

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 199**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 45/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/36</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/61</b>	(2007.01)
<b>A61K 31/196</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/407</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2013 PCT/EP2013/065733**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14016380**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2013 E 13747807 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2877156**

54 Título: **Complejos de condroitina para absorción transcutánea**

30 Prioridad:

**27.07.2012 IT MI20121316**

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

**08.06.2020**

73 Titular/es:

**ALTERGON S.A. (100.0%)  
Via Dogana Vecchia 2  
6900 Lugano, CH**

72 Inventor/es:

**DE ROSA, MARIO y  
SCHIRALDI, CHIARA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 765 199 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

Complejos de condroitina para absorción transcutánea

La presente invención se refiere al uso de condroitina como portador transdérmico y sistema de liberación lenta para ingredientes activos en composiciones farmacéuticas y cosmeceúticas.

## 5 Definiciones

El término condroitina a menudo se usa incorrectamente para indicar sulfato de condroitina; en aras de la claridad, por lo tanto, los dos términos "condroitina" y "sulfato de condroitina" se usaran por separado a continuación. El término "condroitina" significa el polisacárido no sulfatado y las sales de los mismos, mientras que el término "sulfato de condroitina" significa el polisacárido sulfatado de manera diferente y las sales de los mismos.

## 10 Técnica anterior

La condroitina, el precursor metabólico del sulfato de condroitina, es un polisacárido lineal natural formado por residuos alternos de N-acetil-D-galactosamina  $\beta$  1:4 y D-glucuronato  $\beta$  1:3. En los vertebrados, la condroitina se sulfata regioselectivamente en los 4 o 6 hidroxilos de N-acetil-D-galactosamina, y en algunos casos en los 2 o 3 hidroxilos de ácido glucurónico (Sugahara et al., J. Biol. Chem., 1996, 271:26745-54). El peso molecular de la condroitina, y la extensión y los sitios de sulfatación, dependen de la especie, la edad y el tipo de tejido (Kuettner et al., Eds., in Articular cartilage and osteoarthritis, NY, Raven Press, 1992; Volpi Ed., in Chondroitin sulfate: structure, role and pharmacological activity, S. Diego, California Academic Press - Elsevier Inc, 2006).

Como la condroitina es un intermediario metabólico en los vertebrados (Sugumaran and Silbert, J. Biol. Chem. 1990, Oct 25, 265(30):18284-8), no se puede aislar de fuentes animales en cantidades significativas. Los procedimientos para la producción de condroitina a partir de microorganismos o por síntesis enzimática solo se describieron recientemente.

La producción de condroitina por una cepa modificada por ingeniería genética de *E. coli* K4, descrita en el documento WO 2010136435, es particularmente interesante; dicha cepa produce el polisacárido K4, un derivado de condroitina que presenta residuos de  $\beta$ -fructofuranosa en la posición C3 del ácido glucurónico. Estos residuos se pueden eliminar fácilmente mediante hidrólisis ácida controlada, debido a la baja estabilidad del enlace glucósido con el que la fructosa está unida a la cadena de condroitina. Usando este microorganismo y una estrategia integrada basada en la optimización de un procedimiento de fermentación trifásico (lote - lote alimentado - en régimen de microfiltración), se obtienen rendimientos de condroitina > 8 g/L. Los altos rendimientos de producción, la simplicidad del procedimiento de purificación aguas abajo, los bajos costes generales del procedimiento y el bajo impacto ambiental hacen que el procedimiento descrito en el documento WO 2010136435 sea superior a todas las estrategias de fermentación descritas anteriormente (Rodriguez et al., Eur. J. Biochem., 1988, 177:117-124; Manzoni et al., Biotechnology Letters, 1996, 18:383-386; WO 01/02597 A1; US 6,288,044; US 6,777,398; US 2005266460; WO 0180810; EP 1282684; EP 1832662; US 20030104601; US 20050164984; US 20070015249; US 20030109693; EP 1950308; WO 2007145197; WO 2007069693; WO 2007058252; WO 2007058252; WO 2007023867; US 7,273,729; JP 2004024208; US 20060052335; US 20060057697; US 7,232,676; y US 20070059805).

Más recientemente, el documento US 2011244520A1 describió una serie de microorganismos modificados por ingeniería genética que producen condroitina en concentraciones comparables con las del documento WO 2010136435.

En cuanto a la síntesis enzimática de condroitina, los documentos US 2005266460, WO 0180810, EP 1282684, EP 1832662, US 20030104601 y US 20050164984 describen el uso de condroitina sintetasa de *Pasteurella multocida*, una enzima que cataliza la síntesis de condroitina a partir de los azúcares UDP correspondientes. Los documentos US 20070015249 y US 20030109693 describen la producción de una condroitina sintetasa a partir de *E. coli* K4 y su uso para la producción de condroitina *in vitro*.

Los documentos EP 1950308, WO 2007145197, WO 2007069693, WO 2007058252, WO 2007058252 y WO 2007023867 describen métodos *in vitro* de síntesis de condroitina y derivados que usan condroitina sintetasa de *E. coli* K4 y mutantes de los mismos, que solo presentan una de las dos actividades de la transferasa.

Los documentos US 7,273,729, JP 2004024208, US 20060052335, US 20060057697 y US 7,232,676 describen el uso de condroitina sintetasa humana, una enzima que cataliza la síntesis de condroitina a partir de los azúcares UDP correspondientes. Los documentos describen la estructura de la condroitina sintetasa humana, un vector de expresión que comprende la secuencia enzimática, la expresión de dicho vector en células eucariotas y un método de síntesis de la cadena de polisacáridos de la condroitina.

El documento US 20070059805 describe la estructura de la condroitina sintetasa humana, un vector de expresión que comprende la secuencia enzimática, la expresión de dicho vector en células eucariotas y un método de síntesis de la cadena de polisacáridos de la condroitina.

Todos los documentos citados anteriormente consideran que la condroitina es un intermedio para la síntesis de sulfato de condroitina. Algunos de ellos mencionan la posibilidad de usar condroitina en composiciones no especificadas, pero solo genéricamente, como en el caso de los documentos US 20110244520 (reivindicación 63) y WO 0180810 (reivindicación 73); este último documento define la condroitina, en las páginas 4-5, como un polímero que es "más inerte, en términos generales, que la molécula de HA análoga".

El ácido hialurónico es el único glicosaminoglicano para el que se ha propuesto el uso como portador de ingredientes activos. Existe una gran cantidad de literatura científica y de patentes sobre el tema que documenta, aunque no siempre de manera consistente, la capacidad del ácido hialurónico para impregnar la piel y las paredes de las membranas mucosas, con algunos factores críticos con respecto al peso molecular.

El transporte transcutáneo de diclofenaco por ácido hialurónico ha sido ampliamente estudiado *in vivo* y en ensayos clínicos (Brown et al. 2002, in Hyaluronan: Biomedical, Medical and Clinical Aspects, eds. J. Kennedy, G.O. Phillips, P. A. Williams, and V. Hascall, 249-256. Cambridge: Woodhead Publishers; Brown et al. 1995, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 48-52. London: Royal Society of Medicine Press; Brown et al. 1995, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 53-71, London: Royal Society of Medicine Press; Brown et al., 1995, Int. J. Tissue Reactions- Exp. Clin. Aspects 17:133-140; Brown and Moore, 1996, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D. A. Willoughby, 121-131. London: Royal Society of Medicine Press; McEwan, and Smith, 1997, Aust. J. Derm. 38:187-189; Nazir et al., 2001, Pharm. Sci. 3(suppl.):1429).

Estos estudios, en su conjunto, han demostrado que *in vitro*, el ácido hialurónico mejora significativamente la absorción de diclofenaco en la piel humana, aunque permanece localizado en la epidermis (McEwan and Smith, 1997, Aust. J. Derm. 38:187-189; Wolf et al., 2001, Int. J. Dermatol. 40:709-713; Brown et al., 1995, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 53-71, London: Royal Society of Medicine Press; Brown, et al., 1995, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 48-52. London: Royal Society of Medicine Press; Lin and Maibach, 1996, In Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D. Willoughby, 167-174. London: R.S. M. Press.; Brown, et al.; 1999, J. Invest. Dermatol. 113:740-746).

Se informa un comportamiento similar del ácido hialurónico, con la localización del medicamento en la epidermis, para otros ingredientes activos tales como ibuprofeno (Brown et al., in Hyaluronan: Biomedical, Medical and Clinical Aspects, eds. J. Kennedy, G.O. Phillips, P.A. Williams, and V. Hascall, 249-256. Cambridge: Woodhead Publishers; Brown and Martin, 2001, Int. J. Pharm. 225:113-121), clindamycin phosphate (Amr, 2000, Proc. Millen. Cong. Pharma. Sci. A80) and cyclosporin (Brown and Moore, 1996, in Hyaluronan in Drug Delivery, ed. D.A. Willoughby, 121-131. London: Royal Society of Medicine Press; Nazir et al., 2001, Pharm. Sci. 3(suppl.):1429).

Sobre la base de estos fundamentos, los documentos US 5639738 y US5792753 reivindican la combinación de ácido hialurónico con un peso molecular de entre 150 y 750 KDa y NSAID para el tratamiento de la queratosis actínica, y el documento US 5852002 reivindica la combinación de ácido hialurónico con un peso molecular de entre 150 y 750 KDa con antibióticos, antibacterianos, antimicrobianos y combinaciones de los mismos para el tratamiento de infecciones.

Los estudios comparativos basados en el uso de la celda de Franz equipada con piel humana demuestran que solo el ácido hialurónico puede transportar diclofenaco e ibuprofeno en la piel, mientras que otros glucosaminoglicanos, como el sulfato de condroitina y la heparina, no lo son (Brown et al., 2001, International J. of Pharmaceutics, 225, 113-121).

El gel Solaraze®, basado en ácido hialurónico y diclofenaco, ha obtenido la aprobación reglamentaria en los Estados Unidos, Canadá y Europa para el tratamiento de la queratosis actínica.

Descripción de la invención.

Se ha encontrado sorprendentemente que, a diferencia de los hallazgos informados para el sulfato de condroitina, la condroitina con un peso molecular de entre 5 y 100 KDa, cuando se aplica a la piel en formulaciones apropiadas, cruza el estrato córneo, impregna la epidermis y se transporta al cuerpo por el torrente sanguíneo.

Un objeto de la invención son los complejos no covalentes de condroitina no sulfatada que tienen un peso molecular entre 5 y 100 kDa determinado por cromatografía de exclusión por tamaño con ingredientes activos seleccionados de diclofenaco o ketorolaco que se absorben a través de la piel y las membranas mucosas. Dichos complejos actúan como sistemas de liberación lenta para el ingrediente activo.

En general, los complejos no covalentes de condroitina con los ingredientes activos se preparan añadiendo el ingrediente activo a soluciones acuosas o acuosas-orgánicas de condroitina. Para obtener el complejo en forma sólida, el disolvente se elimina por evaporación al vacío o por liofilización. Las proporciones molares entre el ingrediente activo y la unidad de monómero de condroitina pueden variar dentro de límites muy amplios: por ejemplo, desde 0.05 a 1 mol de ingrediente activo por unidad de monómero, dependiendo de las dosis recomendadas de los ingredientes activos en cuestión.

5 Por lo tanto, los complejos obtenidos de este modo se formulan usando técnicas y excipientes convencionales, en composiciones apropiadas, en particular para la administración tópica, nasal, rectal o vaginal. Dichas composiciones, que son un objeto adicional de la invención, opcionalmente también pueden contener otros ingredientes. Las composiciones de la invención pueden tomar la forma de soluciones, emulsiones, geles, cremas, aerosoles, supositorios, gotas para los ojos, máscaras, parches, apósitos o tiritas.

Las formulaciones de la invención también se pueden obtener directamente de la solución del complejo añadiendo emulsionantes, estabilizadores, surfactantes, conservantes y perfumes, dependiendo del tipo de producto que se va a obtener (cremas, geles, emulsiones W/O u O/W, leches, máscaras, etc.).

10 La absorción transcutánea de condroitina se evaluó usando condroitina, condroitina marcada con tritio obtenida por biosíntesis y ratones desnudos Charles River. El estudio demuestra que la condroitina, cuando se administra por vía tópica, independientemente de su peso molecular, se absorbe efectivamente a través de la piel y luego se distribuye por el torrente sanguíneo en todo el cuerpo. 1 h después de la aplicación, aproximadamente el 50% de la dosis aplicada se localiza en la piel y solo una parte mínima se distribuye en el cuerpo. Después de más tiempo, la absorción cutánea aumenta aún más, al igual que el procedimiento de distribución sistémica a través del torrente sanguíneo. Después de 20 h, aproximadamente el 25% de la radiactividad administrada se ha excretado con la orina.

20 También se ha encontrado que la condroitina actúa como un sistema de liberación lenta para ingredientes activos seleccionados de diclofenaco o ketorolaco. De hecho, sus características estructurales hacen posible la interacción con moléculas de bajo peso molecular a través de diferentes tipos de fuerzas de atracción, que pueden actuar individual o sinérgicamente, tal como interacciones iónicas complementarias, interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, y puentes de hidrógeno. Dichas interacciones se descomponen en soluciones acuosas, pero se vuelven a formar continuamente debido a la presencia, a una distancia utilizable, de nuevas posibilidades de interacción con diferentes sitios en la misma cadena de polímero. Tal comportamiento en la práctica reduce la movilidad del compuesto unido, que permanece atrapado durante mucho tiempo en una jaula de fuerzas de atracción generadas por la cadena de polímero. El complejo no covalente obviamente se resuelve gradualmente con el tiempo en un sistema abierto, con una cinética que depende del estado de dilución y la presencia de otras especies químicas.

30 Un estudio de equilibrio de diálisis, en el que la solución del complejo está encerrada en un tubo de diálisis con un límite de 2 KDa, con un volumen de agua 20 veces mayor en el exterior, demuestra que en este sistema experimental, los complejos de diclofenaco-condroitina con diferentes estequiometrías actúan como sistemas para la liberación controlada del ingrediente activo, alcanzando un equilibrio de diálisis en tiempos superiores a 10 h, que se vuelven más lentas a medida que se reduce la proporción diclofenaco-condroitina en el complejo. En el sistema en el que solo está presente diclofenaco, el equilibrio de diálisis ya se alcanza después de 2 h.

35 La capacidad simultánea de la condroitina para atravesar el estrato córneo de la piel y la superficie de las membranas mucosas, combinada con la capacidad de formar complejos no covalentes, por lo tanto hace que este polisacárido sea un excelente portador de diversos tipos de ingredientes activos en humanos.

Los estudios *in vitro* en piel humana en una celda de Franz demuestran el efecto portador y el mecanismo de liberación de condroitina cuando forma complejos no covalentes con diclofenaco y ketorolaco. Los mismos hallazgos se obtienen con estudios que implican aplicaciones tópicas de dichos complejos a ratones desnudos.

Los siguientes ejemplos describen la invención con más detalle.

40 Ejemplo 1 - Preparación de [<sup>3</sup>H] condroitina con diferentes pesos moleculares

La [<sup>3</sup>H] condroitina se obtuvo por biosíntesis usando, como se describe en el documento WO 2010136435, una cepa modificada por ingeniería genética de *E. coli* K4 que produce el polisacárido K4, un derivado de condroitina que, en la posición C3 del ácido glucurónico, presenta residuos de β-fructofuranosa que se eliminan cuantitativamente por hidrólisis suave con ácido acético. Se agrega [<sup>3</sup>H]galactosa al medio de cultivo para radiomarcarse la condroitina. La [<sup>3</sup>H] condroitina, purificada como se describe en el documento WO 2010136435, tiene un peso molecular de 62 KDa. Para su uso en el estudio posterior, se diluyó con condroitina no marcada del mismo peso molecular para dar un producto con una radioactividad específica de 1.5x10<sup>7</sup> dpm/mg. Para obtener condroitina con un peso molecular de 35 y 10 KDa, [<sup>3</sup>H] condroitina MW 62 KDa, con una radioactividad específica de 1.5x10<sup>7</sup> dpm/mg, se sometió a hidrólisis ácida controlada en fase heterogénea. En un procedimiento estándar, se suspendieron 100 mg de [<sup>3</sup>H] condroitina en 1 ml de etanol (93% v/v) que contenía 33 μL de HCl, y se incubaron con agitación en un Vortemp a 55 °C y 900 rpm. La hidrólisis se realizó durante 40 minutos para obtener un MW de 35 KDa y 90 minutos para obtener un MW de 10 KDa. Cuando se alcanzó el MW deseado, la reacción se detuvo en hielo, se neutralizó con 21 μL de NaOH al 50% p/v, luego se dejó bajo agitación durante 30 minutos y se centrifugó a 5,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó y el residuo precipitado se lavó con 1 mL de etanol (93% v/v). La operación de lavado se repitió una segunda vez usando etanol anhidro. Después de la centrifugación, el sedimento se secó durante 16 h en una estufa a 40 °C al vacío. El análisis de peso molecular de condroitina se realizó con un sistema de cromatografía de exclusión por tamaño equipado con un detector múltiple, que consta de un viscosímetro de cuatro puentes, un refractómetro, un detector de dispersión de luz en ángulo recto (RALS) y un detector de dispersión de luz de ángulo

bajo (LALS), patentado por el grupo estadounidense Viscotek ([www.viscotek.com](http://www.viscotek.com)). La señal medida con LALS es proporcional al peso molecular y la concentración, y la señal medida con el detector viscosimétrico es proporcional a la concentración de la muestra y la viscosidad intrínseca, mientras que el refractómetro mide la concentración. El aparato Viscotek no solo determina el peso molecular, sino que también permite evaluar el grado de heterogeneidad del peso molecular en la población de moléculas presentes, descrito por el índice de polidispersidad  $M_w/M_n$ , calculado automáticamente por el aparato Viscotek, y definido como la proporción entre el peso molecular promedio ( $M_w = \sum_i m_i M_i / \sum_i m_i$  en la que  $m_i$  es la masa del polímero con peso molecular  $M_i$  y  $\sum_i m_i$  es la masa total del polímero, cuya expresión, suponiendo que  $m_i = n_i M_i$ , también se puede presentar como  $M_w = \sum_i n_i M_i^2 / \sum_i n_i M_i$ ) y peso molecular promedio en peso ( $M_n = \sum_i m_i M_i / \sum_i n_i$  en la que  $n_i M_i$  es la masa de polímero con peso molecular  $M_i$  y  $\sum_i n_i$  es el número total de moles de polímero presente). El valor de polidispersidad en las muestras de [<sup>3</sup>H] condroitina con diferentes pesos moleculares (62, 35 y 10) no excedió 1.2.

Para probar la especificidad del sitio de marcado, una muestra de [<sup>3</sup>H] condroitina se sometió a hidrólisis ácida fuerte en solución acuosa a 100 °C para provocar la ruptura total de los enlaces glucósidos. Una muestra de la mezcla de hidrólisis se analizó por HPLC. Para la cuantificación de GlcA, GalNAc se usó una columna analítica CarboPac PA1 de 4 x 250 mm equipada con una precolumna CarboPac PA1 de 4 x 50 mm (Dionex Srl, San Donato Milanese, Italia), que funcionaba a una velocidad de flujo de 1 mL/min. y GalNH. Los estándares y las muestras se analizaron según un método de separación por gradiente con los siguientes eluyentes: eluyente A NaOH 150 mM, eluyente B NaOH 150 mM + acetato de Na 1M. El gradiente usado fue (Tiempo en min, % de eluyente A, % de eluyente B): T0, A90, B10; T20, A80, B20; T30, A50, B50; T35, A90, B10; T40, A100, B0). La detección se realizó con un detector de amperímetro pulsado (electrodo de referencia de AgCl) con carbohidratos Waveform. La mezcla de hidrólisis se resolvió en tres picos, correspondientes a los tiempos de retención de ácido glucurónico, galactosamina y trazas de N-acetil-D-galactosamina. Los eluidos en los picos se recogieron y se leyeron para determinar la radiactividad en el fluido de centelleo. El 75% de la radiactividad se asoció con los picos de galactosamina y N-acetil-D-galactosamina.

Tres geles de [<sup>3</sup>H] condroitina, cada uno con 100 mg de polietilenglicol, 1 mg de alcohol bencílico, 879 mg de agua y 20 mg de [<sup>3</sup>H] condroitina ( $3 \times 10^8$  dpm) por gramo, con un MW de 62, 35 y 10 KDa respectivamente, se prepararon para el estudio posterior sobre el modelo animal.

Ejemplo 2 - Absorción tópica de condroitina con diferentes pesos moleculares

Se usaron 60 ratones desnudos Charles River de cinco meses de ambos sexos como modelo experimental para evaluar la absorción transcutánea de condroitina. Los animales se asignaron al azar en 12 grupos de 5 que, como se informó en el diseño del estudio en la tabla 1, se trataron con 50 mg de gel de [<sup>3</sup>H] condroitina con diferentes MW, preparados como se describe en el ejemplo 1. Durante el estudio los animales se mantuvieron en jaulas individuales, con acceso irrestricto a alimentos y agua.

Los animales se sacrificaron 1, 5, 10 y 20 h después de la aplicación, como se informa en el diseño del ensayo en la tabla 1. Inmediatamente después de la eutanasia, el área de aplicación de gel se lavó completamente hasta que no quedaron rastros detectables de radiactividad en el agua de lavado, para discriminar entre la radioactividad aplicada y la radioactividad absorbida por la piel. Las áreas tratadas de la piel, el hígado y la sangre se recuperaron de los animales sacrificados, y las muestras se pesaron y congelaron inmediatamente después de la extracción. La orina de los animales se recuperó de las jaulas mediante lavado.

Tabla 1 - Diseño del ensayo: 60 ratones desnudos Charles River de cinco meses de ambos sexos se asignaron al azar en 12 grupos de 5 animales. Se marcó un área de aproximadamente 5-6 cm<sup>2</sup> en la parte posterior de cada animal, en una posición donde era difícil para los animales lamersse o rascarse. Se aplicaron 50 mg de gel de [<sup>3</sup>H] condroitina MW 62 KDa con una espátula para los animales de 1 a 20, MW 35 KDa para los animales de 21 a 40 y MW 10 KDa para los animales de 41 a 60.

animales	tratamiento	tiempo de eutanasia (h)
1-5	[ <sup>3</sup> H]condroitina MW 62 KDa	1
6-10		5
11-15		10
16-20		20
21-25		1
26-30		5

31-35	[ <sup>3</sup> H]condroitina MW 35 KDa	10
36-40		20
41-45	[ <sup>3</sup> H]condroitina MW 10 KDa	1
46-50		5
51-55		10
56-60		20

Se solubilizaron muestras de piel, hígado y sangre (150-200 mg) en Soluene durante 24 h a temperatura ambiente. La radiactividad se midió por centelleo en fase líquida en las muestras solubilizadas y la orina. Los datos experimentales se presentan en las tablas 2-4.

5 Tabla 2 - Distribución de radiactividad en ratones desnudos tratados por vía tópica con un gel de [<sup>3</sup>H] condroitina ( $3 \times 10^8$  dpm) MW 62 KDa. Cada figura representa el promedio de 5 animales.

Muestra	1h	5h	10h	20h
	% de dosis aplicada			
piel	52±10	73±14	50±12	5±2
hígado	0.1±0.04	2.2±0.5	3.1±0.3	1.1±0.2
sangre	0.5±0.1	8.2±1.3	6.9±2.1	3.1±1.6
orina	-	2.3±1.2	5.9±4.3	24.8±10.2

Tabla 3 - Distribución de radioactividad en ratones desnudos tratados por vía tópica con un gel de [<sup>3</sup>H]condroitina ( $3 \times 10^8$  dpm) MW 35 KDa. Cada figura representa el promedio de 5 animales

Muestra	1h	5h	10h	20h
	% de dosis aplicada			
piel	49±8	74±10	53±13	8±3
hígado	0.1±0.02	2.0±0.7	3.4±0.5	1.3 ±0.4
sangre	0.7±0.2	8.8 ±1.9	6.6±2.4	3.8±1.5
orina	-	2.6±1.3	7.1±4.0	26.3±11.4

10

Tabla 4 - Distribución de radiactividad en ratones desnudos tratados por vía tópica con un gel de [<sup>3</sup>H]condroitina ( $3 \times 10^8$  dpm) MW 10 KDa. Cada figura representa el promedio de 5 animales.

Muestra	1h	5h	10h	20h
	% de dosis aplicada			
piel	58±0.9	78±15	51±9	6.2±1.9
hígado	0.1±0.04	2.2±0.6	3.8±0.5	1.4±0.3

sangre	0.9±0.2	8.2±1.4	6.9±3.4	3.3±1.3
orina	-	2.5±1.9	6.1±3.3	24.9±13.2

Los datos demuestran que la condroitina, cuando se administra por vía tópica, se absorbe eficazmente a través de la piel y luego se distribuye por el torrente sanguíneo en todo el cuerpo, independientemente de su peso molecular. 1 h después de la aplicación, aproximadamente el 50% de la dosis aplicada se localiza en la piel y solo una parte mínima se distribuye en el cuerpo. Después de más tiempo, la absorción cutánea aumenta aún más, al igual que el procedimiento de distribución sistémica a través del torrente sanguíneo. Después de 20 h, aproximadamente el 25% de la radiactividad administrada se ha excretado con la orina.

5

Ejemplo 3: Preparación de complejos no covalentes de diclofenaco-condroitina con diferentes composiciones estequiométricas.

10 Preparación del complejo de condroitina con ácido 2-(2-[2,6-diclorofenilamino] fenil) etanoico, también llamado diclofenaco.

Se prepararon complejos de diclofenaco-condroitina con proporciones molares de 0.630, 0.315 y 0.063 entre diclofenaco y la unidad de monómero de condroitina.

15 La preparación del complejo diclofenaco-condroitina con una proporción molar de 0.630-5 g de diclofenaco sódico se disolvió a 50 °C, bajo agitación vigorosa en 100 mL de una solución acuosa al 10% p/v de condroitina sódica MW 62 KDa.

La preparación del complejo diclofenaco-condroitina con una proporción molar de 0.315-2.5 g de diclofenaco sódico se disolvió a 50 °C, bajo agitación vigorosa en 100 mL de una solución acuosa al 10% p/v de condroitina sódica MW 35 KDa.

20 La preparación del complejo diclofenaco-condroitina con una proporción molar de 0.063-0.5 g de diclofenaco sódico se disolvió a 50 °C, bajo agitación vigorosa en 100 mL de una solución acuosa al 10% p/v de condroitina sódica MW 10 KDa.

Las formas sólidas de dichos complejos se obtuvieron eliminando el disolvente a vacío a 50°C, o alternativamente mediante liofilización de las soluciones. Los complejos sólidos se solubilizan rápidamente en agua.

25 Ejemplo 4: Estudios *in vitro* de liberación gradual de diclofenaco de complejos no covalentes de diclofenaco-condroitina con diferentes estequiometrías.

Para evaluar el mecanismo de liberación de diclofenaco de complejos no covalentes con condroitina de diferentes estequiometrías de manera diferencial, se diseñó un estudio de equilibrio de diálisis en el que la solución del complejo está encerrada en un tubo de diálisis con un límite de 2 KDa, y un volumen externo de agua 20 veces mayor. El sistema se mantuvo bajo agitación continua a 25 °C, y la absorción se leyó a lo largo del tiempo a 275 nm, en la cual el diclofenaco presenta la absorción máxima. De esta forma, como solo el diclofenaco puede atravesar la membrana de diálisis, en vista de la considerable diferencia de volumen entre la solución dializada y el medio de diálisis, el aumento de la absorción a 275 nm se puede atribuir a la cantidad de diclofenaco liberado del complejo con condroitina. La tabla 5 muestra los datos del estudio.

35 Tabla 5 - Estudio de equilibrio de diálisis, en el que 100 mL de solución acuosa del complejo estaba presente en un tubo de diálisis con un límite de 2 KDa, con un volumen de agua externo de 2 L. El sistema se mantuvo bajo agitación continua a 25 °C, y la absorción se leyó a lo largo del tiempo a 275 nm, en la cual el diclofenaco presenta la absorción máxima.

Estequiometría del complejo (moles de diclofenaco/moles de condroitina)	% OD <sub>275</sub> * presente en diferentes momentos (h) en el medio de diálisis				
	1	2	4	8	16
0.630	30	48	71	82	95
0.315	21	33	56	68	91
0.063	13	20	45	59	79

Solo diclofenaco **	85	94	96	95	96
* Tomando el OD <sub>275</sub> presente en el complejo diclofenaco-condroitina en el tubo de diálisis como 100, se informa el porcentaje total de OD <sub>275</sub> recuperado en la solución de diálisis en diferentes momentos; ** Se introdujeron 100 mL de solución acuosa que contenía 5% p/v de sal de diclofenaco sódico en el tubo de diálisis.					

El estudio demuestra que en este sistema experimental, los complejos de diclofenaco-condroitina con diferentes estequiometrías se comportan como sistemas para la liberación controlada del ingrediente activo, alcanzando un equilibrio de diálisis en tiempos superiores a 10 h, que se alargan a medida que la proporción diclofenaco-condroitina en el caídas complejas En el sistema en el que solo está presente el diclofenaco, el equilibrio de diálisis ya se alcanza después de 2 h.

Ejemplo 5: Estudios *in vitro* de absorción transcutánea de complejos diclofenaco-condroitina no covalentes

El estudio se realizó usando una celda de Franz equipada con una muestra de piel humana originada de cirugía plástica para la reducción de senos en una mujer sana de 45 años. La piel se congeló a -20 °C inmediatamente después de la extracción, y se mantuvo a esa temperatura hasta el momento de su uso. Antes de colocarlo en las celdas de Franz, la piel congelada se limpió de grasa subcutánea, de modo que solo se usaron el estrato córneo, la epidermis y la dermis, y se cortó a un tamaño adecuado para colocar en la celda de Franz, con el estrato córneo hacia arriba. Antes de comenzar el estudio, la celda se mantuvo a 30 °C, durante 10 h con agitación continua de la solución del receptor que consta de 10 mL de HBSS (soluciones salinas reguladas de Hank). La superficie sobre la que se depositó la formulación midió aproximadamente 3 cm<sup>2</sup>. Antes de la aplicación del gel en las celdas, se reemplazó la solución del receptor, con cuidado de eliminar todas las burbujas de aire entre la piel y la solución. Se aplicaron 10 mg de los siguientes geles a la superficie de la piel: a) gel de diclofenaco (por gramo de gel: 100 mg de polietilenglicol, 1 mg de alcohol bencílico, 200 mg de diclofenaco sódico y agua c.s. por 1 g, disuelto a 50 °C, bajo agitación vigorosa); b) gel de diclofenaco-condroitina (0.630 moles de diclofenaco/mol de unidades de disacárido de condroitina; por gramo de gel: 100 mg de polietilenglicol, 1 mg de alcohol bencílico, 200 mg de condroitina MW 35 KDa, 100 mg de diclofenaco sódico y agua c.s. por 1 g, disuelto a 50 °C, bajo agitación vigorosa); c) gel de diclofenaco-condroitina (0.630 moles de diclofenaco/mol de unidades de disacárido de sulfato de condroitina; por gramo de gel: 100 mg de polietilenglicol, 1 mg de alcohol bencílico, 279.6 mg de condroitina MW 35.4 KDa, 100 mg de diclofenaco sódico y agua c.s. por 1 g, disuelto a 50 °C, bajo agitación vigorosa).

En los momentos indicados, la fase del receptor se recuperó y la superficie de la piel se lavó a fondo para eliminar todo el gel no absorbido. La piel se recuperó, se homogeneizó y se digirió durante 10 h con agitación a 30 °C con colagenasa (5.200 l/g de piel) en 10 mM de solución reguladora de fosfato pH 7.4. Al final de la incubación, se añadieron 0.4 volúmenes de etanol y la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 min. En estas condiciones, casi todo el diclofenaco presente en el tejido se extrae en la solución. La HPLC determinó cuantitativamente la cantidad de diclofenaco presente en la solución de lavado de la piel (parte no absorbida), en el digestato de tejido enzimático (parte absorbida a través de la piel) y en el fluido del receptor (parte que cruzó la estructura de la piel). Los análisis se realizaron en un HPLC Waters modelo 746 (EE. UU.), equipado con una columna  $\mu$ -bondapack C18 (150 x 4.6 milímetros). Se usó una solución de acetonitrilo, agua desionizada y ácido ortofosfórico (45: 54.5: 0.5 en vol.) como fase móvil con un pH final de 3.5, operando con una velocidad de flujo de 1 mL/min. El eluato se controló a 276 nm. La cuantificación se obtuvo midiendo las proporciones entre el área de pico de diclofenaco y el área de pico del patrón interno que consiste en una solución de naproxeno con un título conocido.

La tabla 6 muestra los resultados del estudio.

Tabla 6 - Estudio de la absorción de diclofenaco por la piel humana usando la celda de Franz.

Muestra de gel que contiene	tiempo (h)	% de la dosis de diclofenaco aplicada		
		sobre la piel*	en la piel	en el fluido del receptor
Diclofenaco	1	96	2	0
	5	91	3.5	0.9
	10	89	3.1	1.8

Diclofenaco-condroitina	1	82	11.4	3.8
	5	75	18.2	7.5
	10	69	16.5	11.9
Diclofenaco-sulfato de condroitina	1	98	nd	Nd
	5	95	2.7	1.1
	10	91	2.9	1.6
* cantidad de diclofenaco presente al final del estudio en la solución usada para lavar la superficie de la piel montada en la celda de Franz.				

Como se verá a partir del análisis de los datos en la tabla 6, la absorción de diclofenaco en presencia de condroitina aumenta significativamente en comparación con la absorción observada en ausencia del polisacárido o en presencia de sulfato de condroitina.

5 Ejemplo 6 - Estudios *in vivo* de absorción transcutánea de complejos de condroitina-diclofenaco

Se usaron 45 ratones desnudos Charles River de cinco meses de ambos sexos como modelo experimental para evaluar la absorción transcutánea del complejo diclofenaco-condroitina. Los animales se asignaron al azar en 9 grupos de 5 que, como se informó en el diseño del ensayo en la tabla 7, se trataron con 50 mg de los tres geles: a) gel de diclofenaco; b) gel de diclofenaco-condroitina; y c) gel de diclofenaco-sulfato de condroitina, preparado como se informa en el ejemplo 5. Durante el estudio, los animales se mantuvieron en jaulas individuales, con acceso ilimitado a alimentos y agua.

Tabla 7 - Diseño del ensayo: 45 ratones desnudos Charles River de cinco meses de ambos sexos fueron asignados al azar a 9 grupos de 5 animales. Se marcó un área de aproximadamente 5-6 cm<sup>2</sup> en la parte posterior de cada animal, en una posición donde era difícil para los animales lamersse o rascarse. Se aplicaron 50 mg de gel de diclofenaco a dicha área con una espátula para animales de 1 a 15, 50 mg de gel de diclofenaco-condroitina para los animales de 16 a 30 y 50 mg de gel de diclofenaco-sulfato de condroitina para animales de 31 a 45.

animales	Tratamiento	tiempo de eutanasia (h)
1-5	Gel de diclofenaco	1
6-10		5
11-15		10
16-20	Gel de diclofenaco-condroitina	1
21-25		5
26-30		10
31-35	Gel de diclofenaco-sulfato de condroitina	1
36-40		5
41-55		10

Los animales fueron sacrificados 1, 5 y 10 h después de la aplicación, como se informa en el diseño del ensayo en la tabla 7. Inmediatamente después de la eutanasia, el área de aplicación del gel se lavó a fondo para discriminar entre la radiactividad aplicada y la radiactividad absorbida por la piel. Las áreas tratadas de la piel, el hígado y la sangre se recuperaron de los animales sacrificados, y las muestras se pesaron y congelaron inmediatamente después de la extracción. La orina de los animales se recuperó de las jaulas mediante lavado. Las muestras de piel e hígado se solubilizaron mediante tratamiento enzimático con colagenasa, y la cantidad de diclofenaco presente se determinó

por HPLC como se informa en el ejemplo 5. El contenido de diclofenaco en el suero y en la orina se determinó de manera similar por HPLC.

Los datos experimentales se presentan en las tablas 8-10.

5

Tabla 8 - Distribución de radiactividad en ratones desnudos tratados por vía tópica con gel de diclofenaco. Cada figura representa el promedio de 5 animales.

	Tiempo de eutanasia (h)		
	1	5	10
	% de dosis aplicada		
piel	0.8±0.3	1.2±0.5	3±0.4
hígado	Nd	nd	0.1±0.03
suero	Nd	nd	0.5±0.12
orina	Nd	nd	0.9±0.3

Tabla 9 - Distribución de radioactividad en ratones desnudos tratados por vía tópica con gel de diclofenaco-condroitina. Cada figura representa el promedio de 5 animales.

Muestra	Tiempo de eutanasia (h)		
	1	5	10
	% de dosis aplicada		
piel	49±13	69±15	45±10
hígado	Nd	1.2±0.3	3.1±0.7
suero	0.9±0.3	6.1±1.4	3.1±1.1
orina	Nd	1.9±1.5	7.9±5.1

10

Tabla 10 - Distribución de radiactividad en ratones desnudos tratados por vía tópica con gel de diclofenaco-sulfato de condroitina. Cada figura representa el promedio de 5 animales.

Muestra	Tiempo de eutanasia (h)		
	1	5	10
	% de dosis aplicada		
piel	2±1	3±1,5	7±2,3
hígado	nd	nd	1,1±0,4
suero	nd	1,0±0,3	0,9±0,3
orina	nd	0,3±0,1	2,1±1,3

Los datos en las tablas 8-10 demuestran que la condroitina, pero no el sulfato de condroitina, actúa como un portador transdérmico eficiente de diclofenaco, que no solo se encuentra localizado en la piel, sino que también se

distribuye sistémicamente. El diclofenaco solo tiene una absorción transcutánea muy inferior a la observada en el caso del complejo no covalente con condroitina.

Ejemplo 7 - Estudios *in vitro* de absorción transcutánea de complejos de ketorolaco-condroitina no covalentes

5 El ácido ( $\pm$ ) -5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1-carboxílico o la sal de trometamina ketorolaco, mejor conocido por el nombre comercial toradol, es un NSAID ampliamente usado como antiinflamatorio, a pesar de principales efectos secundarios relacionados con su uso a largo plazo. El estudio de la absorción tópica de este ingrediente activo, como un complejo no covalente con condroitina, se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 5, usando una celda de Franz equipada con una muestra de piel humana procedente de cirugía plástica para la reducción de senos en una mujer sana de 33 años. Se aplicaron 10 mg de los siguientes geles a la superficie de la piel: a) gel de sal de trometamina ketorolaco (por gramo de gel: 100 mg de polietilenglicol, 1 mg de alcohol bencílico, 200 mg de sal de trometamina ketorolaco y agua c.s. por 1 g, disuelto a 50 °C, bajo agitación vigorosa); b) gel de sal de trometamina ketorolaco-condroitina (0.535 moles de sal de trometamina ketorolaco/mol de unidades de disacáridos de condroitina; por gramo de gel: 100 mg de polietilenglicol, 1 mg de alcohol bencílico, 200 mg de condroitina MW 62 KDa, 100 mg de sal de trometamina ketorolaco y agua c.s. por 1 g, disuelto a 50 °C, bajo agitación vigorosa).

20 Los procedimientos de tratamiento de muestra fueron como se informa en el ejemplo 5. La cantidad de ketorolaco presente en la solución de lavado de piel (parte no absorbida), en el digestato de tejido enzimático (parte absorbida por la piel) y en el fluido del receptor (parte que cruzó la estructura de la piel) se determinó cuantitativamente por HPLC. Las pruebas se realizaron en un HPLC Waters modelo 746 (EE. UU.), equipado con una columna  $\mu$ -bondapack C18 (150 x 4.6 milímetros). Se usó una solución de acetonitrilo, agua desionizada y ácido ortofosfórico (45: 54.5: 0.5 en vol.), con un pH final de 3.5, como fase móvil, operando con una velocidad de flujo de 1 mL/min. El eluato se controló a 280 nm. La cuantificación se realizó midiendo las proporciones entre el área de pico de ketorolaco y el área de pico del patrón interno, que consiste en una solución de naproxeno con un título conocido.

La tabla 11 muestra los resultados del estudio.

25 Tabla 11 - Estudio de absorción de ketorolaco por piel humana usando la celda de Franz.

Muestra de gel que contiene	tiempo (h)	% de la dosis de diclofenaco aplicada		
		sobre la piel*	en la piel	en el fluido del receptor
Ketorolaco	1	98	1	nd
	5	93	2.6	0.7
	10	87	4.2	2.8
Ketorolaco-condroitina	1	85	9.4	4.8
	5	79	11.6	8.2
	10	70	14.2	10.8

\* cantidad de ketorolaco presente al final del estudio en la solución usada para lavar la superficie de la piel montada en la celda de Franz.

Como se verá a partir del análisis de los datos en la tabla 11, la absorción de ketorolaco en presencia de condroitina aumenta significativamente en comparación con la absorción observada en ausencia del polisacárido.

**REIVINDICACIONES**

1. Composiciones farmacéuticas y cosmeceúticas que contienen complejos no covalentes entre condroitina no sulfatada que tiene un peso molecular entre 5 y 100 kDa determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y un ingrediente activo seleccionado de diclofenaco o ketorolaco.
- 5 2. Composiciones según la reivindicación 1 para la administración tópica, nasal, rectal y vaginal.
3. Composiciones según las reivindicaciones 1 a 2 en forma de soluciones, emulsiones, gel, cremas, aerosoles, supositorios, gotas para los ojos, máscaras, parches, apósitos y tiritas.
4. Complejos no covalentes de condroitina no sulfatada que tienen un peso molecular entre 5 y 100 kDa determinado por cromatografía de exclusión por tamaño y diclofenaco o ketorolaco que se absorben a través de la piel y las membranas mucosas y se comportan como portadores transdérmicos y sistemas de liberación lenta para ingredientes activos.
- 10