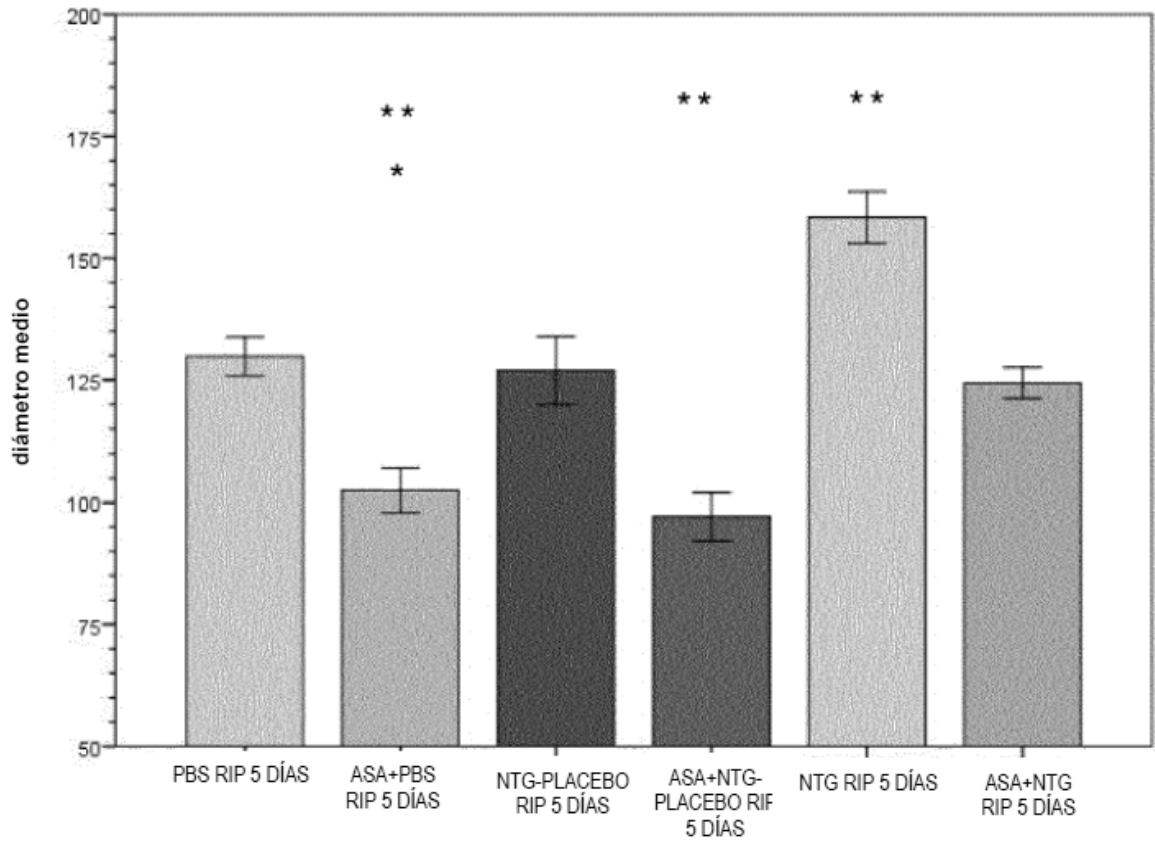


Figura 26

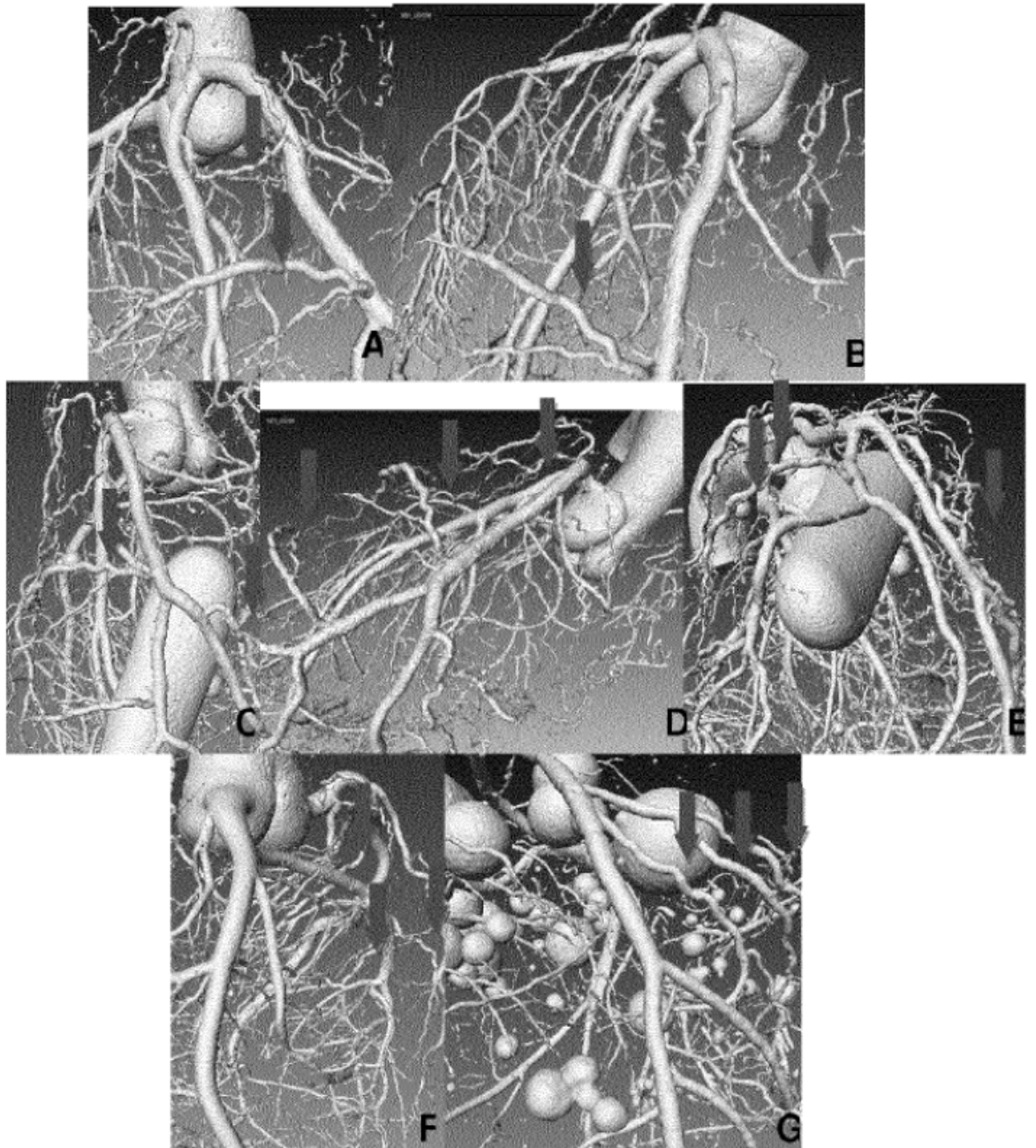


Figura 27

