



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 348 887**

② Número de solicitud: 201090045

⑤ Int. Cl.:
C07C 33/320 (2006.01)
A61K 31/145 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61P 25/32 (2006.01)
A61P 25/36 (2006.01)
C07C 333/20 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **23.12.2008**

⑩ Prioridad: **28.12.2007 CL 3876-2007**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.12.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Concepción
Edmundo Larenas, 234
Concepción, CL
LABORATORIOS ANDRÓMACO S.A. y
ABL PHARMA COLOMBIA S.A.**

⑦ Inventor/es:
**Von Plessing Rossel, Carlos Guillermo;
Sepúlveda Carreño, María Jacqueline y
Montero Cabrera, Edson Freddy**

⑦ Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

⑤ Título: **Complejo de inclusión formado por Disulfiram y una ciclodextrina, útil en el tratamiento de la dependencia de alcohol y cocaína.**

⑤ Resumen:

Complejo de inclusión formado por Disulfiram y una ciclodextrina, útil en el tratamiento de la dependencia de alcohol y cocaína. La presente invención está relacionada con un nuevo complejo de inclusión formado por Disulfiram (DSF) y una ciclodextrina (CD), sus procedimientos de obtención, composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento de la dependencia de alcohol y cocaína.

ES 2 348 887 A1

DESCRIPCIÓN

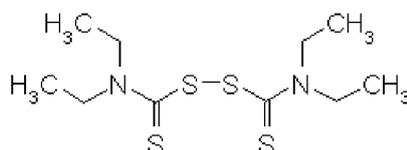
Complejo de inclusión formado por Disulfiram y una ciclodextrina, útil en el tratamiento de la dependencia de alcohol y cocaína.

La presente invención esta relacionada con un nuevo complejo de inclusión formado por Disulfiram (DSF) y una ciclodextrina (CD), sus procedimientos de obtención, composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento de la dependencia de alcohol y cocaína.

Estado de la técnica

La dependencia de alcohol es una patología multicausal, por lo que debe ser abordada con un tratamiento de tipo biopsicosocial, el cual incluye apoyo farmacológico. Existen varios tipos de tratamientos para la dependencia de alcohol, en que se emplean diversas herramientas farmacológicas y/o psicoterapéuticas; sin embargo, ellas tienen en común el inconveniente de presentar baja adherencia, lo que impide la rehabilitación del paciente y su posterior inserción en la sociedad.

Uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la dependencia del alcohol, es el Disulfiram, (1-(dietilthiocarbamoildisulfanyl)-N,N-dietil-metanotioamida; CAS N° 97-77-8), peso molecular de 296,543 g/mol, fórmula molecular $C_{10}H_{20}N_2S_4$, cuya estructura química corresponde a la Fórmula (I):



Fórmula (I)

El DSF se utiliza principalmente en comprimidos de uso oral, presentando el inconveniente de registrar una baja adherencia al tratamiento, porque el paciente simplemente suspende la administración y/o engaña al terapeuta al respecto.

A raíz de la baja adherencia que presenta la terapia farmacológica con DSF, se han propuesto estrategias radicales que involucran la administración de DSF de acción sostenida.

El primer intento de administrar DSF bajo esta forma, corresponde a un implante o pellet de liberación sostenida de 1 g de DSF (*Marie, C. Á Propos d'un Nouveau Mode de Traitement de l'Alcoolisme Chronique par Implantation de Disulfure de Tetraethyle-Thiourane. Thèse, Faculté de Médecine de l'Université de París, 1955.*); sin embargo, se ha sugerido que estos implantes no alcanzarían niveles farmacológicos efectivos y que su efectividad sería principalmente tipo placebo además de presentar niveles erráticos a nivel sanguíneo. (*Wilson, A.; Davidson, W.; Blanchard, R. Disulfiram Implantation: A Trial Using Placebo Implants and Two Types of Controls, J. Stud. Ale, 1980; 41: 429-436.*) Las dosis terapéuticas diarias necesarias por vía oral son del orden de 500 mg (normalmente la terapia con DSF consiste en la administración de 500 mg/día) alcanzándose niveles terapéuticamente efectivos; en cambio, esto no se ha conseguido con este implante de 1 g de DSF de acción sostenida, ya que no se obtienen los niveles plasmáticos para una terapia farmacológica exitosa.

En otro orden, debido a que la solubilidad del DSF en agua es una limitante fisicoquímica, siendo alrededor de 0,02 mg/mL, lo que lleva a una baja e incompleta absorción gastrointestinal, para el caso de comprimidos de administración oral, y una liberación errática en el caso de los implantes o pellets subcutáneos, se han postulado suspensiones o soluciones de DSF en diferentes vehículos. Desde este punto de vista se ha demostrado que se puede modificar la biodisponibilidad del DSF subcutáneo mediante el uso de aceites (*Stromme, JH; Eldjarn, L.; Stensrud, T. Distribution and Chemical Forms of Diethyldithiocarbamate and Tetraethylthiuram Disulfide (Disulfiram) in Mice in Relation to Radioprotection, Biochem. Pharmacol. 1966; 15: 287-297.*), disuelto en polietilenglicol (*Phillips, M. Excretion of Carbón Disulfide in Breath Following Subcutaneous Injection of Disulfiram, Clinical Research, 1980; 28(3), 623 A*) o suspendido en agua (*Phillips, Michael; Gresser, Joseph G. Sustained-Release Characteristics of a New Implantable Formulation of Disulfiram, J. Pharm. Sci. Subst. Abuse, 1984; 73(12), 1718-1720.*) No obstante, Phillips y Greenberg, (*Phillips, M.; Greenberg, J. Dose-Ranging Study of Depot Disulfiram in Alcohol Abusers, Alcohol CU. Exp-Res. 1992; 16(5): 964-967*) demostraron que la suspensión en agua de DSF no actuaría como forma de depósito.

Otro ejemplo de implante es una forma de administración subcutánea de DSF en microgránulos suspendido en un vehículo compuestos por una mezcla de propilenglicol/agua (*Chandía R. et al, Estudio clínico de disulfiram en suspensión inyectable. Una nueva alternativa en el tratamiento del alcoholismo. Rev. Med. Chile, 118, 855-861*), sin embargo, se ha demostrado que las formas de administración subcutánea, estudiadas y probadas a la fecha, producen un intenso dolor y reacciones inflamatorias, lo que es incómodo para los pacientes resultando en una baja adherencia y abandono de los tratamientos.

De los estudios anteriores se puede entonces definir que los problemas principales en la administración de DSF obedecen a la baja solubilidad del mismo y a la imposibilidad de obtener suspensiones y soluciones parenterales que faciliten su administración, ya que por un lado no se han demostrado buenos resultados en relación a la biodisponibilidad del fármaco, a la solubilidad y a una liberación sostenida; y por otro lado existe un gran impacto en la zona de aplicación con signos de inflamación y dolor.

Los inventores han diseñado un nuevo complejo de inclusión con DSF, que supera los inconvenientes y desventajas propias del DSF, presentadas en el estado del arte, y mediante estudios fisicoquímicos, farmacocinéticos, farmacológicos e histopatológicos, han podido demostrar la eficacia de estos nuevos complejos de inclusión, la excelente biodisponibilidad y el mínimo daño en el punto de inoculación.

Mecanismo de acción del disulfiram

El primer informe sobre DSF y sus posibles aplicaciones en el tratamiento de la dependencia de alcohol aparece en 1948, por Jacobsen y Hald (*Jacobsen Erik Hald J., Larsen V. The sensitizing effect of tetraethylthiuram disulfide (Antabuse) to ethyl alcohol, Acta Pharmacol et Toxicol, 1948, 4: 285-296*). Este fármaco ha sido, durante años, ampliamente utilizado como terapia de rechazo al alcohol etílico.

El DSF produce hipersensibilidad al alcohol mediante la inhibición del mecanismo enzimático que oxida el acetaldehído a ácido acético, lo que ocurre en el hígado durante el normal catabolismo del etanol. El alcohol etílico absorbido es removido del organismo primordialmente (>90%) mediante mecanismos oxidativos ubicados en su gran mayoría a nivel hepático, y que involucran principalmente una alcohol deshidrogenasa (ADH) y en menor proporción ciertas enzimas microsómicas (sistema microsómico oxidativo del alcohol).

El primer paso en la metabolización del alcohol, es oxidar el sustrato a acetaldehído a través del sistema enzimático de la ADH que utiliza el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD^+) como aceptor de hidrógeno. La mayor parte del acetaldehído continúa oxidándose en el hígado a ácido acético, por una familia de isoformas de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), que utiliza asimismo el NAD^+ como aceptor de hidrógeno. El producto, acetaldehído, se convierte en acetil-CoA, que a continuación se oxida por medio del ciclo del ácido cítrico a CO_2 o se emplea en las diversas regiones anabólicas que participan en la síntesis de colesterol, ácidos grasos y otros constituyentes tisulares (*Hardman, Joel G.; Limbird, Lee E. Goodman & Gilman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9ª edición, Vol. I, McGraw-Hill Interamericana Editores S.A., México, 1996:417-418*).

Normalmente la capacidad de remover el acetaldehído por la ALDH excede la capacidad de generación de acetaldehído por oxidación de etanol, de modo que los niveles circulantes de acetaldehído son bastante bajos.

El DSF compite con el NAD^+ por la enzima ALDH produciendo una aparente inhibición irreversible de la actividad enzimática (*McEvoy, Gerald K. AHFS Drug Information, American Society of Health System Pharmacists, U.S.A., 2002, 3628-3630*). Se produce entonces, una acumulación de acetaldehído en la sangre, la que se cree responsable de los signos y síntomas, que han sido denominados como "síndrome de acetaldehído" (o Reacción Etanol-Disulfiram, RED), que aparece dentro de los 10 minutos tras la ingesta de alcohol y que se caracteriza principalmente por enrojecimiento de la cara, cefalea pulsátil, disnea, náuseas, vómitos, transpiración, hipotensión, dolores torácicos, vértigos y visión borrosa (Martindale, "The Complete Drug Referente", 32th Edition, Kathleen Parfitt, USA, 1999: 1573). La duración del síndrome varía entre 30 minutos y algunas horas; posteriormente se produce cansancio y sueño. Este síndrome puede ser desencadenado incluso por 7 mL de alcohol en sujetos sensibles. Las personas bajo tratamiento con DSF deben ser prevenidas oportunamente de que el uso de lociones de afeitar o fricciones, medicamentos como jarabes para la tos o incluso salsas o vinagre fermentado, pueden desencadenar el síndrome. La RED puede ocurrir hasta 1 ó 2 semanas transcurridas desde la última toma del medicamento (*McEvoy, Gerald K. AHFS Drug Information, American Society of Health System Pharmacists, U.S.A., 2002, 3628-3630*).

El tratamiento con DSF no se considera una cura para la dependencia de alcohol, sino una terapia aversiva o condicionante: la respuesta terapéutica parece residir al temor a la RED más que a una acción farmacológica propia del medicamento.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está enfocada a un nuevo complejo de inclusión formado por (DSF) y una ciclodextrina (CD) (denominado de aquí en adelante como Complejo DSF-CD), sus procedimientos de obtención, sus composiciones farmacéuticas y su uso en el tratamiento de alcohol y en la dependencia de la cocaína, ya que se ha encontrado beneficio del uso de DSF en pacientes con dependencia de cocaína, con o sin dependencia de alcohol comórbida (*Carroll, K. M., Ziedonis, D., O'Malley, S. S., McCance-Katz, E., Gordon, L. and Rounsaville,*

- B. J., *Pharmacologic interventions for abusers of alcohol and cocaine: a pilot study of disulfiram versus naltrexone. American Journal on Addictions* 2, 77-79, 1993; Carroll K. et al. *Efficacy of disulfiram and cognitive behavior therapy in cocaine-dependent outpatients. Arch Gen Psychiatry*, 61: 264-72, 2004. Preti A. *New developments in the pharmacotherapy of cocaine abuse. Addict Biol*, 12(2):133-51, 2007; y Kenna GA, Nielsen DM, Mello P, Schiesl A, Swift RM. *Pharmacotherapy of dual substance abuse and dependence. CNS Drugs*, 21(3):213-37, 2007. Review).

Otro aspecto importante de esta invención es proveer de formulaciones farmacéuticas en estado sólido y líquido que comprenden el Complejo DSF-CD.

- 10 A través del uso de excipientes adecuados, es posible modificar y controlar las propiedades físico-químicas de las moléculas y/o propiedades farmacológicas mediante la modificación de los procesos involucrados. La inclusión de fármacos en ciclodextrinas (CDs), como es en este caso, es una *alternativa eficiente para mejorar propiedades físico-químicas como la estabilidad y la solubilidad* de moléculas hidrofóbicas, una potencial herramienta para modificar y controlar parámetros como la biodisponibilidad o tasa de liberación de un medicamento por diversas vías de administración (*Duchêne, Dominique New Trends in Cyclodextrins and Derivates, Editions de la Santé, París, 1992*).

- 20 Cabe destacar, que la solubilidad de un fármaco es de especial interés ya que si bien muchos de los factores que están involucrados con la biodisponibilidad de un fármaco dependen de su lipofiliencia (como son por ejemplo el paso a través de membranas, la afinidad a receptores y la distribución tisular), para una adecuada biodisponibilidad, sea cual fuere la ruta de administración, el proceso de absorción de medicamentos depende en gran medida, de la solubilidad acuosa del principio activo (*Duchêne, Dominique New Trends in Cyclodextrins and Derivates, Editions de la Santé, París, 1992; Hardman, Joel G.; Limbird, Lee E. Goodman & Gilman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 9ª edición, Vol. I, McGraw-Hill Interamericana Editores S.A., México, 1996: 5*).

- 25 Tal como se indicara anteriormente, el principal problema que presenta el DSF es su baja solubilidad en agua, por lo que se requiere de un excipiente que permita mejorar dicha propiedad físico-química. De tal forma la presente invención demuestra las modificaciones físico-químicas que sufre el DSF al formar un complejo de inclusión con CDs.

- 30 Las CDs son un grupo de almidones modificados mediante procesos de fermentación, a la forma de anillos circulares que pueden estar compuestos por seis, siete u ocho monómeros de glucosa (glucopiranosas unidas mediante enlaces del tipo α 1-4), estructuras conocidas como α , β y γ -ciclodextrinas, respectivamente.

- 35 De los derivados de CDs descritos en artículos científicos y documentos de patentes, sólo unos cuantos pueden ser utilizados para propósitos médicos (*Szejtli, József, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, Chemical Reviews, 1998; 98(5): 1743-1753*), siendo los productos farmacéuticos los que constituyen la mayor parte del mercado de las CDs. Un ejemplo, es el uso de la Hidroxipropil- β -CD en el nuevo fungicida oral y parenteral de itraconazol de *Johnson & Johnson, Sporanox®*, donde mejora la solubilidad y biodisponibilidad del medicamento.

- 40 Por otro lado, la compañía Schwarz Pharma utiliza α -CD para solubilizar una prostaglandina, alprostadil (Edex®), medicamento empleado para la impotencia (*McCoy M. "Cyclodextrins; Great product seeks a markets". Chemical & engineering news 1999; 77 (9): 25-27*).

- 45 También se han utilizado las CDs y sus derivados para la administración de hormonas sexuales (particularmente testosterona, progesterona y estradiol) por vía sublingual o bucal (*Pitha J. Administration of sex hormones in the forms of hydrophilic cyclodextrin derivatives, united states patent 4,751,094 (jun. 14 1986)*), en preparaciones de liberación transdérmica (*Ueda Y., et al. "Sustained-release transdermal delivery preparations". Patente US 4.749.74 (junio 1988)*, entre otros).

- 50 Adicionalmente se han descrito formulaciones que comprenden una asociación de DSF con CD en la forma de solución. El documento CN 1376463 A describe una composición farmacéutica de uso tópico ocular que comprende una CD y DSF, donde el DSF presenta una solubilidad mejorada. La asociación de DSF y CD se mezcla en agua y se liofiliza. En este documento no se demuestra la formación de un complejo de inclusión.

- 55 En otra publicación, *Wang S et al. (Wang S, Li D, Ito Y, Nabekura T, (2004), Bioavailability and anticataract effects of a topical ocular drug delivery system containing disulfiram and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on selenite-treated rats. Current Eye Research. Vol. 29(1), 51-58*), se describe un estudio de gotas oculares que contienen una alta concentración de DSF y una CD. La composición está orientada al tratamiento de cataratas, y se utiliza una elevada concentración de CD como solubilizante para aumentar la solubilidad de DSF y obtener una forma farmacéutica apropiada para ser aplicada directamente en los ojos. En este documento la proporción utilizada de DSF:CD es de 1:2,5, y no se demuestra la formación de un complejo de inclusión sino que el aumento de solubilidad que proporciona las CD al principio activo.

- 65 Las macromoléculas de CDs presentan la particularidad de formar dentro de su ordenación espacial una cavidad central. Debido a que los azúcares adoptan la conformación de silla, las CDs adoptan la forma de un cono truncado más que la de un cilindro perfecto. Los grupos hidroxilo están orientados hacia el exterior del cono, lo que hace a la CD soluble en agua. Los hidroxilos secundarios están orientados hacia un extremo y los de tipo primario, hacia el extremo opuesto, lo que determina que, debido a la libre rotación de éstos últimos, definan el borde de diámetro menor. La cavidad central está delineada por el esqueleto carbonado, átomos de hidrógeno y los átomos de oxígeno glicosídico

que le otorgan el carácter lipofílico. Los electrones no apareados de los puentes de oxígeno le otorgan características de base de Lewis, ya que se produce una alta densidad electrónica hacia la parte interna del anillo, formando una superficie hidrofóbica (Figura 1), que es capaz de interactuar con diversas moléculas orgánicas (o partes de ellas) para formar compuestos de inclusión (Duchêne, Dominique. *New Trends in Cyclodextrins and Derivates*, Editions de la Santé, París, 1992).

Un complejo de inclusión es una asociación molecular en la cual una molécula denominada huésped, se introduce en la cavidad de una macromolécula denominada hospedadora, con una estequiometría bien definida. En el caso de la presente invención, el DSF (huésped), es encapsulado o incluido dentro de otra molécula, o estructura hecha de dichas moléculas (hospedador), en este caso, la CD.

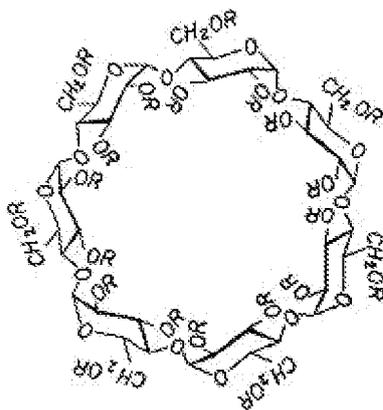
En el contexto de la presente invención se entenderá por “mezcla física” a una mezcla, en estado sólido, de proporciones claramente definidas de CD y DSF.

El complejo de inclusión comprende interacciones intermoleculares débiles, comúnmente llamadas uniones hidrofóbicas similares a las encontradas en diversos sistemas biológicos (enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo por ejemplo). Una, dos o tres moléculas de CD pueden contener una o más moléculas del huésped. Lo más frecuente es la relación huésped:hospedador (1:1).

Las interacciones involucradas en el proceso de inclusión son de carácter débil y se atribuyen a fuerzas de van der Waals, fuerzas de dispersión de London, interacciones dipolo-dipolo e interacciones hidrofóbicas.

En solución acuosa, se encuentran normalmente moléculas de agua dentro de la cavidad de las CDs (interacción polar-apolar); sin embargo, dado que son estructuras de naturaleza polar, su presencia no es termodinámicamente favorable. Al introducirse un huésped en el seno de la CD, desplaza estas moléculas de agua. Tanto el huésped como las moléculas de agua se favorecen termodinámicamente. El resultado de la complexación es entonces, un sistema termodinámicamente más favorable: las fuerzas de repulsión entre las moléculas de agua de alta entalpia dentro de la CD y las fuerzas de repulsión entre el huésped apolar en el seno de la solución polar junto a las interacciones de tipo débil ya mencionadas, favorecen la formación del complejo de inclusión (Connors K. “The stability of cyclodextrin complexes in solution”. *Chem. Rev* 1997; 5: 1325-1357; Szejtli J. “Utilitation of cyclodextrins in industria product and processes”. *J mater. Chem* 1997; 7(4): 575-587; Duchêne D. *New trends in cyclodextrins and Derivates*. Editions de la Santé, París. 1992, 53-55).

Existen diferentes CDs que se fueron modificando químicamente en busca de mejorar las propiedades físico-químicas de los compuestos originales. Es así como aparece la hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) de la siguiente fórmula estructural:



La presente invención describe un nuevo complejo de inclusión de DSF con hidroxipropil- β -ciclodextrina, con el propósito de mejorar las características de solubilidad y biodisponibilidad del fármaco.

Existen diferentes métodos de preparación para los “complejos de DSF en hidroxipropil- β -ciclodextrina” (Complejo DSF-CD), los que se obtienen en forma de productos sólidos. Estos métodos, además pueden requerir de diferentes proporciones de cada uno de sus componentes.

Los procesos empleados en esta invención para la preparación de los complejos de DSF con hidroxipropil- β -ciclodextrina son conocidos en la técnica y pueden ser fácilmente reproducibles por un experto en tecnología farmacéutica.

Los productos obtenidos por los diferentes métodos presentan características diferentes y su comportamiento puede ser distinto.

ES 2 348 887 A1

Con el fin de caracterizar fisicoquímicamente el complejo de inclusión de DSF con la CD hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) fue necesario preparar dichos complejos en proporciones de DSF y CD (de aquí en adelante se utilizarán indistintamente los términos CD y HP- β -CD) como 1:1 y 1:2 en relación a sus pesos moleculares y por diferentes métodos de preparación, los que se indican a continuación:

5

a) *Complejo DSF-CD obtenido por Rotavapor*

Se prepararon mezclas de HP- β -CD y DSF a las que se añadieron igual cantidad en peso de alcohol absoluto. La mezcla se disolvió completamente. Posteriormente se llevo hasta la evaporación completa del disolvente, secándose posteriormente en estufa a 45°C durante 48 horas.

Las condiciones operacionales para la obtención del complejo mediante este método fueron:

15 Temperatura del baño: 60°C

Velocidad de agitación: 160 rpm

20 Vacío: 80 mmHg

b) *Complejo DSF-CD obtenido por Spray drying*

Se disolvió la mezcla de HP- β -CD y DSF en alcohol absoluto como solvente para obtener la solución alcohólica correspondiente. La atomización se llevó a cabo en un aparato Büchi B-290.

Las condiciones operacionales para la obtención del complejo mediante este método fueron:

30 Temperatura de entrada: 85°C

Velocidad de bomba peristáltica: 35%

Bomba de extracción 70%

35

c) *Complejo DSF-CD obtenido por Liofilización*

Las condiciones operacionales para la obtención del complejo mediante este método fueron:

40 Temperatura de congelamiento: -80°C

Temperatura de sublimación: -54°C

Vacío: $135 * 10^{-3}$ mbar

45

El DSF fue adquirido en la compañía A. Sander & Co. GMBH, Hamburg Alemania. La Hidroxipropil- β -ciclodextrina ENCAPSIN® es procedente de Janssen Biotech N.V., Bélgica. El resto de los productos químicos eran de grado analítico y se utilizó agua destilada. Se adquirió ácido clorhídrico Titrisol® de Merck, Alemania, para preparar solución al 0,1 N.

50

El complejo de inclusión de DSF con CD fue elaborado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción, Chile, mediante los métodos antes descritos.

55

Con el propósito de evaluar la formación del complejo de inclusión, se realizó su caracterización mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Difracción de Rayos-X (RX) y análisis topográficos (Microscopía Electrónica de Barrido) (MEB).

60 Descripción de las figuras

Figura 1: muestra el modelo espacial de la CD.

65

Figura 2: Calorimetría diferencial de barrido de: (a) DSF; (b) HP- β -CD; (c) Complejo DSF-CD 1:1 preparado en Rotavapor; (d) Complejo DSF-CD 1:2 preparado en Rotavapor; (e) Complejo DSF-CD 1:1 preparado por Spray Drying; (f) Complejo DSF-CD 1:2 preparado por Spray Drying; (g) Complejo DSF-CD 1:1 preparado por Liofilización; (h) Complejo DSF-CD 1:2 preparado por Liofilización.

Figura 3: Espectros de difracción de Rayos-X de: (a) DFS; (b) HP- β -CD; (c) Complejo DSF-CD 1:1 preparado en Rotavapor; (d) Complejo DSF-CD 1:1 preparado por Liofilización; (e) Complejo DSF-CD 1:1 preparado por Spray Drying; (f) Complejo DSF-CD 1:2 preparado en Rotavapor; (g) Complejo DSF-CD 1:2 preparado por Liofilización; (h) Complejo DSF-CD 1:2 preparado por Spray Drying.

5

Figura 4: Espectro infrarrojo (IR) de DSF.

Figura 5: Espectro IR de la HP- β -CD.

10

Figura 6: Espectro IR de la mezcla física DSF/HP- β -CD (1:1).

Figura 7: Espectro IR de Complejo DSF/HP- β -CD (Complejo DSF-CD).

15

Figura 8: Microscopía electrónica de barrido x 1000 de: (a) Complejo DSF-CD elaborado por Rotavapor en una proporción 1:1; (b) Complejo DSF-CD elaborado por Rotavapor en una proporción 1:2; (c) Complejo DSF-CD elaborado por Spray drying en una proporción 1:1; (d) Complejo DSF-CD elaborado por Spray drying en una proporción 1:2; (e) Complejo DSF-CD elaborado por Liofilización en una proporción 1:1; (f) Complejo DSF-CD elaborado por Liofilización en una proporción 1:2; (g)HP- β -CD (x 300).

20

Figura 9: Microscopía electrónica de barrido x 4000 de: (a) Complejo DSF-CD elaborado por Spray drying en una proporción 1:1; (b) Complejo DSF-CD elaborado por Spray drying en una proporción 1:2; (c) HP- β -CD (x 300).

Figura 10: Microscopía óptica con luz polarizada: (a) DSF y (b) Complejo DSF-CD por Spray drying en una proporción 1:1; (c) Complejo DSF-CD por Rotavapor (40x) en una proporción 1:1.

25

Figura 11: Histogramas de tamaño de partículas: (a) Complejo DSF-CD elaborado por Spray drying en una proporción 1:1, (b) DSF libre.

30

Figura 12: Solubilidad máxima del DSF y del Complejo DSF-CD en HCL 0,1 N obtenido por los tres métodos de preparación.

Figura 13: Cinética de disolución del DSF, Complejo DSF-CD en proporciones 1:1 y 1:2 y mezclas físicas (MF) en proporciones 1:1 y 1:2 en HCL 0,1 N.

35

Figura 14: Variaciones en la frecuencia cardiaca, producidas por la administración de 1 g/Kg de etanol diluido en agua destilada al 50% por vía intraperitoneal (IP) en ratas inyectadas por vía subcutánea (SC) con DSF libre (no complejo) y C Complejo DSF-CD (DSF complejo), en dosis de 15 mg/Kg. Las ratas fueron monitoreadas en los siguientes tiempos: 1 hr (A), 24 hrs (B), 48 hrs (C), 12 hrs (D), 96 hrs (E) y 144 hrs (F) post administración del etanol.

40

Figuras 15 a 22: Cortes histológicos de piel de rata en zonas de administración subcutánea (SC), de DSF (A); Complejo DSF-CD (B); y control con suero fisiológico SF (C). Los cortes histológicos fueron obtenidos a diferentes tiempos post-administración de cada uno de los ensayos. La Figura 15 corresponde a 8 horas post-administración; la Figura 16 a 24 horas post-administración; la Figura 17 a 48 horas post-administración; la Figura 18 a 72 horas post-administración; la Figura 19 a 96 horas post-administración; la Figura 20 a 120 horas post-administración; la Figura 21 a 144 horas post administración y la Figura 22 corresponde a 168 horas post-administración.

45

Figura 23: muestra los resultados obtenidos del área bajo la curva (ABC) después de la administración subcutánea de DSF libre (A) y Complejo DSF-CD (B).

50

Resultados

1.- Caracterización fisicoquímica del complejo de inclusión DSF con CD (Complejo DSF-CD)

55

1.1.- Calorimetría diferencial de barrido

Aproximadamente 2 mg de DSF, HP- β -CD y Complejo DSF-CD elaborado por los tres métodos y en diferentes proporciones 1:1 y 1:2, equivalentes en contenido de DSF, se analizaron en el Centro de Investigación de Polímeros Avanzados de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción, Chile, mediante Calorimetría Diferencia de Barrido (DSC).

60

Las muestras fueron calentadas en pequeñas placas de aluminios semi-selladas, bajo un flujo de nitrógeno de 5 mL/minuto, en un rango de temperatura de 50°C a 330°C, a una velocidad de 5°C/minuto.

65

En la figura 2, el DSC del DSF (a), muestra dos picos endotérmicos, a los 73,25°C y 206,84°C. El primero corresponde al punto de fusión del medicamento y el segundo a la descomposición del mismo.

ES 2 348 887 A1

En el DSC de la HP- β -CD (b), se observa una leve deflexión a la altura de los 113,4°C que corresponde a la presencia de agua en la cavidad de la ciclodextrina, y uno a los 316,1°C que indica su descomposición.

5 En cada uno de los complejos elaborados por diferentes métodos y en diferentes proporciones moleculares, se observa un leve desplazamiento a temperaturas mayores de la señal de descomposición del fármaco puro, producto de efecto estabilizador de la CD asegurando una interacción fisicoquímica entre ambos compuestos.

10 Debido a la formación de complejo el pico del punto de fusión del DSF se ve desplazado a temperaturas mayores, por sobre los 280° C, temperatura a la cual comienza la descomposición de la CD.

15 En el caso de los complejos elaborados en una proporción 1:2, la interacción entre ambos compuestos es mayor debido a una desaparición completa del área y señal de fusión del fármaco alrededor de los 73°C. Esta reducción de área significa una reducción de la energía necesaria para la fusión del medicamento, debido a la ausencia de fármaco libre y a una posible complexación total del DSF.

1.2.- Resonancia Magnética Nuclear

20 Los espectros de ¹H (Protón) del C-DSF elaborado por el método de Spray drying en una proporción 1:1 y 1:2 fueron obtenidos en un Espectrofotómetro de RMN Bruker AC250 (250 MHz por 1 hr) en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción, Chile.

25 En la tabla N° 1 se observan mayores desplazamientos químicos tanto de la HP- β -CD como del DSF en el Complejo DSF-CD elaborado en una proporción DSF:HP- β -CD 1:2 en relación con el Complejo DSF-CD elaborado en una proporción 1:1.

TABLA N° 1

30 *Análisis espectral ¹H-RMN de DSF, HP- β -CD, Complejo DSF-CD (1:1) elaborado mediante Spray drying; Complejo DSF-CD (1:2) elaborado mediante Spray drying*

| Protón | DSF (ppm) | HP- β -CD (ppm) | C-DSF (1:1) (ppm) | | C-DSF (1:2) (ppm) | |
|------------------|-----------|-----------------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| | | | HP- β -CD | DSF | HP- β -CD | DSF |
| -CH ₃ | 1,284 | 1,125 | 1,115 | 1,292 | 1,091 | 1,278 |
| | | | -0,01* | +0,008* | -0,03* | -0,007* |
| -CH ₃ | 1,455 | 1,147 | 1,139 | 1,454 | 1,113 | 1,441 |
| | | | -0,008* | -0,001* | -0,035* | -0,014* |

* Desplazamientos

50 En la Tabla N° 2 se observa un desplazamiento de -0,270 ppm y -0,284 ppm para los carbonos C-1 y C-4 respectivamente en el Complejo DSF-CD elaborado en una proporción 1:2. En cambio en el caso del Complejo DSF-CD elaborado en una proporción 1:1, se observan desplazamientos menores de -0,009 y +0,002 ppm. que no son determinantes ya que se encuentran en el rango de sensibilidad del equipo.

55 Por otro lado los mayores desplazamientos a campo alto de los grupos -CH₂ del DSF (C-2 y C-3) en la proporción 1:2, puede indicar una posible interacción de estos grupos con la HP- β -CD.

60

65

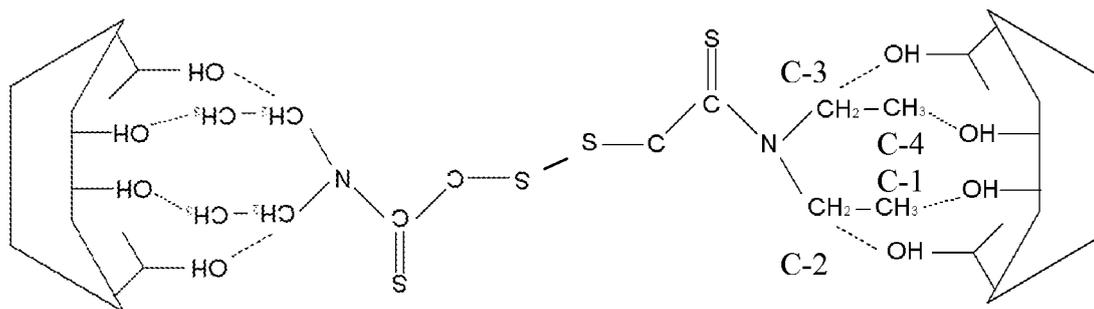
ES 2 348 887 A1

TABLA N° 2

Análisis espectral ^{13}C RMN DEPT 135 del DSF, HP- β -CD, Complejo DSF-CD (1:1) y Complejo DSF-CD (1:2)

| Carbono | DSF (ppm) | C-DSF (1:1) (ppm) | C-DSF (1:2) (ppm) |
|-------------------------|-----------|-------------------|-------------------|
| C-1 (-CH ₃) | 14,750 | 14,016 -0,009* | 14,044 -0,270* |
| C-4 (-CH ₃) | 12,640 | 11,909 +0,002* | 11,987 -0,284* |
| C-2 (-CH ₂) | 54,022 | 53,087 +0,935* | 52,997 +1,025* |
| C-3 (-CH ₂) | 49,656 | 48,662 +0,994* | 48,611 +1,045* |

De acuerdo a los resultados reportados, el complejo elaborado en mezcla en una proporción 1:2 (DSF/HP- β -CD) presenta una mayor interacción comparado con la proporción 1:1 en todos los estudios realizados. De acuerdo a lo señalado anteriormente en la siguiente figura se postula esquema de inclusión correspondiente a la Fórmula (II):



Fórmula (II)

La elaboración del Complejo DSF-CD en una mezcla en proporción 1:1 DSF:HP- β -CD independiente del método de elaboración, no permite confirmar el tipo de estequiometría del complejo formado, debido a que el sistema en este caso tenderá a equilibrarse con la formación de una mezcla de Complejo DSF-CD 1:1, 1:2 y DSF libre, lo que concuerda con lo indicado anteriormente en el DSC que demostró una disminución, pero no una desaparición completa del calor y señal de fusión del medicamento en el Complejo DSF-CD preparado en esta proporción.

1.3- Rayos X

La difracción de Rayos-X del DSF, de la HP- β -CD y del Complejo DSF-CD elaborado por diferentes métodos y en diferentes proporciones se realizó con un difractómetro *RIGAKU GEIGERFLEX*. Se utilizó un tubo de cobre con filtro de níquel, una radiación de 40 KW y 20 miliamperios en un ángulo comprendido entre un intervalo de 3 a 70°C (2θ) a una velocidad de 1°/min.

En la figura 3, los espectros de difracción del DSF puro (a) muestran una gran variedad de picos producto de la cristalinidad del fármaco, mientras que para la HP- β -CD (b) su espectro se presenta con ausencia de picos indicando su estado amorfo.

En los espectros de los complejos elaborados por los diferentes métodos y diferentes proporciones se observa una similitud con el espectro de la HP- β -CD, producto de la pérdida de la cristalinidad del fármaco puro gracias a la complexación con la ciclodextrina evidenciando la formación de un complejo de inclusión.

La presencia de picos en el espectro del complejo elaborado por Rotavapor en una proporción 1:1 indica la presencia de DSF libre debido a la falta de complexación completa del DSF, efecto que no se observa en los complejos elaborados en una proporción 1:2.

1.4- Espectroscopía Infrarroja

Se realizó espectroscopia infrarroja del DSF, HP- β -CD, mezcla física DSF:HP- β -CD (1:1) (proporción 1:1 en relación a sus pesos moleculares) y Complejo DSF-CD en un rango de 500 a 4.000 cm^{-1} mediante un espectrómetro Nicolet modelo Bexus, por el método de compresión directa con KBr. El análisis fue realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción, Chile.

Los espectros IR obtenidos experimentalmente para el DSF, HP- β -CD, mezcla física DSF:HP- β -CD (1:1) y Complejo DSF-CD se muestran en las figuras 4, 5, 6 y 7, respectivamente.

En el espectro del Complejo DSF-CD (Figura 7) aparece un desplazamiento en la frecuencia de la banda C-S del DSF de 1267 a 1280 cm^{-1} . La forma de esta banda es más amplia e intensa en el espectro del Complejo DSF-CD en comparación con la mezcla física DSF:HP- β -CD (1:1) (Figura 6), mientras que esta última mantiene un perfil de la misma banda similar a la del DSF con valores de frecuencia de 1266 y 1267 cm^{-1} respectivamente.

Lo señalado anteriormente también se presenta en la banda de C=S que en el DSF se ubica a una frecuencia de 1342 cm^{-1} coincidiendo con la mezcla física, mientras que en el Complejo DSF-CD se desplaza a los 1365 cm^{-1} .

En general, dentro de la zona de 2.000 a 1.000 cm^{-1} del espectro se pueden observar las diferencias que presentan los espectros de DSF e HP- β -CD. Las modificaciones del espectro del Complejo DSF-CD se encuentran principalmente bajo los 1500 cm^{-1} , más bien en la zona de la huella digital de la molécula.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente se puede señalar que se producen modificaciones en el espectro del Complejo DSF-CD, lo que respalda un fenómeno de interacción entre ambos compuestos.

1.5- Microscopía Electrónica de Barrido

Las microfotografías por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) de la HP- β -CD y del Complejo DSF-CD elaborado por diferentes métodos y en diferentes proporciones, se tomaron en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción, Chile.

No es posible obtener la micrografía del DSF y de la mezcla física, debido a que la metodología de análisis en la MEB utiliza temperaturas superiores a la temperatura de fusión del medicamento pasando a estado líquido durante el proceso.

Las muestras de polvo fueron dispersadas sobre una delgada placa de vidrio acondicionada sobre un cilindro de aluminio, para luego darles un baño de oro en el metalizador *Edwards 5150 Sputter Coster* y posteriormente fotografiadas en el equipo *Jeol modelo J-SM 6380 LV*.

Los estudios de microscopía electrónica de barrido (Figura 8) revelan un cambio en la morfología de las partículas dependiente del método de elaboración. En la fotografía (g) se puede apreciar la topografía de las partículas de HP- β -CD en polvo que presentan una forma esférica con un aspecto amorfo y superficies lisas. En el caso de los Complejos DSF-CD elaborados por Rotavapor se obtuvieron microcristales de forma irregular, a diferencia de los obtenidos por Spray drying de aspecto amorfo con forma esférica y superficies rugosas (Figura 9). En los Complejos DSF-CD elaborados por Liofilización se obtuvieron partículas de forma irregular con aspecto escamoso.

La MEB demuestra un cambio en la conformación estructural del complejo, indicando una interacción entre ambos compuestos.

1.6- Microscopía óptica con luz polarizada

Se tomaron fotografías del DSF y del Complejo DSF-CD, este último elaborado por Spray dried y Rotavapor. Pequeñas cantidades de cada muestra, se dispersaron por separado sobre un portaobjeto y se fotografiaron utilizando un microscopio óptico *METTLER FP 82* acondicionado con un polarizador *ORTHOLUXIIPOL-BK* y una cámara fotográfica *Cannon 42X*.

En la figura 10, fotografía (a), se puede apreciar que el DSF presenta una estructura cristalina lo que produce refracción al incidir luz polarizada sobre sus cristales. En el caso del Complejo DSF-CD elaborado tanto por Spray drying (b) se pierde esta propiedad posiblemente por la formación del complejo de inclusión que se presenta en un estado amorfo.

A modo de comparación se fotografió el Complejo DSF-CD elaborado por Rotavapor (c), el que presenta un comportamiento similar al Complejo DSF-CD elaborado por Spray drying. Sin embargo este fenómeno es menos marcado probablemente por la diferencia en el método de elaboración.

Si bien la microscopía óptica con luz polarizada por sí sola no es capaz de confirmar que se produce un complejo de inclusión, deja de manifiesto una interacción entre ambos compuestos.

ES 2 348 887 A1

2.- Caracterización farmacéutica del complejo de inclusión DSF con CD (Complejo DSF-CD)

Se realizó análisis de tamaño de partícula y estudios de solubilidad. En éste último se incluyen cinéticas de disolución y determinación de la solubilidad máxima del DSF complejoado, ambos cuantificados por un método validado por espectrofotometría Ultravioleta (UV).

2.1- Análisis de tamaño de partícula

El análisis de tamaño de partícula del Complejo DSF-CD elaborado por Spray drying en una proporción 1:1 y 1:2, fue determinado por medio de las fotografías obtenidas por MEB (figuras 8 y 9). Se determinó el diámetro de 110 partículas por medio de un programa estadístico computarizado.

El análisis de tamaño de partícula de DSF se realizó en el Centro de Estudios para el Desarrollo de la Química (CEPEDEC) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, por el método analítico de difracción de luz.

Se dispersaron alrededor de 2 mg de DSF en 50 mL de ciclohexano para luego sonicar por 5 seg. La muestra fue analizada en el contador de partículas *Mastersizer Malvern Instruments GmbH*.

Como muestra la figura 11 las curvas de distribución de los Complejos DSF-CD elaborados por Spray drying presentan una asimetría negativa hacia intervalos menores de 7-26 μm (Figura 11a), en donde existe un desplazamiento de sus partículas hacia tamaños menores, mientras que el DSF presenta una distribución de sus partículas concentradas en intervalos de tamaño mucho mayores, 7-83 μm (Figura 11b), que los primeros.

El menor tamaño de partícula del Complejo DSF-CD explica también su rápida velocidad de disolución, debido a que este parámetro es directamente proporcional a la superficie e inversamente proporcional al tamaño de partícula.

TABLA N° 3

Distribución del tamaño de partícula de diferentes muestras

| | 10% del volumen de las partículas se distribuyen por debajo de (μm) | 90% del volumen de las partículas se distribuyen por debajo de (μm) | Media distribución (μm) | Diámetro promedio (μm) |
|------------------------|--|--|--|---|
| DSF | 8,31 | 44,10 | 20,28 | 23,82 |
| Complejo DSF-CD | 2,49 | 15,80 | 8,77 | 9,13 |

2.2.- Estudio de solubilidad

2.2.1.- Solubilidad máxima del DSF complejoado

Se incorporó un exceso de DSF en 5 mL de HCl 0,1 N en matraces de 25 mL, protegidos de la luz con papel aluminio y en agitación constante durante 72 horas a $21 \pm 1,5^\circ\text{C}$ hasta alcanzar el equilibrio. Simultáneamente, el mismo proceso se llevó a cabo con el Complejo DSF-CD (en equivalentes de DSF) elaborado por diferentes métodos y en diferentes proporciones. Las muestras fueron filtradas por filtros Sartorius® de tamaño de poro 1,2 μm y acondicionadas para ser leídas a 254 nm por espectroscopia UV.

Los resultados fueron sometidos a análisis estadístico, a través de una prueba de t (t-student), mediante el programa Graph Pad software Prism 2.1. Cada muestra se realizó por triplicado con un peso de 300 mg de DSF.

La solubilidad del fármaco puro y sus complejos se muestran en la tabla N° 4 y en la figura 12.

ES 2 348 887 A1

TABLA N° 4

Solubilidad del DSF y de los diferentes Complejo DSF-CD en HCl 0,1 N

| | Solubilidad en HCl 0,1 N (mg/mL) ± S.E.M |
|----------------------------------|---|
| DSF | 0,1 ± 0,001 |
| Complejo DSF-CD Rotavapor 1:1 | 12,96 ± 0,3 |
| Complejo DSF-CD Rotavapor 1:2 | 18,32 ± 0,04 |
| Complejo DSF-CD Spray Drying 1:1 | 22,04 ± 0,1 |
| Complejo DSF-CD Spray Drying 1:2 | 26,93 ± 0,06 |
| Complejo DSF-CD Liofilizado 1:1 | 11,28 ± 0,03 |
| Complejo DSF-CD Liofilizado 1:2 | 15,50 ± 0,21 |

S.E.M: Error estándar medio.

El aumento de solubilidad de DSF utilizando HP-β-CD en HCl 0,1 N resultó extremadamente significativo ($p < 0,0001$) en cada uno de los casos estudiados, siendo siempre mayor en los Complejos DSF-CD elaborados en una proporción 1:2 en comparación a los elaborados en una proporción 1:1, independiente del método utilizado en su fabricación.

Los Complejos DSF-CD elaborados por Spray dried en una proporción tanto 1:1 y 1:2 mostraron un mayor aumento de solubilidad (equivalente a 220,4 y 296,3 veces mayor que la del fármaco puro, respectivamente), debido a que por medio de los sistemas de atomización se obtienen estructuras amorfas con pequeños tamaños de partículas, en comparación al Rotavapor y al Liofilizado que mantienen un cierto grado de cristalinidad.

2.2.4- Cinética de Disolución

Se desarrolló según las condiciones indicadas en la USP XXIV, utilizando un equipo disolutor Bahama St., Northridge dotado de 6 vasos, aparato 2: método de paleta, a una velocidad de 50 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 60 min. y utilizando un volumen de 900 mL de fase acuosa (HCl 0,1 N) a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Se tomaron muestras independientes durante el periodo señalado anteriormente con un sistema de muestreo fijo y automático con reposición de volumen manual. El sistema de muestreo está dotado de un filtro de tamaño de poro de $10 \mu\text{m}$ unido a un tubo de acero inoxidable, el que está conectado a un sistema de recepción de muestra (tubos de vidrio graduados hasta 10 mL) por medio de una manguera Tygon®.

El medicamento en estudio, se incorporó a la forma de polvo sobre el medio de disolución en agitación y temperatura del medio establecida, se esperó 1 minuto para su adecuada humectación, considerándose el término de éste como tiempo 0. Se muestrearon 5 mL en intervalos de 1, 3, 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60 minutos con reposición del medio. Se realizaron 7 perfiles de disolución, con un $n=6$, con una dosis equivalente a 1 g de DSF de las siguientes muestras:

- DSF
- C-DSF elaborado por Spray dried en una proporción 1:1 (C-DSF (1:1))
- C-DSF elaborado por Spray dried en una proporción 1:2 (C-DSF (1:2))
- Mezcla física preparada en una proporción 1:1 (MF 1:1)
- Mezcla física elaborada en una proporción 1:2 (MF 1:2)

En la figura 13 se resumen los resultados de la cinética de disolución de las diferentes muestras estudiadas. Como se puede observar, es notable el aumento del porcentaje y velocidad de disolución debido a la complexación del DSF en ciclodextrina (C-DSF), que muestra un máximo cercano al 44% y 100% para el C-DSF elaborado en una proporción 1:1 y 1:2, respectivamente, disuelto ya a los 3 minutos de iniciado el estudio en contraste a un 0,1% para el DSF en el mismo tiempo.

Las mezclas físicas elaboradas tanto en una proporción 1:1 y 1:2, presentan diferencias marcadas en cuanto a la velocidad de disolución y porcentaje de fármaco disuelto en comparación al complejo, lo que respalda una mayor interacción entre ambos compuestos cuando se someten a un proceso de atomización en fase líquida, con la consecuente complexación del fármaco.

ES 2 348 887 A1

3.- Caracterización farmacológica del complejo de inclusión DSF con CD (Complejo DSF-CD)

Para demostrar las diferencias en intensidad y duración del efecto farmacológico del DSF en su forma complejada de acuerdo a la presente invención, en relación al DSF en su forma libre, se midió la frecuencia cardíaca como un signo del efecto de la Reacción Etanol-Disulfiram (RED).

Por otra parte, para evaluar si este complejo administrado parenteralmente no produce daño tisular, se realizaron estudios histopatológicos en ratas.

Finalmente se realizaron estudios farmacocinéticos para determinar niveles plasmáticos de DSF y sus metabolitos dietilditiocarbamato y metil-dietilditiocarbamato (DDC y Me-DDC) lo que demostró que con el complejo se obtiene un mayor biodisponibilidad.

En todos estos estudios se utilizaron ratas machos, Sprague-Dawley, entre 250 a 300 gr de peso, con agua y alimento *ad-libitum*, con ciclos de luz-oscuridad (12:12 hrs) y temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.1. Evaluación de la reacción etanol-disulfiram

A las ratas se les monitoreó la RED, en base a signos conductuales: ventilación pulmonar, presencia de hipo, actividad locomotora y se cuantificaron los signos de acuerdo a la siguiente escala:

0 = Ausencia del signo

1 = leve

2 = moderado

3 = severo

El efecto cardiovascular se monitoreó a través de un registro electrocardiográfico.

Se realizaron los siguientes controles:

- Control Basal;

- Control, realizado después de la administración subcutánea de de 15 mg/Kg de DSF libre o Complejo DSF-CD, disuelto en 0,5 mL de suero fisiológico;

- Control RED, realizado después de la administración intraperitoneal de 1 g/Kg de alcohol de 96°, diluido al 50% en agua. Este control se realizó en los siguientes tiempos: 1, 8,12,24,48, 72, 96,120 y 168 hrs, después de la administración de DSF.

Los resultados conductuales de la RED están expresados a la forma de promedio en la Tabla N° 5, donde se observa que los signos son mayores en las ratas administradas con DSF a la forma de complejo (Complejo DSF-CD) que a la forma libre, especialmente en los controles realizados a las 24 y 96 horas. La duración e intensidad de los signos se analizaron mediante análisis de varianza, seguido del Test de Tukey, resultando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre: SF (suero fisiológico) v/s DSF, SF v/s Complejo DSF-CD y DSF v/s Complejo DSF-CD, a las 24 horas.

La figura 14 muestra los efectos en la frecuencia cardíaca observados después de la administración de alcohol en ratas tratadas con DSF. En la figura A se observa una marcada disminución de la frecuencia cardíaca con la administración de Complejo DSF-CD, probablemente debido al predominio de la inhibición de la dopamina- β -hidroxilasa por las altas concentraciones de DDC en sangre. El DSF libre no produce mayores modificaciones. En la figura B la bradicardia obtenida con la administración de Complejo DSF-CD disminuye y el DSF libre experimenta una leve taquicardia. En la figura C el Complejo DSF-CD produce taquicardia y el DSF produce leve modificación de la frecuencia cardíaca. En la figura D, el Complejo DSF-CD produce taquicardia y el DSF libre leve bradicardia. En la Figura E, el Complejo DSF-CD produce un aumento de la frecuencia cardíaca y el DSF libre no presenta grandes variaciones. En la Figura F, tanto el DSF libre como el Complejo DSF-CD no producen variaciones de la frecuencia cardíaca, debido que ya no existirían niveles plasmáticos del fármaco y/o sus metabolitos.

En todos los tiempos estudiados el efecto del Complejo DSF-CD es mayor que en el DSF libre. El análisis estadístico se realizó mediante la comparación de pendientes entre DSF y Complejo DSF-CD, a través del test de Student, proporcionando un valor- $p < 0,001$ para el control de una hora.

TABLA N° 5: Efecto de la administración i. p. de 1 gr/Kg de etanol (96° al 50% con agua destilada), en diferentes tiempos, en ratas tratadas previamente con suero fisiológico (SF), DSF, en dosis de 15 mg/Kg por vía S.C., libre (DSF) o a la forma de complejo (denominado en la Tabla N° 5 CDSF).

| OBSERVACIONES Desde 5 a 30 min | ANTES DE ETANOL | | PROMEDIO DE LA INTENSIDAD DE LAS RESPUESTAS POST-ADMINISTRACION DE ETANOL, EN RATAS PRETRATADAS CON SUERO FISIOLÓGICO (SF), DISULFIRAM LIBRE (DSF) O DISULFIRAM A LA FORMA DE COMPLEJO (CDSF) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------|-----|---|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|----|-----|------|
| | Naive | | 8 | | | | 24 | | | | 48 | | | | 72 | | | | 96 | | | | 120 | | | | 168 | | | |
| | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF | SF | DSF | CDSF |
| 5 min | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 0.7 | 0.3 | 1 | 1.4 | 2 | 0.8 | 1 | 1.3 | 1.7 | 1 | 0.8 | 0.7 | 0.6 | 1.3 | 1 | 1.3 | 1 | 1.3 | 1 | 1.3 | 1 | 0.3 | 0.7 | | | |
| 10 min | 0 | 0 | 0 | 1 | 0.7 | 1 | 0.5 | 1.6 | 2.8 | 1.5 | 2.3 | 1.3 | 1.3 | 1.7 | 1.2 | 1 | 0 | 1.3 | 1.3 | 2 | 0.7 | 0.7 | 0.3 | 0.3 | 0.3 | | | | | |
| 15 min | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.5 | 1.4 | 3 | 1.5 | 1.5 | 1.7 | 1.7 | 2 | 0.8 | 1.7 | 0.2 | 1.7 | 1.3 | 2 | 1 | 0.7 | 0.7 | 0.7 | | | | | | |
| 20 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 0 | 0.8 | 1.4 | 2.6 | 1.3 | 1.5 | 1.7 | 1.3 | 2 | 0.4 | 1.3 | 0 | 1.7 | 1 | 2 | 1 | 1.3 | 0.7 | 0.7 | | | | | | |
| 25 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 1.2 | 2.4 | 1.3 | 1.8 | 1.7 | 1.3 | 1.3 | 0.8 | 1 | 0.4 | 1.3 | 1 | 1.3 | 1 | 1.3 | 0.7 | 0.7 | | | | | | |
| 30 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 1.2 | 2.4 | 1.5 | 1.8 | 1.7 | 1 | 2 | 0.6 | 0.8 | 1.4 | 1 | 1.3 | 1 | 1.3 | 0.7 | 0.7 | | | | | | | |
| Hipo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 0.7 | 0 | 0 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 10 min | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 0 | 0.7 | 0 | 0 | 0.4 | 0 | 0.3 | 0 | 0.3 | 0 | 0.3 | 0 | 0 | 0.3 | 0 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 15 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 0 | 0 | 0.2 | 0 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 20 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 0 | 0.2 | 0.2 | 0 | 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 25 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.5 | 0.5 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| 30 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | 0 | 0.8 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | |
| Actividad Locomotora | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 0.7 | 0.4 | 0.4 | 0.8 | 0.5 | 0 | 0.3 | 0.3 | 1 | 1.7 | 1 | 0.7 | 0.3 | 1 | 0.3 | 0.7 | 1 | 0 | | | | | | |
| 10 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 0.7 | 0.8 | 1.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | 0.3 | 1 | 1 | 0.7 | 1.7 | 0 | 0.3 | 1 | 0 | | | | | | |
| 15 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 0.4 | 0.6 | 0 | 0 | 0.7 | 0.3 | 0.3 | 0.4 | 1.7 | 0.8 | 1.3 | 0.3 | 1.7 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 20 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.7 | 0.2 | 0.4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.3 | 1.2 | 1.3 | 0.3 | 1.7 | 0 | 0.3 | 0 | 0 | | | | | | |
| 25 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0 | 0 | 0.3 | 0 | 0 | 0.2 | 1.7 | 0.8 | 0.3 | 0.7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 30 min | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.2 | 0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.4 | 1.7 | 0.6 | 0 | 0.3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |

ES 2 348 887 A1

3.2. Evaluación de la intensidad inflamatoria en la zona de administración: estudio histopatológico

Se obtuvieron biopsias después de la administración subcutánea de 15 mg/Kg de DSF libre y de Complejo DSF-CD, disuelto en 0,5 mL de suero fisiológico y se compararon con el grupo control al cual se le administró suero fisiológico.

Se obtuvieron muestras de piel en el sitio de la inyección a las 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 hrs post-inyección. Estas muestras fueron sometidas a la tinción de Eosina/Hematoxilina y se evaluó la presencia de hiperqueratosis, desestructuración de fibras colágenas, presencia de fibroblastos y células inflamatorias, congestión capilar del plexo superficial y profundo, edema en dermis y hemorragia en subcutis.

Estos signos se cuantificaron de acuerdo a la siguiente escala:

0 = Ausencia del signo

15

1 = leve

2 = moderado

20

3 = severo

Se analizó presencia o ausencia de respuesta e intensidad de respuesta, aplicando el test exacto de Fisher.

La Tabla N° 6 muestra el efecto de DSF libre, C-DSF y su control SF sobre el daño histopatológico inducido después de la administración subcutánea.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 6. Efecto de la Administración subcutánea de DSF sobre la piel de ratas (CDSF corresponde al Complejo DSF-CD).

| Tratamiento | Hiperqueratosis | Desestructuración de fibras colágenas | Fibroblastos | Células inflamatorias | Congestión plexo superficial | Congestión plexo profundo | Edema Dermis | Hemorragia Dermis | Promedio |
|-------------|-----------------|---------------------------------------|--------------|-----------------------|------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------|----------|
| SF-8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2,3 | 0 | 0 | |
| DSF-8 | 0 | 0,7 | 0 | 0,3 | 0 | 2,7 | 0,3 | 0,7 | 0,59 |
| CDSF-8 | 0 | 0,3 | 0 | 0,7 | 1,7 | 2,7 | 1 | 0,7 | 0,89 |
| SF-24 | 0,3 | 0,3 | 0,7 | 0,3 | 0,3 | 1 | 0 | 0 | |
| DSF-24 | 0 | 1,7 | 0 | 3 | 2 | 3 | 1 | 2,7 | 1,2 |
| CDSF-24 | 0 | 0,3 | 0 | 1,3 | 0,7 | 1 | 0,3 | 0,3 | 0,7 |
| SF-48 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 1 | 1,3 | |
| DSF-48 | 0 | 1,7 | 0 | 2,7 | 0,7 | 1,7 | 1,3 | 1,7 | |
| CDSF-48 | 0 | 0,3 | 0 | 1,7 | 0 | 0,7 | 0,3 | 1,3 | |
| SF-72 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1,3 | 0 | 1 | |
| DSF-72 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2,7 | 0 | 1,7 | |
| CDSF-72 | 0 | 0 | 0 | 2,7 | 0 | 2 | 0,7 | 1 | |
| SF-96 | 0,3 | 0 | 0 | 1,7 | 0 | 1,7 | 0 | 1 | |
| DSF-96 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2,7 | 0 | 1 | |
| CDSF-96 | 0 | 0,3 | 0 | 1,3 | 0 | 1 | 0,3 | 0,3 | |
| SF-120 | 0 | 0 | 1 | 0,3 | 0 | 1,7 | 0 | 0 | |
| DSF-120 | 0 | 0,7 | 0 | 1,7 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| CDSF-120 | 0 | 0,3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0,3 | 0,7 | |
| SF-144 | 0 | 0 | 0 | 0,3 | 0 | 1,3 | 0 | 0,7 | |
| DSF-144 | 0,3 | 0,7 | 0 | 1,3 | 0 | 2,7 | 0 | 1,3 | |
| CDSF-144 | 0 | 0,7 | 0 | 2 | 0,3 | 1,3 | 0 | 1,3 | |
| SF-168 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1,3 | 0 | 0,3 | |
| DSF-168 | 0 | 0,3 | 0 | 0 | 0 | 0,7 | 0 | 0 | |
| CDSF-168 | 0 | 0 | 1 | 1,7 | 0 | 2 | 0 | 0,7 | |

La Figura 15 muestra los resultados histológicos después de 8 horas de administración de DSF. El DSF libre induce una hiperemia severa en el plexo vascular profundo con hemorragia en hipodermis y con el Complejo DSF-CD se observa hiperemia moderada y severa del plexo vascular superficial y profundo, respectivamente, con presencia de células inflamatorias. En el grupo control, inyección de SF, se observa hiperemia severa en ambos plexos vasculares.

La Figura 16 muestra los resultados histológicos después de 24 horas de administración de DSF. El DSF libre induce hiperemia severa de ambos plexos, abundante presencia de células inflamatorias y hemorragia en hipodermis y con el Complejo DSF-CD se observa hiperemia leve de ambos plexos, leve presencia de células inflamatorias, muy poco edema y hemorragia en hipodermis. En el grupo control, inyección de SF, se observa hiperemia moderada del plexo vascular profundo y moderada presencia de las células inflamatorias.

La Figura 17 muestra los resultados histológicos después de 48 horas de administración de DSF. El DSF libre induce severa desestructuración de las fibras colágenas, hiperemia del plexo vascular profundo y moderada hemorragia en hipodermis y con el Complejo DSF-CD se observa moderada desestructuración de las fibras colágenas, hiperemia del plexo vascular profundo y hemorragia en hipodermis. En el grupo control, inyección de SF, se observa moderada presencia de células inflamatorias e hiperemia del plexo vascular profundo.

La Figura 18 muestra los resultados histológicos después de 72 horas de administración de DSF. El DSF libre induce hiperemia moderada de ambos plexos, con moderada presencia de células inflamatorias y hemorragia en hipodermis y con el Complejo DSF-CD se observa hiperemia moderada del plexo vascular profundo y severa presencia de células inflamatorias. En el grupo control, inyección de SF, se observa moderada hiperemia con leve presencia de células inflamatorias.

La Figura 19 muestra los resultados histológicos después de 96 horas de administración de DSF. El DSF libre induce hiperemia moderada del plexo vascular profundo, con hemorragia en hipodermis y severa presencia de células inflamatorias y el Complejo DSF-CD se observa hiperemia moderada del plexo vascular profundo con leve presencia de células inflamatorias, neutrófilos en diapédesis y edema en dermis. En el grupo control, inyección de SF, se observa hiperemia leve del plexo vascular profundo.

La Figura 20 muestra los resultados histológicos después de 120 horas de administración de DSF. El DSF libre induce hiperemia moderada del plexo vascular profundo, con leve presencia de células inflamatorias y desestructuración de fibras colágenas y con el Complejo DSF-CD se observa leve hiperemia del plexo vascular profundo, presencia de células inflamatorias y hemorragia en hipodermis. En el grupo control, inyección de SF, se observa leve hiperemia del plexo vascular profundo, con escasa presencia de fibroblastos.

La Figura 21 muestra los resultados histológicos después de 144 horas de administración de DSF. El DSF libre induce hiperemia moderada del plexo vascular profundo y escasa presencia de células inflamatorias y con el Complejo DSF-CD se observa escasa hiperemia de ambos plexos con moderada presencia de células inflamatorias. En el grupo control, inyección de SF, se observa leve hiperemia del plexo vascular profundo.

La Figura 22 muestra los resultados histológicos después de 168 horas de administración de DSF. El DSF libre induce hiperemia moderada del plexo vascular profundo y con el Complejo DSF-CD se observa hiperemia del plexo vascular profundo con moderada hemorragia en subcutis y abundante presencia de fibroblastos. En el grupo control, inyección de SF, se observa hiperemia de los plexos vasculares superficial y profundo.

3.3. Estudio farmacocinético

Se obtuvieron muestras de sangre de ratas, después de la administración subcutánea de 15 mg/Kg de DSF libre y de Complejo DSF-CD disuelto en 0,5 mL de SF y se compararon con el grupo control al cual se le administró SF.

Las muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando como columna RP-18 y la composición de la fase móvil fue acetonitrilo/agua (60:40 v/v). La fase móvil fue filtrada (filtro de membrana de 0,45 μ m) y desgasificada. El flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección 30 μ L. El rango de detección se extendió entre los 200 y 300 nm. Todos los análisis se realizaron a 25°C (\pm 1°C).

Se prepararon soluciones estándar de Me-DDC (Metil-Dietiltiocarbamato), Et-DDC (Etil-Dietiltiocarbamato) y DSF de 1 mg/mL disolviendo 10 mg de cada compuesto por separado, completando a 10 mL con acetonitrilo. De este se obtuvo una concentración de 10 μ g/mL. A cada solución del ensayo se agregó 0,25 mL de 10 μ g/mL de Pr-DDC (Propil-Dietiltiocarbamato), obteniendo una concentración de 0,25 μ g/mL de estándar interno.

Las muestras de plasma se recargaron con una cantidad conocida de Me-DDC, DDC y DSF. A 500 μ L de plasma se adicionaron 500 μ L de una solución de EDTA 0,01 M, NaCl 1%, pH 8,5 y 5 μ L de yoduro de etanol, se aplicó vortex por 30 seg. y se dejó reaccionar por 30 minutos a 40°C. Luego se adicionó 12,5 μ L de estándar interno (Pr-DDC). Posteriormente fueron sometidas a extracción en fase sólida.

Las columnas fueron colocadas en un equipo distribuidor de vacío de 12 puntas conectado a una bomba de vacío.

ES 2 348 887 A1

Las columnas se acondicionaron con 1.000 μL de acetonitrilo, seguido por 1.000 μL de agua nanopura, posteriormente la muestra fue agregada a la columna. Cuando las muestras fueron pasadas a través de las columnas, el Me-DDC, Et-DDC, DSF y Pr-DDC se retuvieron. Para eliminar impurezas, las columnas se lavaron con 3.000 μL de agua nanopura. El Me-DDC, Et-DDC y Pr-DDC se eluyeron de la columna con 1.000 μL de acetonitrilo. El DSF no se pudo extraer de las muestras de plasma.

De la solución eluída se inyectaron 30 μL en la columna cromatográfica.

La Figura 23 muestra los resultados obtenidos después de la administración subcutánea de disulfiram. El área bajo la curva es claramente mayor después de la administración de Complejo DSF-CD.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de inclusión formado por disulfiram y por hidroxipropil- β -ciclodextrina en la proporción 1:2 **caracterizado** porque tiene los siguientes desplazamientos químicos en el espectro de ^1H -RMN:

| Protón | Complejo DSF:HP- β -CD (1:2) ppm | |
|------------------|--|-------|
| | HP- β -CD | DSF |
| -CH ₃ | 1,091 | 1,278 |
| -CH ₃ | 1,113 | 1,441 |

2. Un complejo de inclusión formado por disulfiram y por hidroxipropil- β -ciclodextrina de acuerdo a la reivindicación 1 **caracterizado** porque además presenta los siguientes desplazamientos químicos en el espectro ^{13}C -RMN:

| Carbono | Complejo DSF:HP- β -CD (1:2) ppm |
|-------------------------|--|
| C-1 (-CH ₃) | 14,044 (-0,270) |
| C-4 (-CH ₃) | 11,987 (+0,284) |
| C-2 (-CH ₂) | 52,997 (+1,025) |
| C-3 (-CH ₂) | 48,611 (+1,045) |

3. Un procedimiento para preparar un complejo de inclusión de acuerdo a la reivindicación 1 **caracterizado** porque se realiza en rotavapor y comprende las siguientes etapas:

1. mezclar en forma física hidroxipropil- β -ciclodextrina y disulfiram;
2. disolver dicha mezcla en alcohol absoluto;
3. evaporar completamente el solvente en un rotavapor con una temperatura de baño de 60°C a una velocidad de 160 rpm y con un vacío de 80 mm Hg ($3,83 \times 10^{-3}$ MPa);
4. etapa de secado en estufa a 45°C por 48 horas.

4. Un procedimiento para preparar un complejo de inclusión de acuerdo a la reivindicación 1 **caracterizado** porque dicho complejo se obtiene por spray-dried y comprende las siguientes etapas:

- a) mezclar en forma física hidroxipropil- β -ciclodextrina y disulfiram;
- b) disolver dicha mezcla en alcohol absoluto;
- c) atomizar la solución obtenida en un aparato Büchi B-290, con una temperatura de entrada de 85°C, velocidad de bomba peristáltica 35%, bomba de extracción 70%.

5. Un procedimiento para preparar un complejo de inclusión de acuerdo a la reivindicación 1 **caracterizado** porque consiste en liofilizar dicho complejo con una temperatura de congelamiento de -80°C, a una temperatura de sublimación de -54°C y un vacío de 135×10^{-3} mbar (0,01 MPa).

6. Composición farmacéutica **caracterizada** porque comprende un complejo de inclusión formado por disulfiram y por hidroxipropil- β -ciclodextrina, de acuerdo a la reivindicación 1.

7. Composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 6 **caracterizada** porque es una composición sólida.

ES 2 348 887 A1

8. Composición farmacéutica de acuerdo a la reivindicación 6 **caracterizada** porque es una composición líquida.

9. Uso de un complejo de inclusión de acuerdo a la reivindicación 1 **caracterizado** porque sirve para preparar un medicamento destinado a tratar la dependencia de alcohol.

5

10. Uso de un complejo de inclusión de acuerdo a la reivindicación 1 **caracterizado** porque sirve para preparar un medicamento destinado a tratar la dependencia de cocaína.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

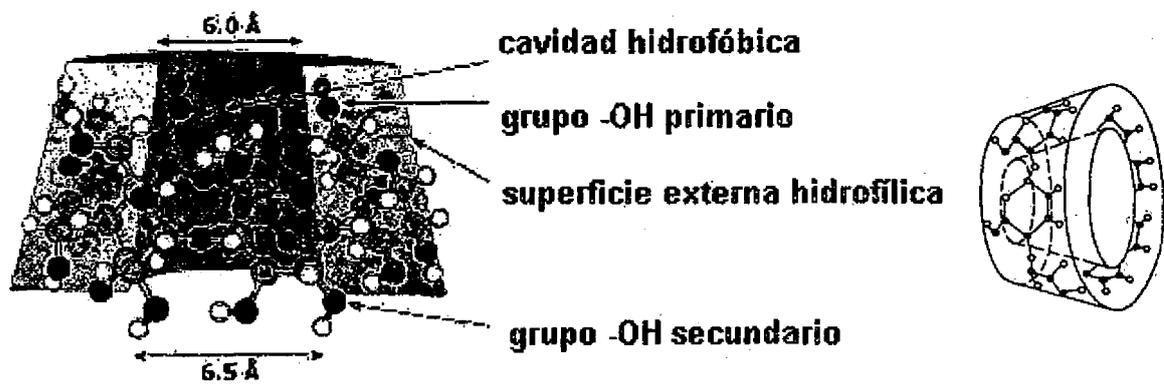


FIGURA 2

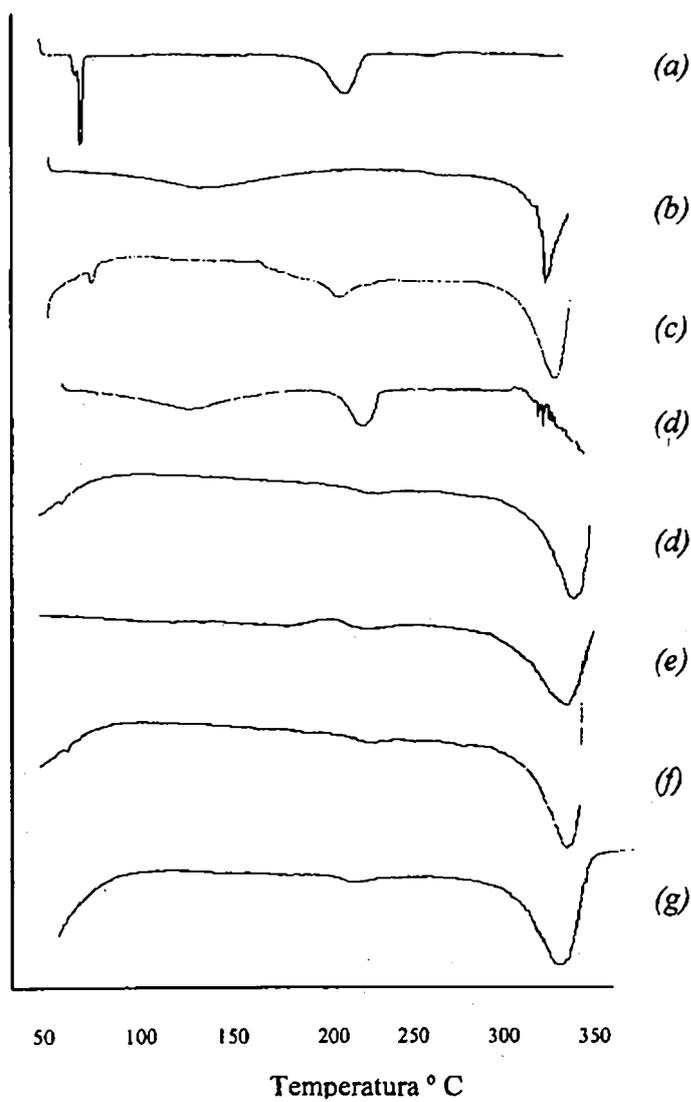


FIGURA 3

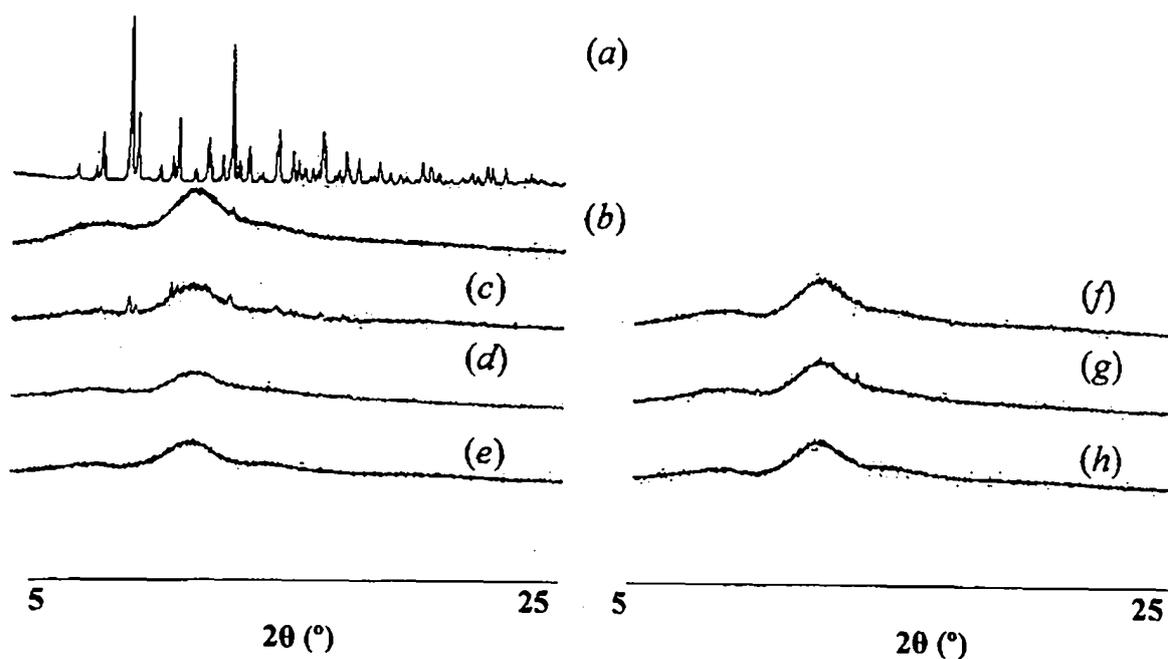


FIGURA 4

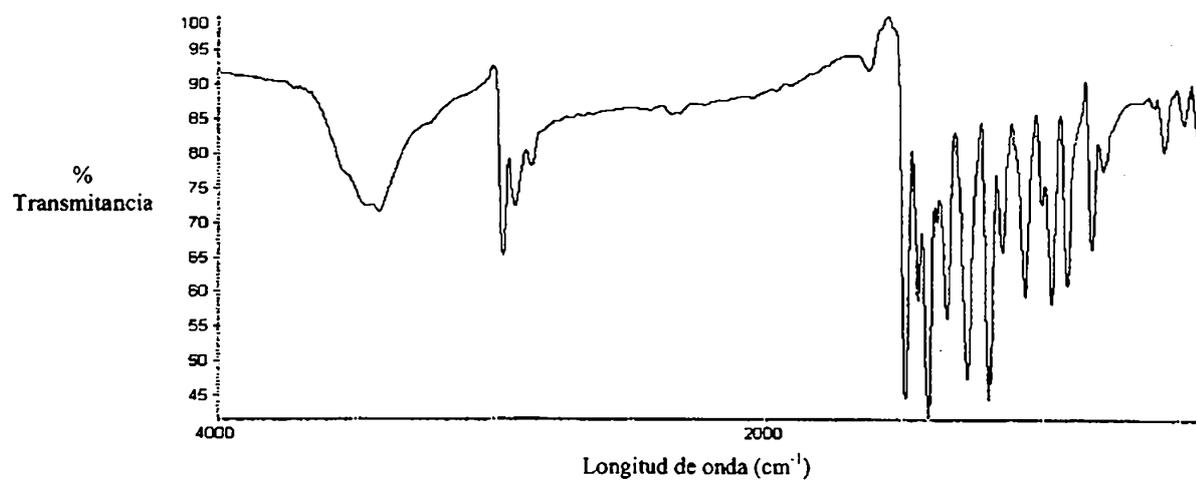


FIGURA 5

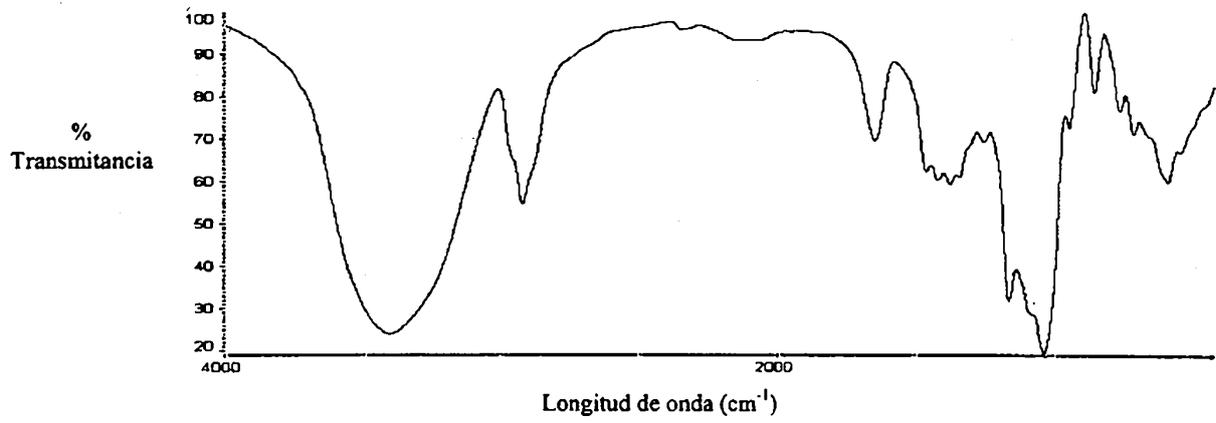


FIGURA 6

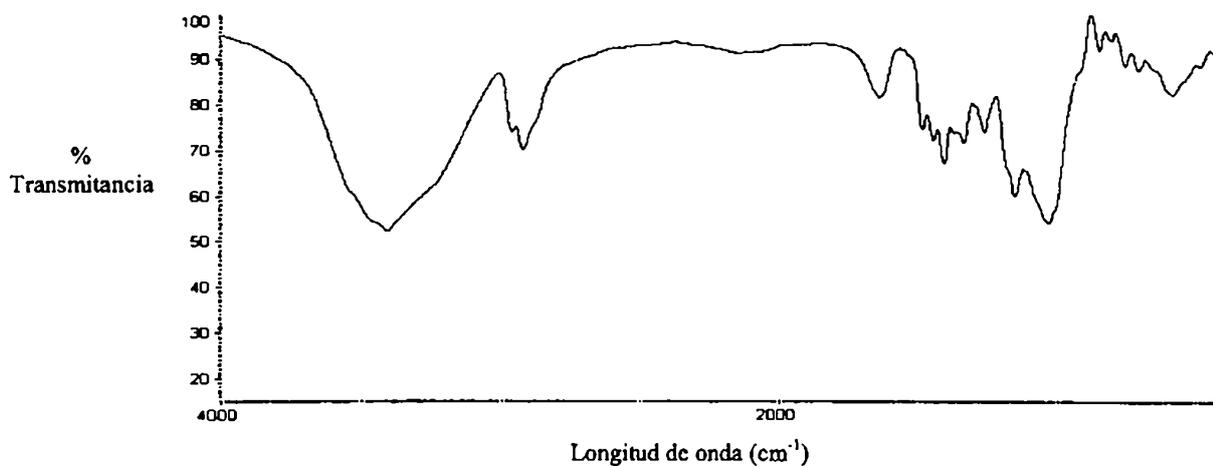


FIGURA 7

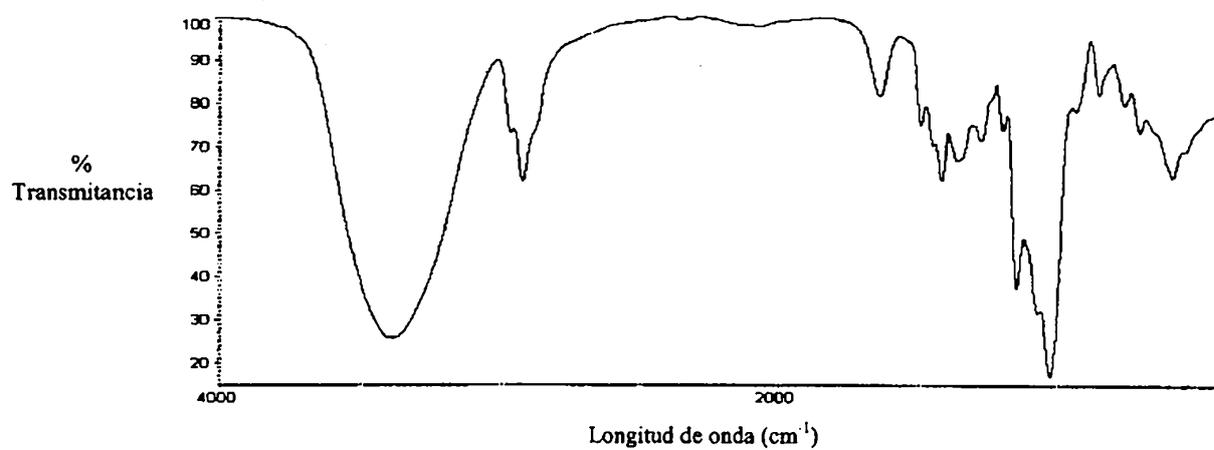


FIGURA 8

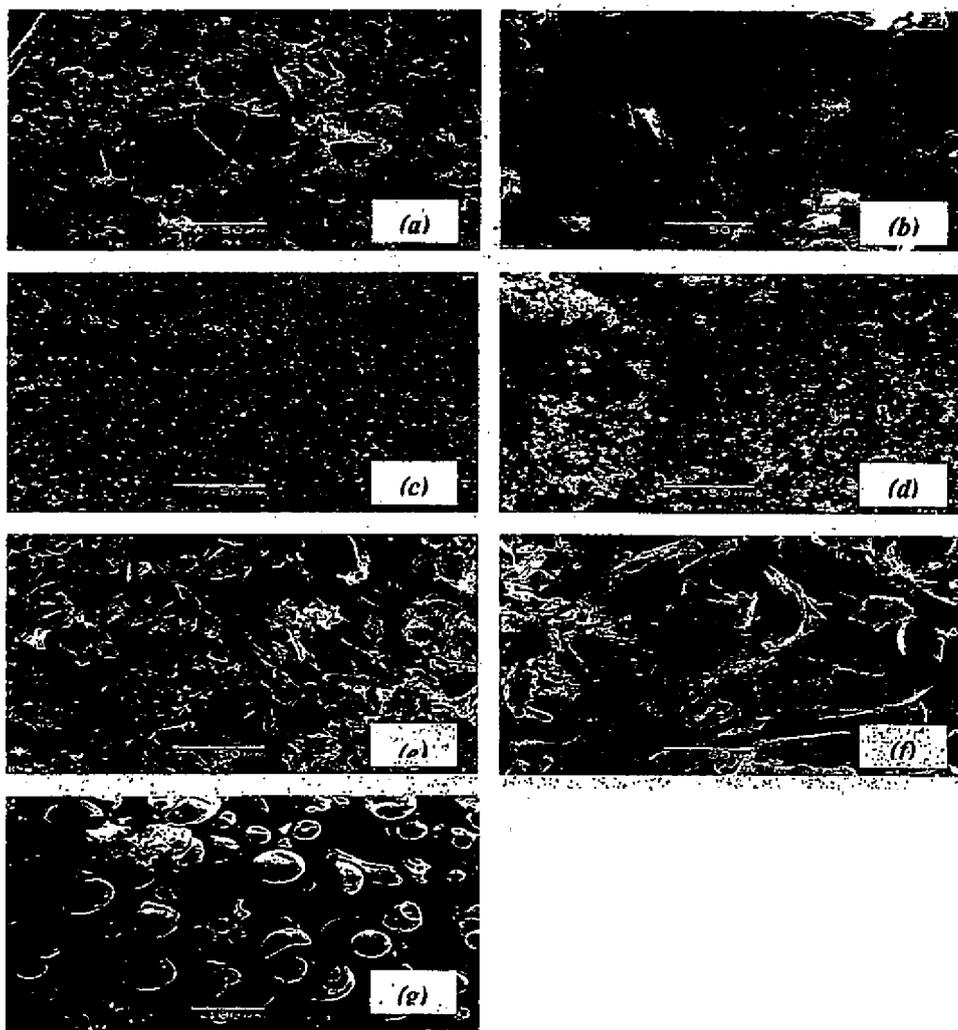


FIGURA 9

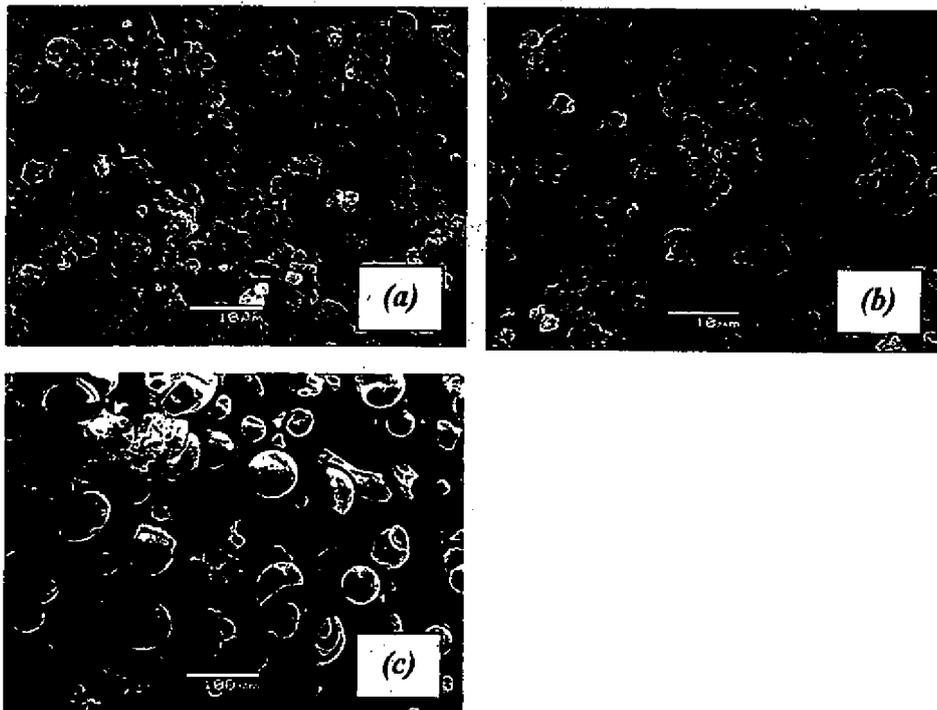


FIGURA 10

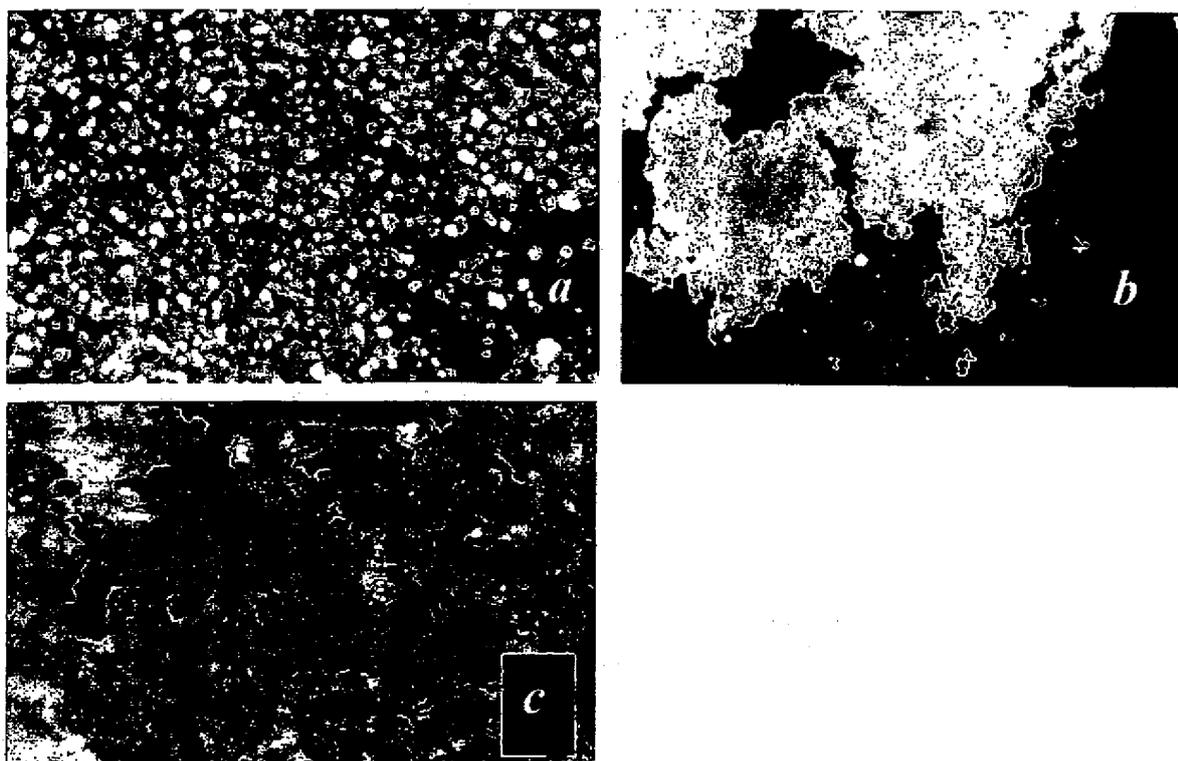


FIGURA 11

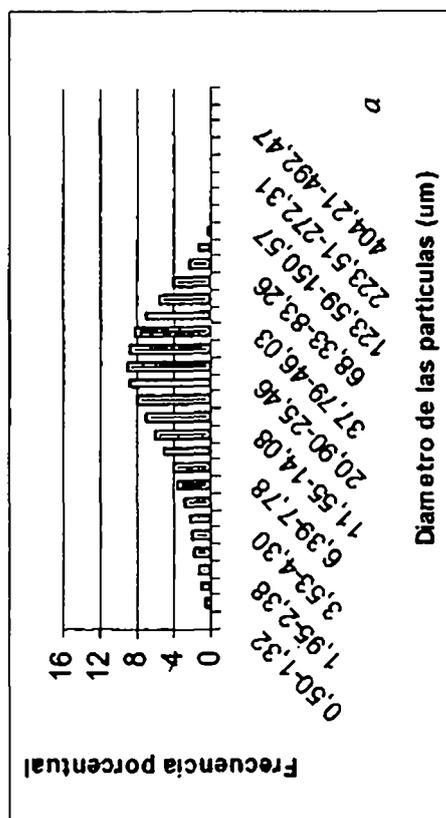
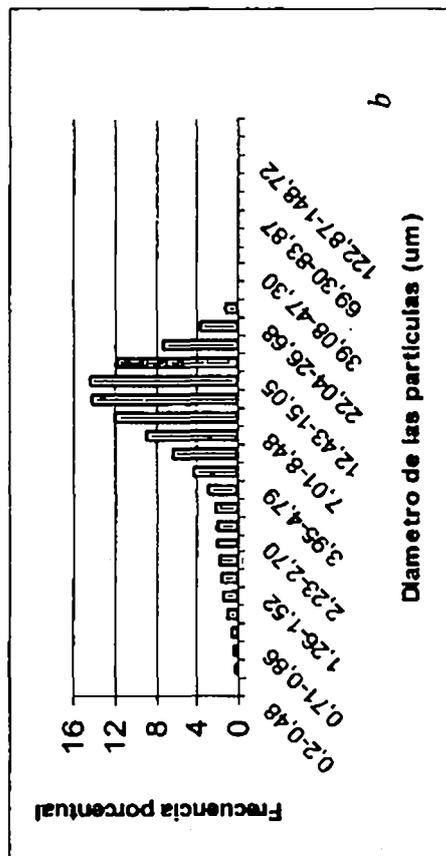


FIGURA 12

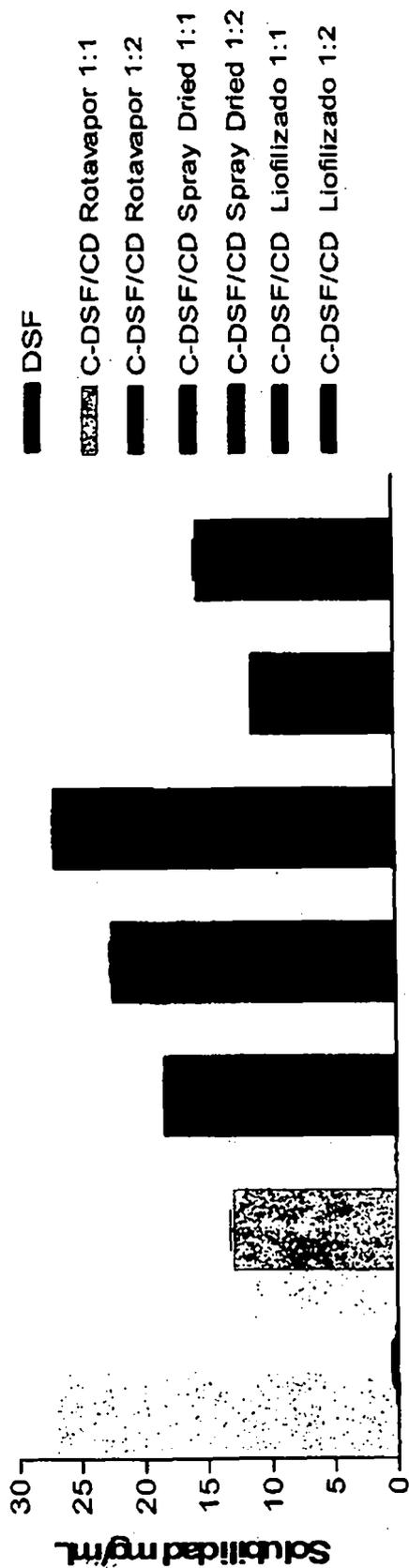


FIGURA 13

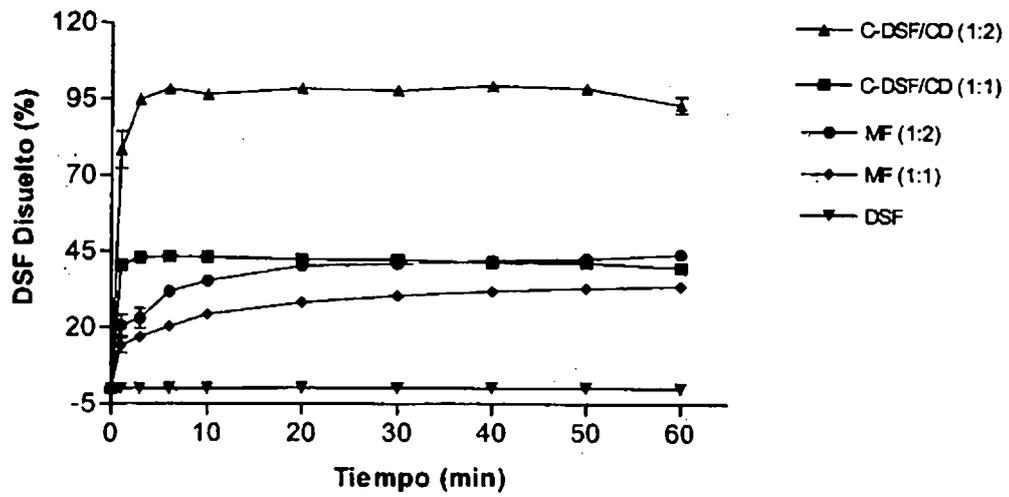


FIGURA 14

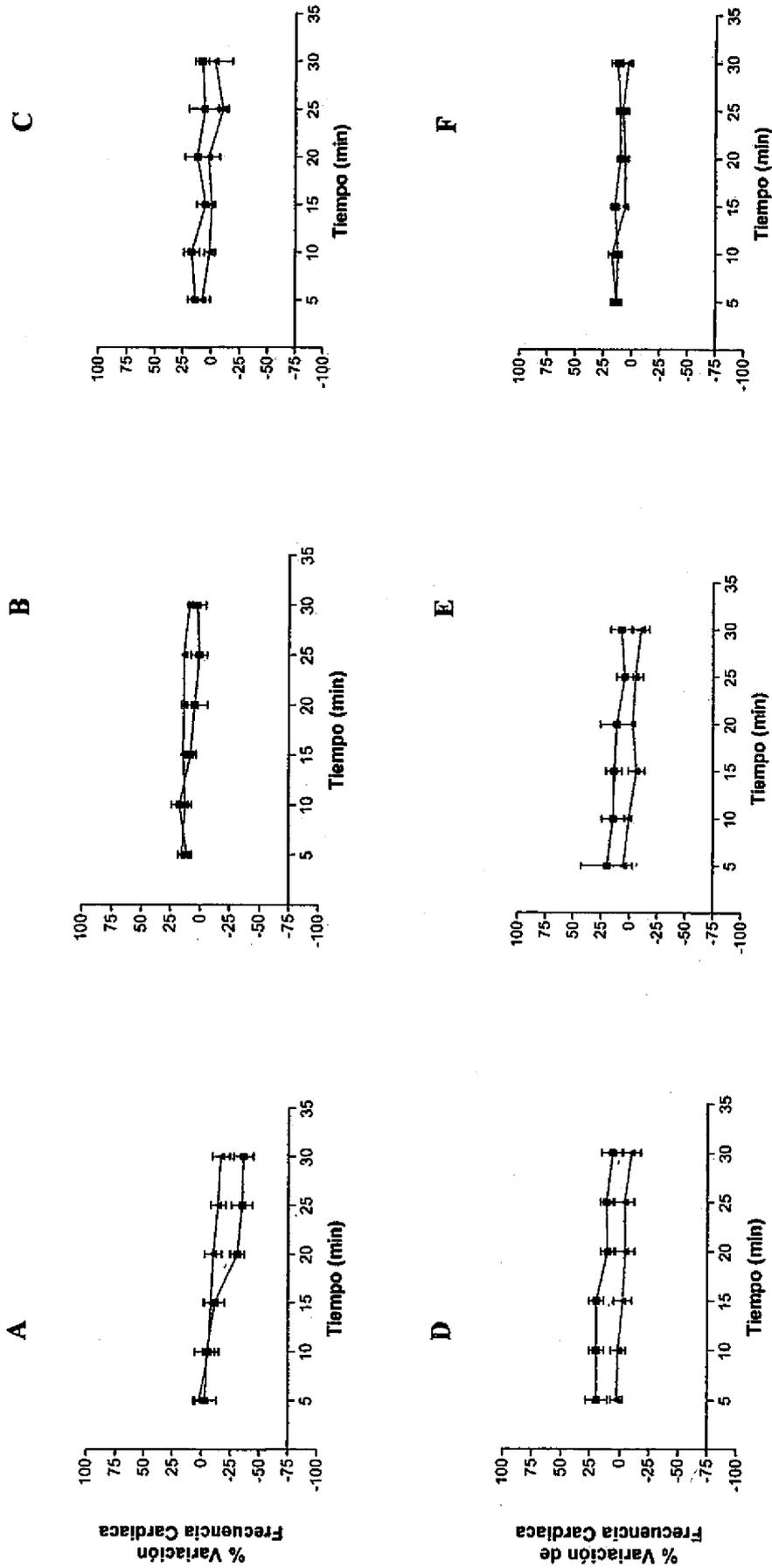
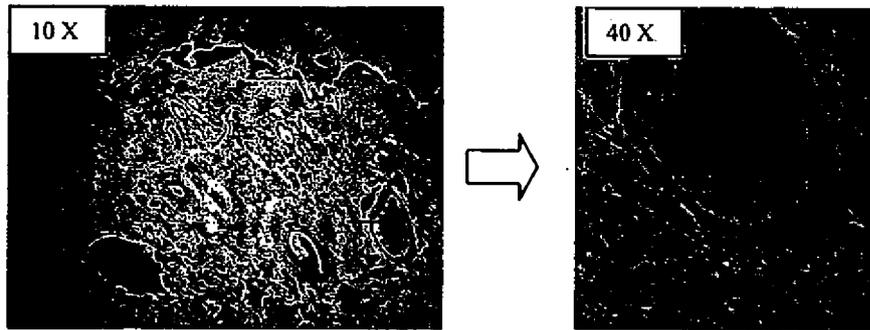
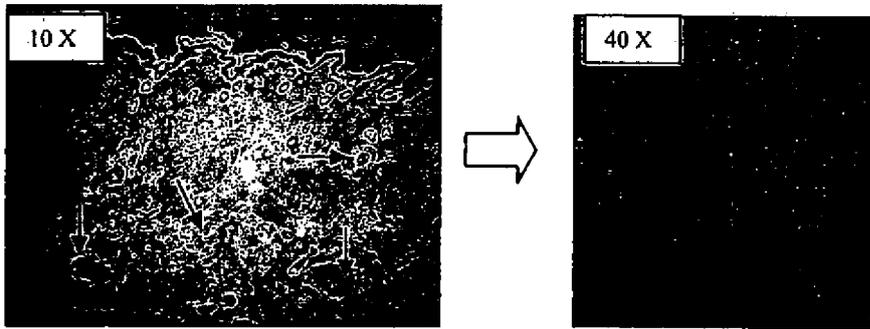


FIGURA 15

A.



B.



C.

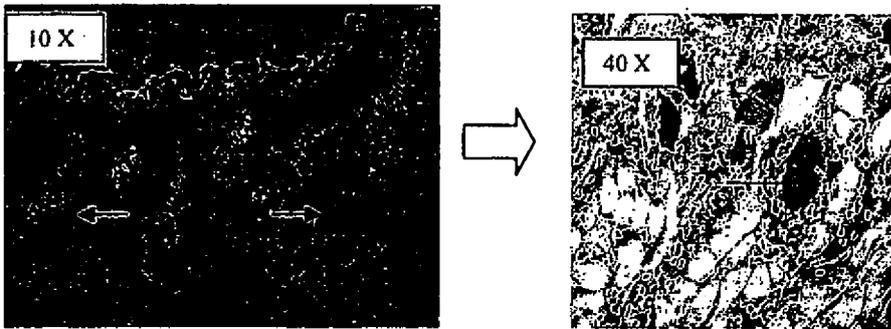
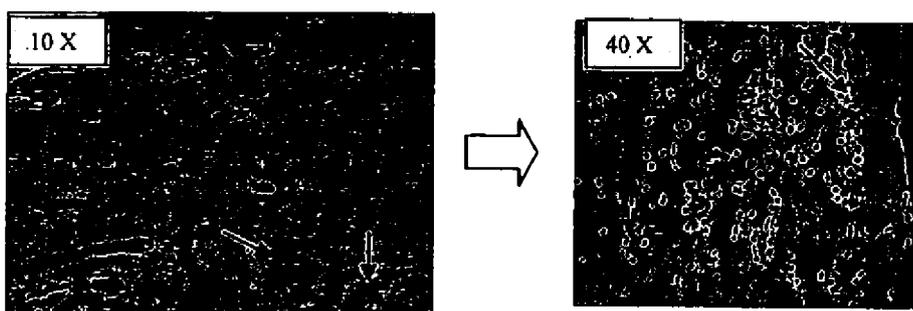
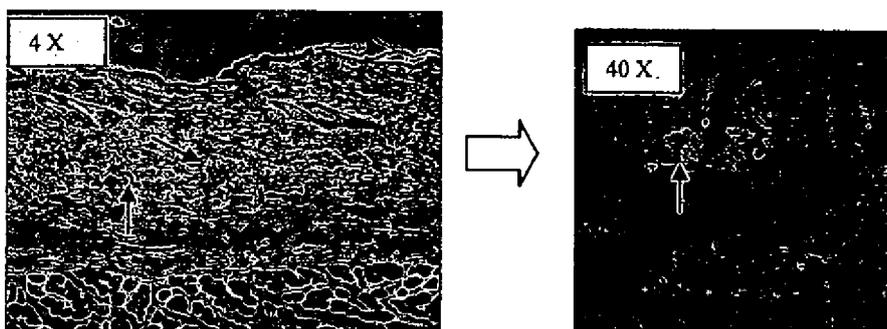


FIGURA 16

A.



B.



C.

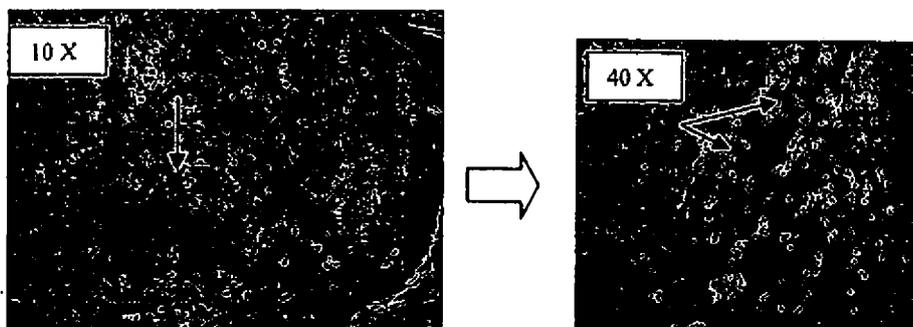


FIGURA 17

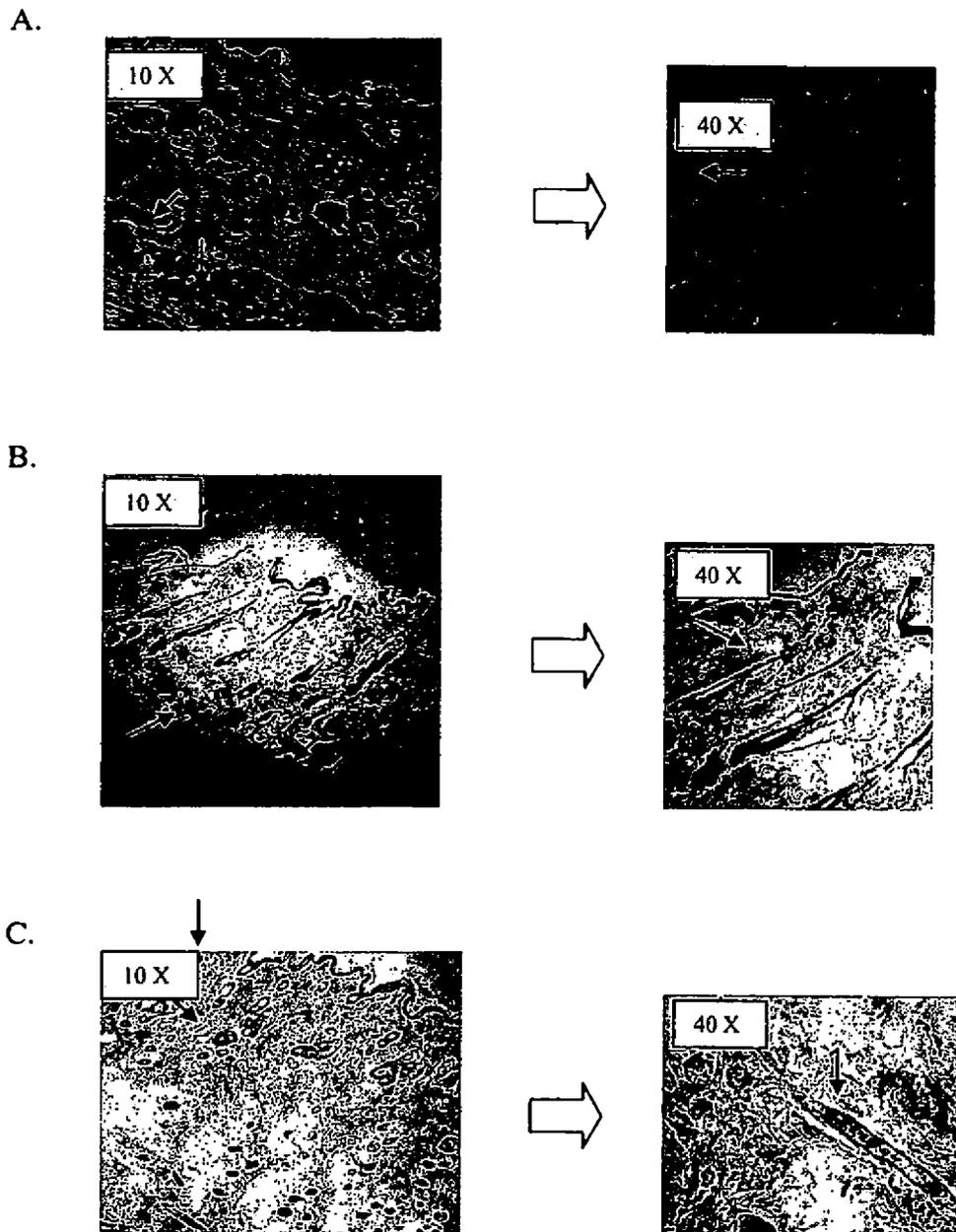


FIGURA 18

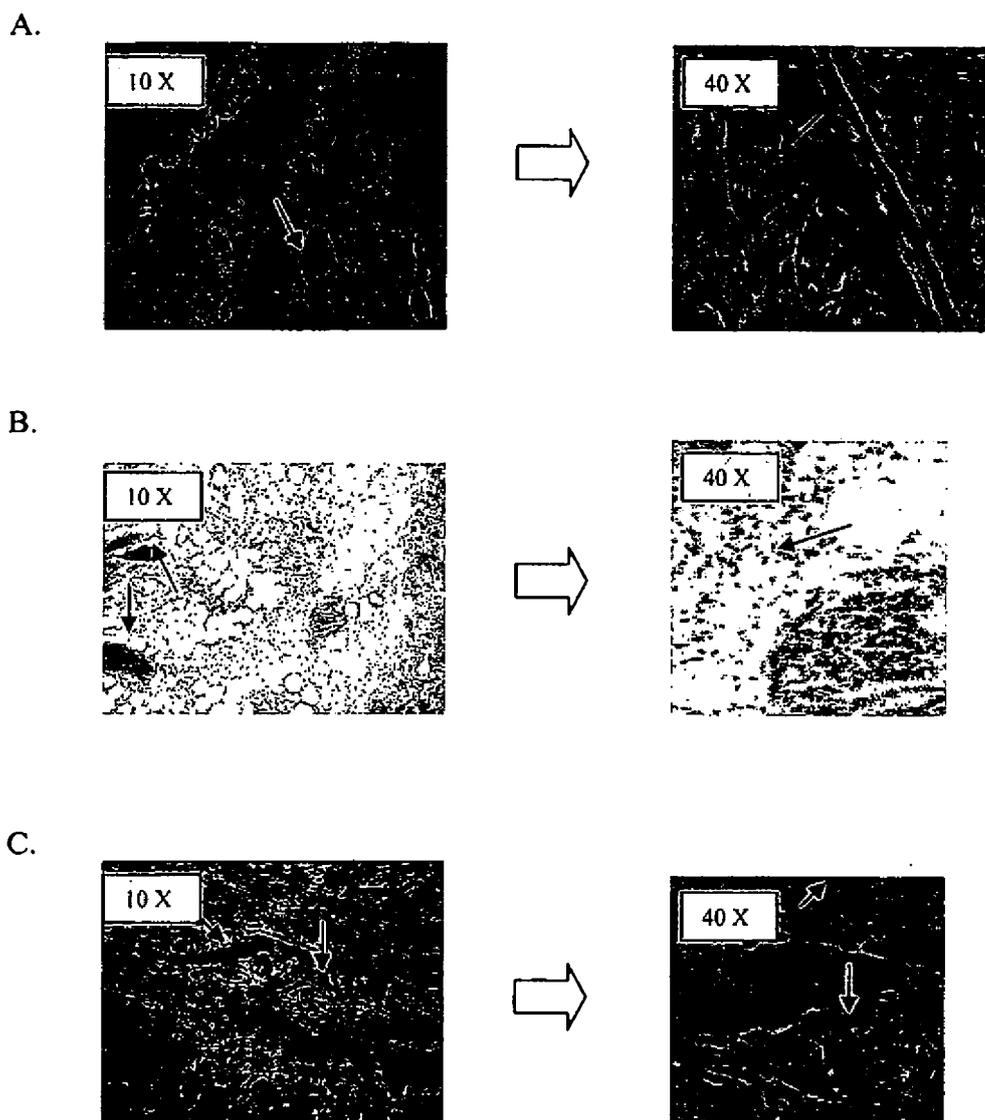


FIGURA 19

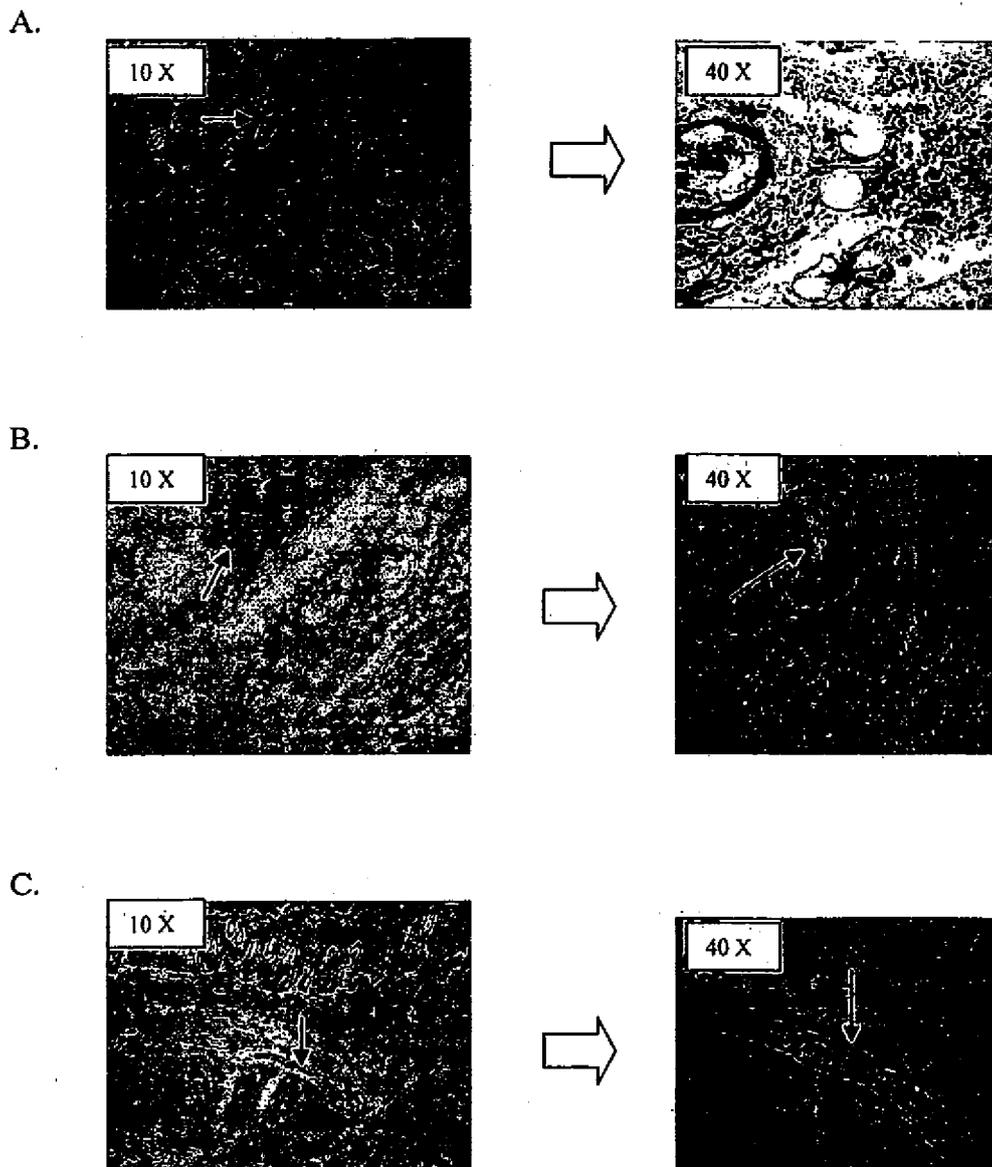
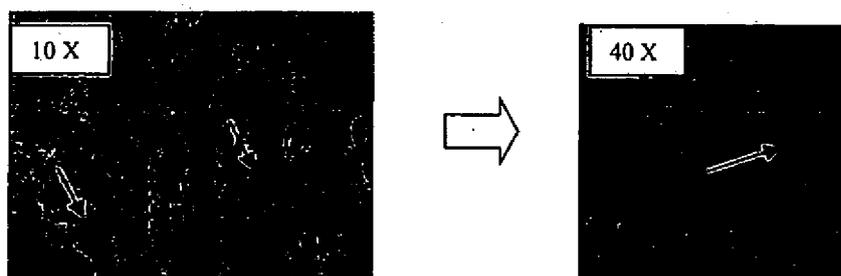
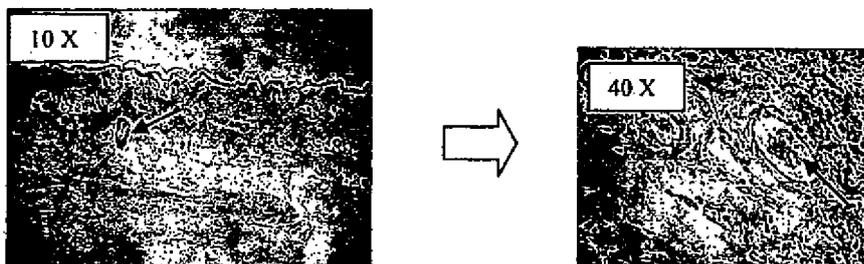


FIGURA 20

A.



B.



C.

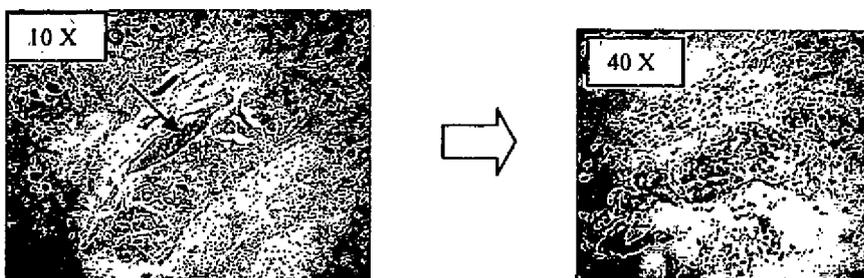


FIGURA 21

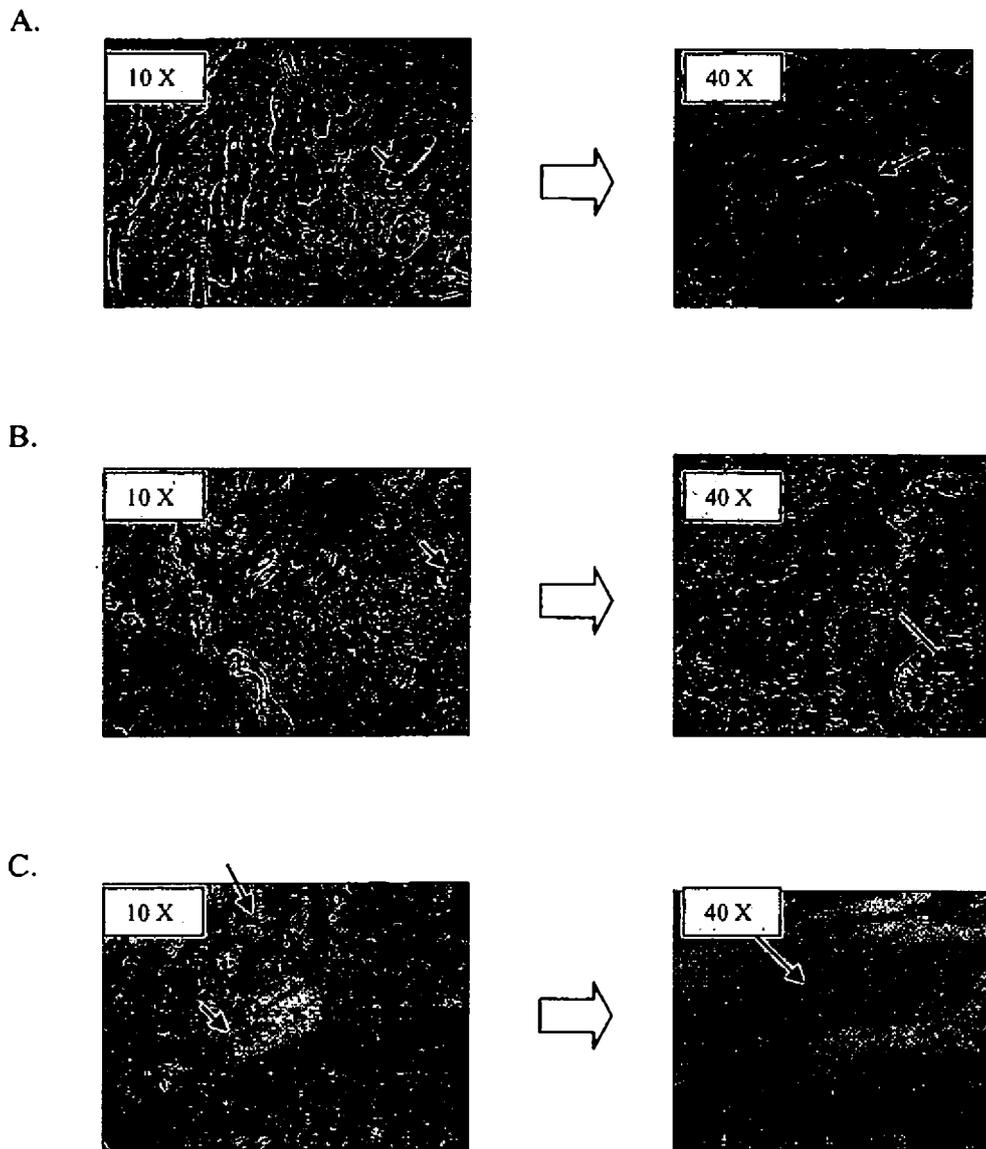
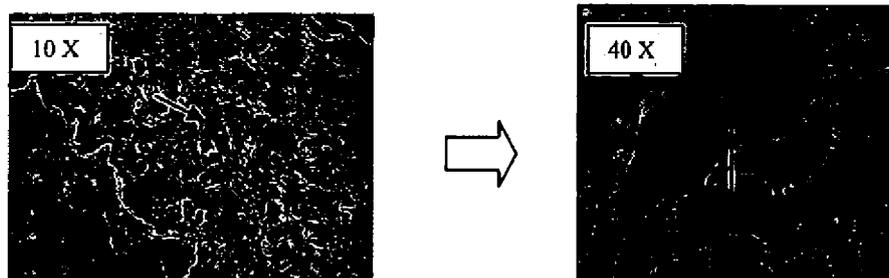
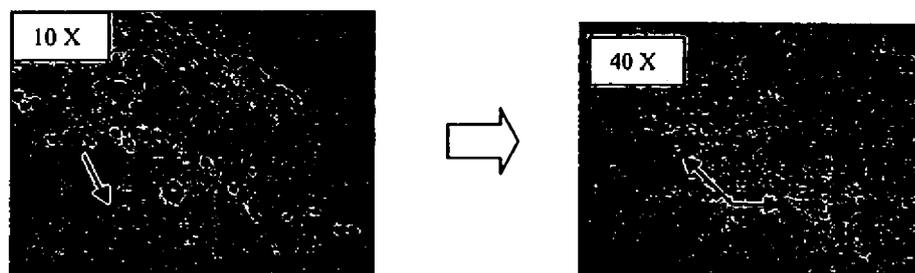


FIGURA 22

A.



B.



C.

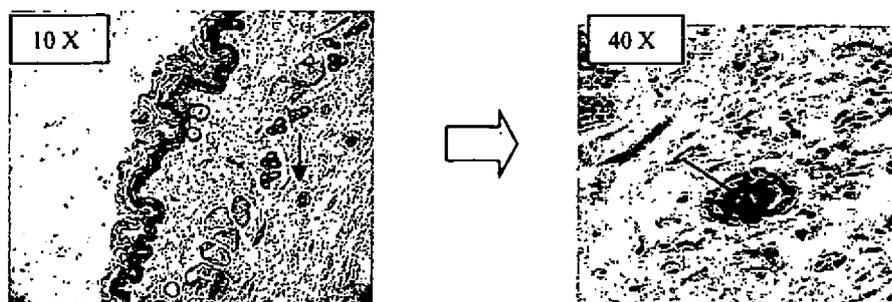
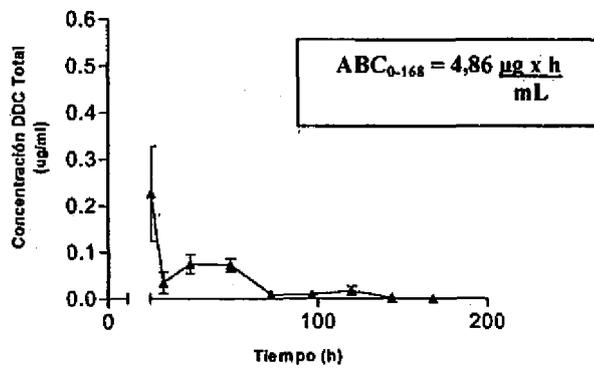
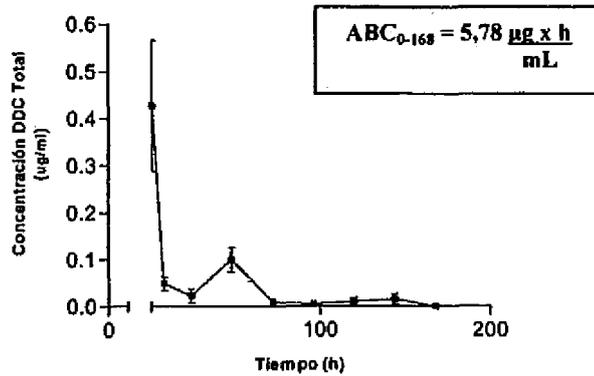


FIGURA 23

A



B





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201090045

②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2008

③② Fecha de prioridad: **28-12-2007**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | ANDERSEN, F.M.: "Inclusion complexation of disulfiram with cyclodextrins". Archiv. for Pharmac. Chem. Scientifica edition, 1984, vol. 12 (1), páginas 17-25, todo el documento. | 1-10 |
| X | NAGAI, N. et al.: "Delay in ICR/f rat lens opacification by the instillation of eye drops containing disulfiram and hydroxypropyl-beta- cyclodextrin inclusion complex". Biol. Pharm. Bull, 2007, vol. 30 (8), agosto, páginas 1529- 1534, todo el documento. | 1-10 |
| X | WANG, S. et al.: "Bioavailability and anticataract effects of a topical ocular drug delivery system containing disulfiram and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on slenite treated rats". Current Eye Research, 2004, vol. 29, (1), páginas 51-58, todo el documento. | 1-10 |
| A | ES 2184764 T3 (HINOIN LTD) 16.04.2003, columna 3, líneas 1-20. | 1-10 |
| A | EP 0153998 A2 (CHIESI FARMACEUTICI S.P.A) 11.09.1985, reivindicaciones. | 1-10 |
| A | Treating alcoholic cocaine users with disulfiram and naltrexone. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1992, vol. 42 (2), páginas 366-367, página 367. | 1-10 |
| A | PETRAKIS, I.L et al.: "Naltrexone and disulfiram in patients with alcohol dependece and comorbid post-traumatic stress disorder". Biol. Psychiatry, 2006, vol. 60, páginas 777-783, todo el documento. | 1-10 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: TODAS

| | | |
|---|--|------------------------------|
| <p>Fecha de realización del informe 23.11.2010</p> | <p>Examinador H. Aylagas Cancio</p> | <p>Página 1/5</p> |
|---|--|------------------------------|

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07C333/20 (2006.01)

A61K31/145 (2006.01)

A61K47/40 (2006.01)

A61P25/32 (2006.01)

A61P25/36 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07C, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, MEDLINE, BIOSIS EMBASE, NPL, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

Declaración

| | | |
|---|-----------------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 3-5, 9, 10 | SI |
| | Reivindicaciones 1, 2, 6-8 | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones | SI |
| | Reivindicaciones 1-10 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | ANDERSEN, F.M.: "Inclusion complexation of disulfiram with cyclodextrins". Archiv. for Pharmac. Chem. Scientifica edition, 1984, vol. 12 (1), páginas 17-25, | |
| D02 | NAGAI, N. ET AL.: "Delay in ICR/f rat lens opacification by the instillation of eye drops containing disulfiram and hydroxypropyl-beta- cyclodextrin inclusion complex". Biol. Pharm. Bull, 2007, vol. 30 (8), agosto, páginas 1529- 1534. | |
| D03 | WANG, S. ET AL.: "Bioavailability and anticataract effects of a topical ocular drug delivery system containing disulfiram and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on slenite treated rats". Current Eye Research, 2004, vol. 29, (1), páginas 51-58. | |
| D04 | ES 2184764 T3 | 16.04.2003 |
| D05 | EP 0153998 A2 | 11.09.1985 |
| D06 | Treating alcoholic cocaine users with disulfiram and naltrexone. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 1992, vol. 42 (2), páginas 366-367, página 367 | |
| D07 | PETRAKIS, I.L ET AL.: "Naltrexone and disulfiram in patients with alcohol dependence and comorbid post-traumatic stress disorder". Biol. Psychiatry, 2006, vol. 60, páginas 777-783, todo el documento | |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a un complejo de inclusión caracterizado porque está formado por disulfiram y ciclodextrina en proporción 1:2 caracterizado porque tiene los desplazamientos químicos en el espectro de ¹H-RMN y en el ¹³C-RMN indicados en las reivindicaciones 1 y 2, procedimientos de obtención, composición farmacéutica que lo contiene y su uso para preparar un medicamento destinado a tratar la dependencia de alcohol y de la cocaína.

El documento D1 se refiere a la formación de complejos de inclusión entre disulfiram y ciclodextrinas con una relación estequiométrica de 1:2. Se estudia la solubilidad de estos complejos y su uso para solucionar problemas de formulación y de biodisponibilidad provocados por la baja solubilidad del disulfiram. Asimismo, estos complejos se caracterizan por diversas técnicas como por ejemplo espectroscopia U.V.

Por lo tanto a la vista del documento D1 las reivindicaciones 1 y 2 carecen de novedad ya que en dicho documento se mencionan parámetros diferentes, pero los productos que se divulgan es decir el complejo de inclusión es idéntico en lo que respecta a las restantes características técnicas .

Por lo tanto las reivindicaciones 1 y 2 carecen de novedad y de actividad inventiva según los artículos 33 (2) (3) PCT.

Los documentos D2 y D3 se refieren a la utilización de gotas oculares tópicas que contienen un complejo de inclusión formado por disulfiram y por hidroxipropil- beta -ciclodextrina en el tratamiento de cataratas. En estos documentos se cita la utilización de estos complejos de inclusión con el fin de incrementar la solubilidad del disulfiram en las gotas oculares y la permeabilidad del principio activo en el ojo.

Por lo tanto a la vista de los documentos D1-D3 la materia de las reivindicaciones 1, 2, 6-8 carece de novedad y de actividad inventiva según los artículos 6.1 Y 8.1 de la L.P.

Las reivindicaciones 3-5, 9 y 10 carecen de actividad inventiva por las siguientes razones:

Las reivindicaciones 3-5, se refieren a distintos procedimientos de preparación de los complejos de inclusión de disulfiram con hidroxipropil-beta ciclodextrina, aislándose el complejo por evaporación en rotavapor, por atomización o por liofilización. Estos procedimientos son conocidos en el estado de la técnica y pueden ser fácilmente reproducibles por un experto en la materia. Así se citan procedimientos de aislamiento del complejo a partir de las mezclas por filtración, centrifugación, liofilización, secado por pulverización o secado al vacío (vease documentos D4, columna 3, líneas 1-19, o D5, reivindicaciones)

Las reivindicaciones 9 y 10 se refieren al uso del complejo de inclusión al que se refiere la reivindicación 1 para preparar un medicamento destinado a tratar la dependencia del alcohol y de la cocaína. Es de sobra conocido que el disulfiram es un principio activo utilizado en el tratamiento de la dependencia del alcohol y de la cocaína (ver documentos D6 o D7). Así mismo, la utilización de las ciclodextrinas en la formación de complejos con objeto de aumentar la solubilidad de diferentes principios activos y entre ellos el disulfiram también es conocido (ver documentos citados anteriormente D2 o D3). Por lo tanto, sería evidente para un experto en la materia que el complejo de inclusión tuviera la misma actividad farmacéutica que el principio activo que lo compone, es decir, su aplicación en el tratamiento de la dependencia del alcohol y de la cocaína

Por tanto, la materia correspondiente a las reivindicaciones 3-5, 9 y 10 carece de actividad inventiva según el artículo 8.1 de la L.P.