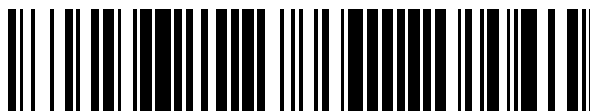


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 347**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/405** (2006.01)  
**A61K 31/47** (2006.01)  
**A61K 31/196** (2006.01)  
**A61K 31/198** (2006.01)  
**A61P 25/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01943689 .8**  
96 Fecha de presentación: **02.07.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1294377**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.03.2003**

54 Título: **MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DEL ALCOHOLISMO Y LA DEPENDENCIA DEL ALCOHOL.**

30 Prioridad:  
**30.06.2000 GB 0016056**  
**15.07.2000 GB 0017345**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.02.2012**

73 Titular/es:  
**BADAWY, ABDULLA**  
**60 CHERITON DRIVE**  
**THORNHILL CARDIFF CF14 9DF, GB**

72 Inventor/es:  
**Badawy, Abdulla**

74 Agente: **Serrat Viñas, Sara**

ES 2 375 347 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**

Métodos y composiciones para el tratamiento del alcoholismo y la dependencia del alcohol

- 5 Esta invención se refiere a compuestos y composiciones para su uso en el tratamiento del alcoholismo y la dependencia del alcohol.

**Antecedentes de la invención**

- 10 El tratamiento del alcoholismo mediante terapia de aversión implica el uso de un fármaco que se sabe que inhibe la actividad de la enzima aldehído deshidrogenasa (AIDH; EC. 1.2.1.3 (nomenclatura de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUMB))) en el hígado, conduciendo así a la acumulación en el hígado y por tanto en sangre del metabolito tóxico del alcohol o etanol, concretamente el acetaldehído, si la persona bebe alcohol durante tal terapia. Actualmente, se usan dos inhibidores de AIDH en la terapia de aversión, concretamente
- 15 disulfiram (también conocido como Antabuse) y cianamida cálcica. De estas dos terapias de aversión, disulfiram es la preferida, debido a su duración de acción más prolongada que hace que su administración y supervisión sean más fáciles, aunque la cianamida cálcica puede tener menos efectos secundarios.

- 20 La toxicidad del acetaldehído se manifiesta por sí misma en una reacción tóxica (la reacción disulfiram-etanol o DER) que implica síntomas tales como sensación de calor, olor a acetaldehído, rubor facial, hiperemia conjuntival, palpitations, latido rápido, hipotensión (tensión arterial baja), tos, disnea (dificultad para respirar), rubor universal, cefalea, náuseas, vómitos, somnolencia y, en casos graves, coma y muerte. La gravedad de la DER varía ampliamente entre individuos, presumiblemente dependiendo de la tolerancia del individuo al acetaldehído, y de cuánto acetaldehído se acumula en una persona cualquiera. Esto último, a su vez, se determina por cuánto alcohol
- 25 se consume y cuánta inhibición de AIDH se logra por el disulfiram.

- El propio disulfiram, sin embargo, tiene efectos secundarios graves tanto indeseables como algunas veces desagradables. Así, entre estos efectos secundarios están somnolencia, hipotensión grave (tensión arterial baja), parestesia (sentido alterado de hormigueo, cosquilleo o quemazón de la piel, tal como se produce en la neuritis periférica y las lesiones de médula espinal), neuropatías periféricas, psicosis y hepatitis, reduciendo todos ellos
- 30 marcadamente la tasa de cumplimiento con la administración del fármaco por el propio paciente y, por tanto, su eficacia como terapia de aversión para el alcoholismo. Además, incluso en sujetos que cumplen con la ingesta de dosis tolerables del fármaco, aproximadamente la mitad desarrolla DER pero la otra mitad pierde (no experimenta) la propiedad disuasiva a través de la que el fármaco ejerce su acción.

- 35 Con respecto a la cianamida cálcica, que se usa más ampliamente en Japón, estudios recientes han mostrado que ejerce otros efectos tóxicos igualmente desagradables, por ejemplo: disfunción hepática persistente incluso con abstinencia prolongada, y fibrosis hepática y la aparición de hepatocitos "con apariencia de vidrio esmerilado" en aquellos que sufren una recidiva en la ingesta de alcohol.

- 40 Por estas razones, una terapia de aversión al alcohol alternativa, usando inhibidores de AIDH más seguros que estén libres de los efectos secundarios indeseables anteriores es un objetivo altamente deseable y es el objeto de esta solicitud.

- 45 Baskina y Lapin (Farmakol. Toksikol., vol. 45, not. 1, 1982, págs. 70 -76) describen los efectos de la administración intraperitoneal sistémica a gatos del inhibidor de cinureninasa RO-4-4602 (benserazida) en el consumo de alcohol. Se observó un aumento en el consumo de alcohol. La administración intraperitoneal de triptófano dio como resultado la disminución en el consumo de alcohol. Minano y Myers (Psychopharmacology, vol. 98, 1989, págs. 176-182) sometieron a prueba los efectos de RO-4-4602 en el consumo de alcohol en ratas. Cuando se administró por vía
- 50 subcutánea, el consumo de alcohol no se alteró en modo alguno. La inyección directa en el cerebro dio como resultado la disminución en el consumo de alcohol.

- Como resultado de los estudios realizados por los solicitantes, estos encontraron varios tratamientos novedosos para la terapia de aversión al alcohol basándose en las rutas metabólicas del triptófano. El triptófano (Trp) se metaboliza mediante al menos cuatro rutas conocidas:
- 55

- (1) la ruta de cinurenina-ácido nicotínico, la ruta principal en el hígado que representa más del 90% de metabolismo de triptófano global y que produce una variedad de metabolitos importantes;
- 60 (2) la ruta de la serotonina, que aunque de menor importancia cuantitativa, es, sin embargo, de principal importancia en el sistema nervioso central (SNC), debido a que la serotonina controla muchas funciones importantes del cerebro, tales como el estado de ánimo, las emociones, el control de los impulsos, el apetito, el deseo de beber alcohol y otros procesos;
- 65 (3) la ruta de descarboxilación o de la triptamina, que es cuantitativamente más importante que la ruta de la serotonina;

(4) la ruta de la transaminación.

Por consiguiente, en un aspecto más amplio, la presente invención da a conocer el uso de

(a) un bioprecursor de una cantidad inhibidora de AIDH de un metabolito de Trp, o

(b) un potenciador de (a), en la preparación de un medicamento para tratar el alcoholismo y/o la dependencia del alcohol.

En el contexto de la presente invención, la expresión “metabolito de triptófano (o Trp)” abarca tanto metabolitos de Trp directos que pueden producirse mediante la primera fase en cualquiera de sus rutas metabólicas como metabolitos indirectos que pueden producirse en fases posteriores, adicionales de cualquiera de sus rutas metabólicas. El término “bioprecursor” se conoce bien por los expertos en la técnica y significa cualquier compuesto que se metaboliza *in vivo* a, en el caso de la presente invención, un metabolito de Trp. Los bioprecursos adecuados pueden seleccionarse de: Trp y metabolitos de Trp no inhibidores de AIDH. La expresión “metabolitos de Trp no inhibidores de AIDH” significa metabolitos de Trp que no inhiben o sólo inhiben débilmente (hasta el punto de que se considerarían terapéuticamente ineficaces) la AIDH.

El término “potenciador” significa un agente que puede potenciar un metabolito de Trp de este tipo, o bien directamente o bien por medio de un bioprecursor del mismo. Tales agentes potenciadores pueden afectar a la actividad de una ruta metabólica, por lo cual se posibilita un aumento en la disponibilidad de un metabolito de Trp inhibidor de AIDH. Tal potenciación puede ser mediante cualquier medio, tal como mediante medios enzimáticos o catalíticos, mediante la acentuación de condiciones de reacción favorables o un aumento de la cantidad del bioprecursor metabólico, o similares. La potenciación abarca tanto el aumento de la presencia de compuestos o condiciones para favorecer la producción de metabolitos de Trp activos como la inhibición de compuestos o condiciones que, por lo demás, podrían inhibir o degradar los metabolitos de Trp activos.

En particular, esta invención da a conocer el uso de triptófano en asociación con un inhibidor de una o más enzima(s) de la ruta de cinurenina-ácido nicotínico posterior a un metabolito de Trp inhibidor de AIDH, para aumentar los niveles de los metabolitos inhibidores de AIDH seleccionados de 3-hidroxicinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico, ácido cinurénico y ácido (indol-3-il)pirúvico, en particular, el uso de triptófano en asociación con un inhibidor de cinureninasa, para aumentar los niveles de estos inhibidores de AIDH.

Más particularmente, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas y combinaciones de principios activos según las reivindicaciones adjuntas, en relación con su uso en el tratamiento del alcoholismo y/o la dependencia del alcohol mediante terapia de aversión al alcohol.

En hígados de mamíferos, la AIDH existe en dos formas principales: la forma mitocondrial (o de  $K_m$  baja) y la soluble (o de  $K_m$  alta). La mitocondrial o de  $K_m$  baja es responsable de la oxidación del acetaldehído tras el consumo de alcohol en cantidades de pequeñas a moderadas, por ejemplo como en el consumo social de bebidas alcohólicas, y es por tanto la forma cuya inhibición es deseable en la terapia de aversión para el alcoholismo. Por tanto, la dosificación es preferiblemente una cantidad suficiente para ejercer una inhibición sustancial de al menos la actividad de AIDH de  $K_m$  baja.

Por tanto, la presente invención proporciona una combinación farmacéutica para su uso en un método para tratar el alcoholismo y la dependencia alcohólica, comprendiendo el método administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de triptófano en asociación con un inhibidor de una o más enzima(s) de la ruta de cinurenina-ácido nicotínico, para inhibir de este modo la actividad de AIDH, en el que dicho inhibidor es benserazida.

En el contexto de esta invención, “en asociación con” significa que la formulación, uso o método se adapta para la administración o uso simultáneo, secuencial o concurrente, o bien en mezcla entre sí o en formulaciones o composiciones separadas o de cualquier otra manera conocida por los expertos en la técnica.

La invención también se extiende al uso de las composiciones o compuestos descritos anteriormente en la preparación de un medicamento para tratar el alcoholismo y/o la dependencia del alcohol.

El/los metabolito(s) de triptófano o bioprecursor o potenciador del mismo/de los mismos puede(n) administrarse mediante cualquier medio convencional disponible para su uso conjuntamente con productos farmacéuticos, o bien como unidades de dosificación separadas individuales administradas de manera simultánea o concurrente, o bien en una combinación física de cada agente terapéutico componente en una unidad de dosificación individual o combinada. Los principios activos pueden administrarse solos, pero se administran generalmente con un vehículo farmacéutico seleccionado basándose en la vía de administración elegida y en la práctica farmacéutica convencional.

La dosificación administrada variará, por supuesto, dependiendo del uso y de factores conocidos tales como las

características farmacodinámicas del agente particular, y su modo y vía de administración; la edad, el estado de salud y el peso del receptor; la naturaleza y el grado de los síntomas, el tipo de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento, y el efecto deseado. El receptor puede ser cualquier tipo de mamífero, pero es preferiblemente un ser humano.

Para su uso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un consumo de alcohol anómalamente alto, a modo de directriz general, una dosificación oral diaria de principio(s) activo(s) puede ser de 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal. Generalmente, una dosis de 0,1 a 500 mg/kg por día en dosis divididas de una a cuatro veces al día o en forma de liberación sostenida es eficaz para obtener los resultados deseados. La dosificación apropiada de la composición en esta invención la podrá establecer fácilmente un médico experto en la técnica, basándose en la presente descripción. A modo de directriz general, habitualmente una dosificación diaria puede ser de 10 miligramos a 1,5 gramos de cada componente.

En las composiciones de la presente invención, los compuestos descritos en detalle en el presente documento pueden formar el principio activo, y se administran habitualmente en una mezcla con diluyentes, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables (denominados colectivamente en el presente documento un vehículo o materiales de vehículo) seleccionados adecuadamente con respecto a la forma pretendida de administración y de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales.

En las composiciones farmacéuticas, el principio activo estará presente, generalmente, en una cantidad de 0,5-95% en peso basándose en el peso total de la composición.

Por ejemplo, para la administración oral en la forma de un comprimido o cápsula, el principio farmacológicamente activo puede combinarse con un vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, no tóxico, oral tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol y similares; para la administración oral en forma líquida, los componentes farmacológicos orales pueden combinarse con cualquier vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable, no tóxico, oral tal como etanol, glicerol y agua. Además, cuando se desea o se necesita, también se pueden incorporar aglutinantes, lubricantes, agentes disgregantes y agentes colorantes en la mezcla. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol y ceras. Los lubricantes usados en estas formas farmacéuticas incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato de sodio, acetato de sodio, cloruro de sodio y. Los disgregantes incluyen, sin limitación, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita y goma xantana.

Las cápsulas de gelatina generalmente contienen el principio activo y vehículos en polvo, tales como lactosa, almidón, derivados de celulosa, estearato de magnesio y ácido esteárico. Pueden usarse diluyentes similares para preparar comprimidos fabricados por compresión. Tanto los comprimidos como las cápsulas pueden prepararse como productos de liberación sostenida para proporcionar una liberación continua de medicación a lo largo de un periodo de horas. Los comprimidos fabricados por compresión pueden estar recubiertos de azúcar o recubiertos por una película para enmascarar cualquier sabor desagradable y proteger el comprimido de la atmósfera, o pueden tener un recubrimiento entérico para la disgregación selectiva en el tubo digestivo.

Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en la forma de sistemas de administración de liposomas, tales como pequeñas vesículas unilaminares, grandes vesículas unilaminares, y vesículas multilaminares. Los liposomas pueden formarse a partir de una variedad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina, o fosfatidilcolinas.

Los compuestos de la presente invención también pueden acoplarse a polímeros solubles como vehículos farmacológicos que pueden realizar transporte dirigido. Tales polímeros pueden incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamida-fenol, polihidroxietilaspártamida-fenol o poli(óxido de etileno)-polilisina sustituida con residuos de palmitoílo. Además, los compuestos de la presente invención pueden acoplarse a una clase de polímeros biodegradable útiles para lograr la liberación controlada de un fármaco, por ejemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímeros de poli(ácido láctico) y poli(ácido glicólico), poli(epsilon-caprolactona), poli(ácido hidroxibutírico), poliorioésteres, poliactetales, polidihidropiranos, policianoacilatos, y copolímeros de bloque anfipáticos o reticulados de hidrogeles.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral pueden contener agentes colorantes y saborizantes para aumentar la aceptación del paciente.

En general, agua, un aceite adecuado, solución salina, disoluciones de dextrosa acuosa (glucosa) y de azúcares relacionados y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles son vehículos adecuados para disoluciones parenterales. Las disoluciones para administración parenteral preferiblemente contienen una sal soluble en agua del principio activo, un agente estabilizante adecuado, y, si es necesario, sustancias tampón. Agentes antioxidantes tales como bisulfato de sodio, sulfito de sodio o ácido ascórbico, o bien solos o bien combinados, son agentes estabilizantes adecuados. También se usan ácido cítrico y sus sales y EDTA sódico. Además, las disoluciones

parenterales pueden contener conservantes, tales como cloruro de benzalconio, metil- o propilparabeno y clorobutanol.

5 Los compuestos para la presente invención también pueden administrarse en forma intranasal mediante uso por vía tópica de vehículos intranasales adecuados, o mediante vías transdérmicas, usando aquellas formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Para administrarse en la forma de un sistema de administración transdérmico, la administración de la dosificación será, por supuesto, continua en lugar de intermitente a lo largo del régimen de dosificación.

10 La invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción y de los ejemplos.

**Ejemplo de referencia 1 - Resultados de la selección de metabolitos de triptófano para la inhibición de la actividad de AIDH**

15 Se sometieron a prueba el triptófano y sus diversos metabolitos para la posible inhibición de la actividad de AIDH de fuentes bacterianas. Las expresiones "inhibidor de la actividad de AIDH" y similares significan que se reduce la actividad de AIDH *in vivo* en presencia del inhibidor. En la práctica, esto puede predecirse haciendo referencia a la actividad inhibidora del compuesto o composición *in vitro*. Una sustancia o composición que muestra inhibición inferior al 20% a una concentración de 100  $\mu$ M se considera mala. Las que tienen inhibiciones de entre el 20 y el 20  
25 56% se consideran de moderadas a buenas, y las que tienen inhibiciones superiores al 60% se consideran buenas.

Se adquirió una preparación enzimática de Sigma, (Poole, Dorset, RU) y se usó para la selección de triptófano y sus metabolitos. Se realizaron varios experimentos preliminares para optimizar las condiciones del ensayo, que se realizó según las condiciones experimentales convencionales publicadas en la bibliografía y que conocen bien los expertos en la técnica. Todos los ensayos se realizaron mediante determinaciones por triplicado o cuadruplicado tanto para los controles (sin adiciones) como para los metabolitos de triptófano.

En primer lugar, se sometieron a prueba el triptófano y sus metabolitos a una concentración de 100  $\mu$ M. Los metabolitos de triptófano seleccionados incluyeron los siguientes:

30 (1) Metabolitos de la ruta de cinurenina-ácido nicotínico: estos eran cinurenina, 3-hidroxycinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico, ácido antranílico, ácido xanturénico, ácido cinurénico, ácido quinolínico, ácido quináldico, ácido  $\alpha$ -cetoadípico y nicotinamida.

35 (2) Metabolitos de la ruta de la serotonina: estos eran 5-hidroxitriptófano, serotonina (es decir 5-hidroxitriptamina), ácido 5-hidroxiindol-3-ilacético y 5-hidroxitriptofol.

(3) Metabolitos de la ruta de descarboxilación o de la triptamina: estos eran triptamina, indol-3-ilacetaldehído, y ácido indol-3-ilacético.

40 (4) Metabolitos de la ruta de transaminación: sólo había un metabolito de este tipo, ácido indol-3-ilpirúvico.

(5) Otros metabolitos complejos: estas eran harmano y norharmano.

45 Se obtuvieron los siguientes resultados, que se facilitan a continuación para grupos de metabolitos según el grado de inhibición.

Inhibidores malos o inactivos (es decir que producen una inhibición inferior al 20%)

50 Estos eran los siguientes (mostrándose su % de inhibición de la actividad de AIDH entre paréntesis): triptófano (2%), ácido quinolínico (13%), ácido quináldico (7%), ácido antranílico (9%), ácido  $\alpha$ -cetoadípico (1%), nicotinamida (7%), 5-hidroxitriptamina (serotonina) (15%), ácido 5-hidroxiindol-3-ilacético (4%), 5-hidroxitriptofol (7%), triptamina (0%) y ácido indol-3-ilacético (11%). En las mismas condiciones experimentales, el inhibidor de AIDH bien conocido disulfiram produjo una inhibición del 95% a una concentración similar (100  $\mu$ M). A partir de estos datos, parece que ni el propio triptófano ni los metabolitos anteriores producen ninguna inhibición significativa de la actividad de AIDH *in vitro* y, por tanto, es poco probable que ejerzan un efecto significativo *in vivo*. Incluso el inhibidor más fuerte, la serotonina, es poco probable que ejerza un efecto significativo puesto que es poco probable que sus niveles *in vivo* alcancen 100  $\mu$ M.

Inhibidores de moderados a buenos (es decir que producen una inhibición del 20-56%)

Los siguientes metabolitos de triptófano produjeron un grado de moderado a bueno de inhibición de la actividad de AIDH bacteriana *in vitro* cuando se sometieron a prueba a una concentración de 100  $\mu$ M: cinurenina (24%), ácido xanturénico (56%), 5-hidroxitriptófano (23%), indol-3-ilacetaldehído (55%), harmano (18%) y norharmano (23%), todos frente a una inhibición del 95% por el inhibidor de AIDH clásico, disulfiram, a la misma concentración (100  $\mu$ M).

En este caso, de nuevo, generalmente es poco probable que estos metabolitos puedan acumularse a este nivel para producir la inhibición de la actividad de AIDH *in vivo*, excepto quizás, el ácido xanturénico en ciertas condiciones.

#### Inhibidores fuertes (es decir que producen una inhibición superior al 60%)

Los siguientes metabolitos de triptófano produjeron una fuerte inhibición de la actividad de AIDH bacteriana *in vitro* cuando se sometieron a prueba a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ : 3-hidroxicinurenina (97%), ácido 3-hidroxiantranílico (97%), ácido cinurénico (90%), ácido indol-3-ilpirúvico (94%), frente a una inhibición del 95% por disulfiram a la misma concentración (100  $\mu\text{M}$ ) de disulfiram.

#### Ejemplo de referencia 2 – Inhibidores fuertes sometidos a prueba a concentraciones menores

Entonces, se sometieron a prueba a los metabolitos de triptófano inhibidores fuertes a dos concentraciones menores: 10  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$ .

Se sometieron a prueba los cuatro metabolitos de triptófano inhibidores anteriores para determinar la inhibición de la actividad de AIDH bacteriana a las concentraciones menores de 10  $\mu\text{M}$  y 2  $\mu\text{M}$  frente a las mismas concentraciones de disulfiram. A 10  $\mu\text{M}$ , la inhibición fue como sigue: 3-hidroxicinurenina (55%), ácido 3-hidroxiantranílico (17%), ácido cinurénico (30%) y ácido indol-3-ilpirúvico (29%), frente a una inhibición del 99% por disulfiram 10  $\mu\text{M}$ . Cuando se sometieron a prueba estos metabolitos de triptófano a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ , sólo el ácido indol-3-ilpirúvico produjo una inhibición significativa de la actividad de AIDH bacteriana, del 24%. Los otros tres metabolitos no ejercieron ningún efecto significativo (+1%, 3% y 5% para 3-hidroxicinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico y ácido cinurénico, respectivamente). En las mismas condiciones experimentales, el disulfiram (a 2  $\mu\text{M}$ ) produjo una inhibición del 72% de la actividad de AIDH.

#### Ejemplo de referencia 3 – Experimentos adicionales con metabolitos de triptófano usando la AIDH de $K_m$ baja o mitocondrial de mamífero

Se han sometido a prueba los efectos de metabolitos de triptófano en la actividad de AIDH a partir de una fuente de mamífero, concretamente hígado de rata, usando una preparación de hígado de rata que contiene AIDH tanto de  $K_m$  baja como de  $K_m$  alta y se sometieron a ensayo con el mismo protocolo que en el ejemplo 1. Los resultados preliminares de someter a prueba la posible inhibición de la enzima de  $K_m$  baja muestran que los cuatro metabolitos de triptófano que producen la inhibición más fuerte de la enzima bacteriana (concretamente 3-hidroxicinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico, ácido cinurénico y ácido indol-3-ilpirúvico) son todos inhibidores fuertes de la actividad de la enzima de  $K_m$  baja de mamífero, produciendo el 65%, el 46%, el 30% y el 37% de inhibición, respectivamente, en el nivel de concentración pequeña de 2  $\mu\text{M}$ . En las condiciones experimentales, disulfiram produjo el 30-46% de inhibición de la enzima de  $K_m$  baja a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ . Estos resultados son, en efecto, muy alentadores y sugieren que metabolitos de triptófano pueden ser inhibidores fuertes de la forma de AIDH de  $K_m$  baja o mitocondrial y por tanto, posibles agentes terapéuticos de aversión para el alcoholismo.

#### Conclusión

A partir de los resultados anteriores, podrían extraerse varias conclusiones y comentarios adicionales. La primera se refiere a la actividad inhibidora. Puesto que la 3-hidroxicinurenina y el ácido 3-hidroxiantranílico son inhibidores de AIDH más potentes que sus derivados no hidroxilados cinurenina y ácido antranílico, respectivamente, puede concluirse que la presencia de un grupo hidroxilo en la tercera posición del anillo de benceno le confiere inhibición o inhibición fuerte. También es posible que otros sustituyentes en la posición 3 (por ejemplo cloro u otros halógenos) y/o una(s) posición(es) adicional(es) puede(n) conferir inhibición o una inhibición más fuerte.

En segundo lugar, puesto que no había inhibición significativa por triptófano, triptamina, 5-hidroxitriptamina o sus metabolitos ácido 5-hidroxiindol-3-ilacético y 5-hidroxitriptofol, puede concluirse que ni la estructura de indol, ni su hidroxilación en la posición 5 ni la presencia de un grupo amino de cadena lateral le confieren inhibición.

En tercer lugar, los metabolitos aldehídicos, tales como indol-3-ilacetaldehído, son buenos inhibidores, casi seguro en virtud de ser posibles competidores con el acetaldehído por la enzima. Sin embargo, es probable que estos tengan menos uso terapéutico puesto que pueden oxidarse al ácido correspondiente *in vivo*.

#### Ejemplo de referencia 4 – Pruebas *in vivo* confirmatorias

Se realizaron experimentos adicionales para establecer si los cuatro compuestos fuertemente inhibidores y otros metabolitos de Trp que pueden inhibir la forma de AIDH responsable de la oxidación de acetaldehído *in vivo* en el hígado de mamífero, concretamente la enzima mitocondrial o la denominada enzima de  $K_m$  baja.

Por tanto, se realizaron experimentos usando una preparación de hígado de rata en la que pueden medirse simultáneamente tanto enzimas de  $K_m$  baja como de  $K_m$  alta, pero a diferentes concentraciones de sustrato

(acetaldehído), concretamente, 5  $\mu$ M para la  $K_m$  baja y 5 mM para la  $K_m$  alta.

- 5 Una selección del intervalo completo de metabolitos de Trp y del propio Trp, como en el ejemplo 1, reveló que, de todos los metabolitos de Trp sometidos a prueba en la enzima de mamífero, los cuatro metabolitos anteriores (3-hidroxicinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico, ácido cinurénico y ácido indol-3-ilpirúvico) eran, de nuevo, los inhibidores lo más potentes de la enzima de  $K_m$  baja. Por tanto, a una concentración de 100  $\mu$ M, estos cuatro metabolitos produjeron una inhibición significativa del 69%, el 76%, el 43% y el 53%, respectivamente, en comparación con una inhibición por una concentración de 100  $\mu$ M del inhibidor clásico, disulfiram, del 46-50%. A una
- 10 concentración de 10  $\mu$ M, la inhibición de la actividad de la enzima de  $K_m$  baja por los cuatro metabolitos de Trp anteriores fue del 52%, el 54%, el 43% y el 38%, respectivamente, frente a una inhibición por una concentración de 10  $\mu$ M de disulfiram del 38-43%. Finalmente, a una concentración de 2  $\mu$ M, la inhibición por los cuatro metabolitos de Trp anteriores fue del 55%, el 46%, el 40% el 30% respectivamente, frente a una inhibición por una concentración de 2  $\mu$ M de disulfiram del 30-46%.
- 15 A partir de estos datos, está claro que los cuatro metabolitos de Trp inhibidores de AIDH enumerados anteriormente, concretamente 3-hidroxicinurenina, ácido 3-hidroxiantranílico, ácido cinurénico y ácido indol-3-ilpirúvico, son inhibidores igualmente de fuertes, o incluso más fuertes, de la enzima de  $K_m$  baja de la mitocondria de hígado de rata en comparación con el fármaco terapéutico de aversión actualmente usado, disulfiram. La inhibición de la
- 20 enzima de  $K_m$  baja es un requisito previo importante para un agente terapéutico de aversión para el alcoholismo eficaz, y los presentes resultados, por tanto, no sólo apoyan y refuerzan los hallazgos anteriores, sino que también proporcionan un fuerte apoyo a la validez de proponer estos metabolitos de Trp como posibles agentes terapéuticos de aversión para el alcoholismo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una cantidad inhibidora de AIDH de una combinación de triptófano y benserazida en la preparación de un medicamento para tratar el alcoholismo y/o la dependencia del alcohol mediante terapia de aversión al alcohol.
2. Formulación farmacéutica que comprende una cantidad inhibidora de AIDH de una combinación de triptófano y benserazida, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma.
- 10 3. Formulación farmacéutica que comprende una cantidad inhibidora de AIDH de una combinación de triptófano y benserazida, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable para la misma, para su uso en el tratamiento del alcoholismo y/o la dependencia del alcohol mediante terapia de aversión al alcohol.
- 15 4. Cantidad inhibidora de AIDH de una combinación de triptófano en asociación con benserazida, para su uso, de manera o bien simultánea, secuencial o bien concurrente, en el tratamiento del alcoholismo y/o la dependencia del alcohol mediante terapia de aversión al alcohol.