

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 294**

51 Int. Cl.:

A61K 47/40 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2008 E 08878067 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2359861**

54 Título: **Complejos de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2014

73 Titular/es:

**CSPC ZHONGQI PHARMACEUTICAL
TECHNOLOGY (SHIJIAZHUANG) CO., LTD.
(50.0%)
No. 226, Huanghe Street, Shijiazhuang
Hebei 050035, CN y
INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE
ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WU, SONG;
DU, GUANHUA;
QI, YAN;
GAO, MEI;
YANG, QINGYUN;
GUANG, HONGMEI;
LI, WEI;
WANG, YUEHUA y
TONG, YUANFENG**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 438 294 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Complejos de Inclusión de Pinocebrina con Ciclodextrina o sus Derivados.

5 CAMPO TÉCNICO

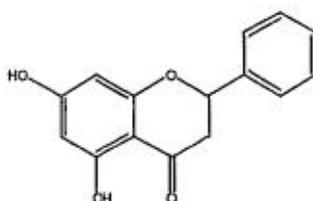
La presente invención se refiere a un complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados, a un proceso de preparación de los mismos, a una composición farmacéutica que contiene la misma y a una utilización de dicho complejo de inclusión o de dicha composición farmacéutica.

10

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

La pinocebrina, conocida como 5,7 - dihidroxiflavanona o 2.3 - dihidro - 5,7 -dihidroxi - 2 -fenil - 4H - 1 - benzopirán - 4 - ona, es un compuesto de flavanona insoluble en agua que posee la siguiente fórmula:

15



20

25

Hay un centro quiral en la estructura de la pinocebrina y es una pinocebrina natural en su configuración en S con $[\alpha]_D^{15}$ siendo -45,3 (c, 0,9 acetona como disolvente).

30

La (S) pinocebrina es un producto natural extraído de propóleos. También se encuentra en los piñones, en las hojas de eucalipto, en la resina de acacia y similares con concentraciones bajas (*Combined Chemical Dictionary 2004*). Actualmente la pinocebrina puede obtenerse mediante la síntesis y por lo tanto puede obtenerse en abundancia (Yonghao Cheng, Yabo Duan, Yan Qi, Xiaoyun Guo, Yuanfeng Tong, Guanhua Du, Song Wu, *chemical reagent*, 2006 Vol 28, N° 7: 437).

35

Se ha informado en la literatura que la pinocebrina es sensible a numerosas bacterias y hongos malignos y muestra un efecto antibacteriano relativamente bueno especialmente en cepas resistentes a algunos fármacos (Hyun Koo, Pedro L. Rosalen, Jaime A. Cury, Yong K. Park, and William H. Bowen, *Antimicrob. Agents & Chemother.* 2002, 46 (5), 1302 – 1309). El documento CN200410037860.9 revela que la pinocebrina levo tiene un buen efecto en la apoplejía cerebral.

40

La pinocebrina tiene una baja biodisponibilidad oral para su insolubilidad en agua y es relativamente baja su absorción oral. Por otra parte, es difícil hacerlo en una inyección por su insolubilidad en agua. Sobre todo porque se requieren composiciones farmacéuticas para liberar de forma rápida los agentes activos y que tengan rápidos efectos cuando se utilicen en el tratamiento de una enfermedad aguda como la apoplejía cerebral; el procedimiento clínico más común para tratar el trastorno agudo es una inyección por vía intravenosa. Por lo tanto, el problema de solubilidad de la pinocebrina debe resolverse primero para obtener formas de dosificación inyectables.

45

Por lo tanto es urgente obtener formulaciones farmacéuticas de pinocebrina con buena solubilidad en agua.

50 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención sorprendentemente han descubierto que la solubilidad en agua de la pinocebrina puede mejorar en gran medida utilizando ciclodextrina o sus derivados para formar un complejo de inclusión de pinocebrina.

55

Por lo tanto, la presente invención proporciona un complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados. El complejo de inclusión comprende pinocebrina y ciclodextrina o sus derivados en cualquier proporción. La proporción molar de la pinocebrina en la ciclodextrina o sus derivados oscila entre un intervalo de 1:1 a 1:100, y más preferiblemente oscila entre un intervalo de 1:1 a 1:10.

60

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para hacer el complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados.

65

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende dicho complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente.

La presente invención proporciona además una utilización de un complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados o una composición farmacéutica que contiene el complejo de inclusión para prevenir y / o tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto. En una realización, dicha enfermedad es una enfermedad cardiovascular o cerebrovascular o una apoplejía cerebral o una infección bacteriana y / o fúngica.

ILUSTRACIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una imagen típica de una histopatología de una oreja de conejo inyectada con solución salina normal (tinción HE). Como se ilustra en la figura, hay una fina vena íntima sin respuesta inflamatoria en la periferia del vaso sanguíneo.

La Figura 2 muestra una imagen típica de histopatología de una oreja de conejo inyectada con una inyección de un complejo de inclusión de pinocembrina (tinción HE). Como se ilustra en la figura, hay una fina vena íntima sin respuesta inflamatoria en la periferia del vaso sanguíneo.

La Figura 3 muestra un efecto del DL0108 (el complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil - β - ciclodextrina) en el test de Bederson de la OACM en ratas lesionadas en la operación.

La Figura 4 muestra un efecto del DL0108 en el índice de síntomas neurológicos (NSS) de la OACM en animales lesionados en la operación.

La Figura 5 muestra el valor del FSCr (flujo sanguíneo cerebral regional) del área que suministra sangre a la arteria de la corteza media varias veces tras la lesión de la operación de OACM (A) y el efecto del DL0108 en el valor del FSCr del OACM en ratas lesionadas en la operación (B).

Se expresan los datos de la Figura 3 a la Figura 5 como la media \pm S.E.M. Se analizan los resultados con ANOVA de una vía y la prueba de Dunnett. N = 10, ##P < 0,01 vs. el grupo de control en blanco, *P < 0,05, ** P < 0,01 vs. el grupo de control de vehículo.

Descripción detallada de la presente invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados, en el que dicho complejo de inclusión comprende pinocembrina y ciclodextrina o sus derivados y la proporción molar de la pinocembrina en la ciclodextrina o sus derivados oscila entre un intervalo de 1:1 a 1:100, y más preferiblemente oscila entre un intervalo de 1:1 a 1:10.

En la presente invención, el término " pinocembrina" incluye L - pinocembrina, S - pinocembrina, pinocembrina racémica o cualquier combinación de las mismas. Puede obtenerse pinocembrina a partir de recursos naturales o a partir de síntesis químicas.

En la presente invención, la ciclodextrina o sus derivados pueden seleccionarse del grupo formado por α - ciclodextrina, β - ciclodextrina, γ - ciclodextrina y sus derivados que tienen varios grupos de sustitución que incluyen de manera no limitante al hidroxietil - β - ciclodextrina, dimetil - β - ciclodextrina, hidroxipropil - β - ciclodextrina, dihidroxipropil - β - ciclodextrina, metil - β - ciclodextrina, ciclodextrina de glucosa, ciclodextrina de maltosa, ciclodextrina de maltotriosa, carboximetil ciclodextrina, ciclodextrina de sulfobutil, sulfobutiléter - β - ciclodextrina y cualquier combinación de los mismos. En una realización, dicha ciclodextrina o sus derivados es β - ciclodextrina o hidroxipropil - β - ciclodextrina. En otra realización, dicha ciclodextrina o sus derivados es dimetil - β - ciclodextrina, hidroxipropil - β - ciclodextrina, sulfobutiléter - β - ciclodextrina, hidroxietil - β - ciclodextrina o cualquier combinación de los mismos.

En la presente invención, el complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados puede ser una forma líquida o sólida o incluso una forma semisólida que depende del requisito de la forma de dosificación formulada o de la aplicación del tratamiento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de dicho complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente. En particular, una unidad de dosificación de una composición farmacéutica contiene entre 1 a 1.000 mg, preferiblemente de 50 a 250 mg de pinocembrina de principio activo. El complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados puede fabricarse en formas de composiciones farmacéuticas apropiadas para mamíferos, especialmente para humanos, con los procedimientos ya conocidos por los expertos en la disciplina.

La composición farmacéutica puede aplicarse en diferentes vías como la vía oral, intravenosa, intramuscular, peritoneal o la inyección por vía subcutánea.

- 5 La composición farmacéutica puede prepararse en una forma de dosificación líquida como una inyección (incluyendo una transfusión, una solución acuosa inyectable y polvo inyectable), una solución oral y un jarabe utilizando dicho complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados en una forma líquida; la composición farmacéutica puede prepararse en una forma de dosificación sólida como un comprimido, una cápsula, un gránulo, un comprimido dispersable, un comprimido bucodispersable, un comprimido bucal y similares utilizando dicho complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados en una forma sólida.
- 10 La forma preferible de dosificación líquida comprende una inyección del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina, como una solución acuosa inyectable del mismo. En una realización, dicha solución acuosa inyectable tiene una concentración que oscila entre un 0,01% y un 3 % (g / ml) y un pH que oscila entre 3 y 10, preferiblemente entre 4 y 9, más preferiblemente entre 5 y 8 y especialmente entre 6 y 8; la solución acuosa inyectable puede además comprender un agente regulador de la presión osmótica como un cloruro de sodio y glucosa, y un agente regulador del pH como un ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.
- 15 Dicha inyección puede estar en forma de polvo inyectable. En una realización, una solución en la que dicho polvo inyectable se disuelve, tiene un pH que oscila entre 3 y 20, dicho polvo inyectable puede además comprender un agente de soporte como el manitol y la lactosa, y un agente regulador del pH como un ácido clorhídrico e hidróxido de sodio.
- 20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar dicho complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados que comprende las etapas de adición de la ciclodextrina o sus derivados en un disolvente o un vehículo para obtener una solución o suspensión de ciclodextrina o sus derivados con una concentración en peso del 1 % al 60 %, y preferiblemente del 5 % al 60 %, añadiendo pinocembrina a dicha solución o suspensión y agitando o moliendo para obtener dicho complejo de inclusión líquido de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados.
- 25 El complejo de inclusión líquido de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados puede ser una solución o una suspensión; la solución del complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados puede obtenerse cuando se agite a un estado transparente y claro.
- 30 Un complejo de inclusión sólido de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados se obtiene mediante la eliminación del disolvente de la solución del complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados, por ejemplo, por liofilización, por secado por pulverización o concentración por destilación.
- 35 En el proceso para preparar el complejo de inclusión sólido de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados, la solución del complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados puede en primer lugar concentrarse en una concentración de ciclodextrina o sus derivados en un intervalo que oscila entre el 10 % y 15 % en peso, seguido de liofilización para obtener el complejo de inclusión sólido de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados.
- 40 En una realización de la presente invención, el complejo de inclusión sólido de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados puede obtenerse añadiendo ciclodextrina o sus derivados en un molino coloidal o un mortero, añadiendo una cantidad adecuada de disolvente y agitando hasta que forme una pasta, añadiendo pinocembrina a dicha pasta, moliendo entre 1 y 5 horas hasta que se forme una pasta viscosa, después se filtra, se concentra o se liofiliza.
- 45 El disolvente adecuado capaz de disolver la ciclodextrina o sus derivados se selecciona del grupo formado por agua, etanol, metanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, glicerina, acetona o cualquier combinación de los mismos. Preferiblemente, el disolvente es agua.
- 50 En los métodos de preparación mencionados anteriormente, dicha pinocembrina puede añadirse como un sólido de pinocembrina o una solución de pinocembrina disuelta en una cantidad adecuada de disolvente orgánico.
- 55 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una utilización del complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados para la preparación de un fármaco farmacéutico para prevenir y / o tratar una enfermedad o un trastorno.
- 60 En una realización, dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad cardiovascular o cerebrovascular. En la forma preferente de realización, dicha enfermedad cardiovascular o cerebrovascular es la apoplejía cerebral. En otra realización, dicha enfermedad o trastorno es una infección bacteriana o fúngica.
- 65 Por otra parte, la presente invención proporciona un procedimiento para prevenir y / o tratar un enfermedad o trastorno en un sujeto que comprende la administración de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica al sujeto que lo necesite. El sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo un gato, un perro, un caballo, una oveja, reses, un mono, un orangután y similares, y preferiblemente un ser humano. En una realización, dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad cardiovascular o cerebrovascular, especialmente la apoplejía cerebral. En otra forma de realización, dicha enfermedad o trastorno es una infección bacteriana y / o fúngica. Con respecto a la cantidad efectiva de la composición farmacéutica en la presente invención, es fácil determinarla por los expertos en la disciplina mediante los procedimientos convencionales, y por ejemplo puede oscilar entre 0,001 mg – 10 mg / kg del

peso corporal del sujeto. Por otra parte, la vía de administración de dicha composición farmacéutica puede seleccionarse según se considere adecuada, incluyendo la vía oral o la vía parenteral (que incluye la vía intravenosa, la vía intramuscular, la vía peritoneal o la vía de inyección por vía subcutánea).

5 Con las realizaciones de la presente invención, se pueden obtener los siguientes efectos beneficiosos.

10 Gracias a la utilización de la ciclodextrina o sus derivados para incluir pinocembrina y atrapar moléculas de pinocembrina en una estructura tubular de ciclodextrina o sus derivados, y por lo tanto obtener el complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados, la solubilidad en agua ha mejorado en gran medida. Se determinó que a 25 °C, la solubilidad en agua del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina es tan alta como 2.000 mg / 100 ml y es mucho más alta que la solubilidad en agua de la pinocembrina sin inclusión. Los resultados específicos se muestran en el Ejemplo 10.

15 Con el complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados de la presente invención, la pinocembrina activa, en una forma de complejo de inclusión, puede utilizarse directamente en una forma de dosificación líquida o sólida. La ciclodextrina o sus derivados es un adyuvante farmacéutico soluble en agua con baja toxicidad y, el complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados hechos a partir de los mismos, es adecuado para la preparación en diversas formas de dosificación líquida o sólida. El complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados de la presente invención tiene una buena solubilidad en agua y una baja irritación de los vasos y es adecuada para la preparación en formas de dosificación líquida. Se han resuelto con las realizaciones de la presente invención, el problema como la baja solubilidad en agua de la pinocembrina y una imposibilidad de aplicación directa en las formas de dosificación líquida, especialmente en las formas de dosificación inyectables. Por otra parte, para la mejora en la solubilidad en agua, la forma de dosificación sólida hecha a partir de la misma, muestra una rápida desintegración, una buena disolución, una alta biodisponibilidad y es adecuada para uso clínico.

20 Por otra parte, el complejo de inclusión de la presente invención posee una buena seguridad. Un prueba de toxicidad aguda muestra que el complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina tiene un valor de LD₅₀ para una inyección por vía intravenosa en ratones mayores a 700 mg / kg, que es 100 veces mayor que la dosis eficaz. Las pruebas de seguridad (ensayo de irritación local de los vasos sanguíneos, prueba de hemólisis, prueba de anafilaxia y ensayo de irritación local por inyección por vía intramuscular) muestran que el complejo de inclusión de la presente invención no provoca irritación en los vasos sanguíneos ni en la hemólisis ni en la anafilaxia, aunque posee una bajísima irritación local por inyección por vía intramuscular. Por tanto el complejo de inclusión es seguro y adecuado para la preparación de formas de dosificación inyectables.

35 Ensayos farmacológicos muestran que el complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina de la presente invención puede mejorar en gran medida la lesión neuroconductual inducida por la isquemia cerebral focal aguda en ratas y aliviar el grado de disminución del flujo sanguíneo cerebral en la zona que suministra sangre a la arteria de la corteza media. El complejo de inclusión de la presente invención puede prepararse en un fármaco farmacéutico para prevenir y / o tratar la enfermedad cardiovascular o cerebrovascular, preferiblemente en la apoplejía cerebral.

40 Se conoce en la disciplina que la pinocembrina es sensible a numerosos hongos y bacterias malignas, y muestra un efecto antibacteriano relativamente bueno en cepas resistentes a algunos fármacos. Por lo tanto, el complejo de inclusión de pinocembrina con ciclodextrina o sus derivados puede también utilizarse para preparar un fármaco farmacéutico para prevenir y / o tratar la infección bacteriana y / o fúngica.

45 Los ejemplos siguientes de la presente invención son meramente ilustrativos y no pretenden limitar, de ninguna manera, el alcance de la presente invención. Se incluyen en el alcance de la invención diversas modificaciones, conversiones o sustituciones que podrían realizar los expertos en la disciplina sin apartarse del espíritu y el alcance de la invención.

50 Ejemplo 1

55 Preparación de un complejo de inclusión líquido de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina (solución)

- (1) Ponderar 40 g de hidroxipropil – β – ciclodextrina, añadir a 400 ml de agua destilada y disolver agitando;
- (2) Por separado, ponderar 1 g de pinocembrina, añadir a 20 ml de alcohol etílico absoluto para formar una solución y añadir a dicha solución de hidroxipropil – β – ciclodextrina para formar una solución mezclada; y
- 60 (3) Agitar magnéticamente la solución mezclada a 40 °C – 50 °C durante 20 minutos para obtener una solución transparente y clara del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina.

Ejemplo 2

Preparación de un complejo de inclusión sólido de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina

- 5 Los pasos (1) – (3) fueron idénticos a los del Ejemplo 1.
- 10 (4) Liofilizar la solución obtenida del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina para obtener un complejo de inclusión sólido de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina.

Ejemplo 3

Preparación de un complejo de inclusión sólido de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina

- 15 (1) Ponderar 20 g de hidroxipropil – β – ciclodextrina en un mortero al que se le añade 100 ml de agua destilada y moler hasta formar una pasta;
- 20 (2) Por separado, ponderar 3 g de pinocembrina, añadir a 20 ml de alcohol etílico absoluto para formar una solución y añadir a dicha pasta de hidroxipropil – β – ciclodextrina para formar una solución mezclada; y
- 25 (3) Moler la solución mezclada durante 2 horas para formar una pasta homogénea, filtrar y evaporar hasta que se seque al vacío para obtener un complejo de inclusión sólido de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina.

Ejemplo 4

Preparación de una transfusión de cloruro de sodio del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina

- 30 (1) Ponderar 20 g de hidroxipropil – β – ciclodextrina, añadir a 200 ml de agua destilada y disolver agitando, añadir 0,5 g de carbón activo para la inyección, calentar a 80 °C mediante la agitación, aislar durante 15 minutos y filtrar para eliminar el carbón activo;
- 35 (2) Por separado, una ponderar 2 g de pinocembrina, añadir a 20 ml de alcohol etílico absoluto para formar una solución y añadir a dicha solución de hidroxipropil – β – ciclodextrina para formar una solución mezclada; y
- 40 (3) Agitar magnéticamente la solución mezclada a 40 °C – 50 °C durante 20 minutos para obtener una solución transparente y clara del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina;
- 45 (4) Complementar el agua para alcanzar un volumen de 800 ml, añadir 7 – 8 g de cloruro de sodio por inyección, ajustar el pH a 3,5 – 7 con 0,05 M de HCl o 0,05 de NaOH, complementar el agua para alcanzar un volumen de 1.000 ml, añadir 0,1 g de carbón activo por inyección y agitar durante 20 minutos; y
- (5) Eliminar el carbón activo, llenar la solución en botellas y autoclavar a 115 °C durante 30 minutos.

Ejemplo 5

Preparación de una transfusión de glucosa del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina

- 50 Los pasos (1) – (3) fueron idénticos a los del Ejemplo 4.
- 55 (4) Ponderar 50 g de glucosa por inyección, añadir agua con agitación en la disolución para alcanzar un volumen de 100 ml, añadir 0,1 g de carbón activo y calentar a ebullición ligeramente durante 15 minutos y filtrar para eliminar el carbón activo;
- 60 (5) Añadir la solución de glucosa a la solución del complejo de inclusión, complementar el agua para alcanzar un volumen de 800 ml, ajustar el pH a 6 – 7 con 0,05 M de HCl o 0,05 M de NaOH, complementar el agua para alcanzar un volumen de 1.000 ml, añadir 0,1 g de carbón activo por inyección y agitar durante 20 minutos;
- 65 (6) Filtrar la solución bruscamente y con precisión con un filtro y un tubo filtrante (tamaño del poro de 1,0 μm , 0,45 μm y 0,22 μm), llenar la solución en botellas y autoclavar a 115 °C durante 30 minutos.

Ejemplo 6

5 Preparación de un polvo inyectable estéril utilizando el complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina

- 10 (1) Ponderar 40 g de hidroxipropil – β – ciclodextrina en una sala de operación estéril, disolver en agua para alcanzar un volumen de 80 ml, añadir 0,1 g de carbón activo, calentar a ebullición ligeramente durante 15 minutos y filtrar para eliminar el carbón activo;
- 15 (2) Por separado, ponderar 1 g de pinocembrina, disolver en 20 ml de alcohol etílico absoluto, añadir la solución a dicha solución del complejo de inclusión del hidroxipropil – β – ciclodextrina,
- (3) Agitar magnéticamente la solución mezclada a 40 °C – 50 °C durante 20 minutos para obtener una solución transparente y clara del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina;
- (4) Complementar el agua para alcanzar un volumen de 100 ml, filtrar a través de una membrana de 0,22 μ m, llenar en viales de 10 ml (2 – 3 ml por vial), liofilizar y taponar para obtener el polvo inyectable estéril.

20 Ejemplo 7

Preparación de un complejo de inclusión de pinocembrina con β – ciclodextrina

25 Ponderar 40 g de β – ciclodextrina, añadir 100 ml en agua destilada, calentar a 40 °C – 50 °C para disolver la β – ciclodextrina. Añadir 1 g de pinocembrina disuelta en 20 ml de alcohol etílico absoluto, agitar magnéticamente durante 2 – 3 horas, filtrar y liofilizar para obtener el complejo de inclusión de pinocembrina con β – ciclodextrina.

Ejemplo 8

30 Preparación de una cápsula oral del complejo de inclusión de pinocembrina con β – ciclodextrina

35 Ponderar 20 g del complejo de inclusión de pinocembrina con β – ciclodextrina, mezclarlo con 80 g de lactosa mediante un procedimiento de refuerzo equivalente y disolver en agua con HPMC como aglutinante para producir un material blando, granular el material blando con un tamiz de malla de 20, secar a 60 °C para producir gránulos secos, clasificar los gránulos secos con un tamiz de malla de 20, comprobar los productos intermedios, llenar en cápsulas con 50 mg de agentes activos por cápsula, comprobar las muestras y envasar.

Ejemplo 9

40 Preparación de un comprimido oral del complejo de inclusión de pinocembrina con β – ciclodextrina

45 Ponderar 20 g del complejo de inclusión de pinocembrina con β – ciclodextrina, mezclarlo con 80 g de lactosa y 5 g de carboximetilalmidón sódico mediante un procedimiento de refuerzo equivalente, disolver en agua con HPMC como aglutinante para producir un material blando, granular el material blando con un tamiz de malla 20, secar a 60 °C para producir gránulos secos, clasificar los gránulos secos con un tamiz de malla 30, añadir 1 g de goma arábica, mezclarlos homogéneamente, fabricar los comprimidos con 50 mg de agentes activos por comprimido, comprobar las muestras y envasar.

Ejemplo 10

50 Determinación de la solubilidad de pinocembrina

55 Para determinar el solubizador se llevaron a cabo una serie de experimentos de codisolventes y disolventes no acuosos útiles para la inyección con las respectivas dosificaciones para determinar el efecto solubilización de la pinocembrina. Los resultados se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1. Determinación de la solubilidad de la pinocembrina

Solubilizante	Concentración del solubilizante o el disolvente no acuoso en agua (g / 100 ml)	Transparencia de la solución	Solubilidad (mg / ml)
Agua	--	Turbia e insoluble	< 0,2
Glicerina	50	Turbia e insoluble	< 1
Alcohol etílico	10	Turbia e insoluble	< 1
Propilenglicol	50	Turbia e insoluble	< 1
PEG400	30	Turbia e insoluble	< 1
Tween - 80	1	Turbia e insoluble	< 1
Polividona	1	Turbia e insoluble	< 1
B - ciclodextrina	1,8	Clara	> 2
Dimetil – β – ciclodextrina	10	Clara	> 10
Hidroxipropil – β – ciclodextrina	10	Clara	> 10
Sulfobutiléter – β – ciclodextrina	10	Clara	> 10
Hidroxietil – β – ciclodextrina	10	Clara	> 10

Las solubilidades en la Tabla 1 son las solubilidades de la pinocembrina. Los resultados muestran que la solubilidad de la pinocembrina puede mejorar en gran medida con la ciclodextrina o sus derivados, sin embargo otros surfactantes o solubilizantes utilizados comúnmente, codisolventes y disolventes no acuosos no muestran buenos efectos de solubilización de pinocembrina.

Pruebas de Seguridad

Las pruebas de seguridad de animales con la inyección del complejo de inclusión de pinocembrina

Se preparó la inyección del complejo de inclusión de pinocembrina diluyendo la transfusión del cloruro de sodio del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina preparada según el Ejemplo 4 con una solución de cloruro de sodio al 0,9 % 10 veces.

1. Ensayo de irritación local de los vasos sanguíneos

Se administró una inyección con 10 mL del complejo de inclusión de pinocembrina (que contiene 2 mg de pinocembrina) a un conejo por medio de la inyección IV en la vena de la oreja una vez al día durante 3 días. Se vio clara y completamente que en la zona de la inyección y en la periferia de los vasos sanguíneos no había ni inflamación ni respuesta de irritación como el enrojecimiento o la congestión y no había diferencias significativas con la zona en la que se inyectó con solución salina normal. No se observaron cambios anormales en la histopatología. Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2.

2. Prueba de hemólisis

Se añadieron a 7 tubos según el listado de formulación en la Tabla 2 una suspensión de glóbulos rojos, una solución salina normal, diferentes volúmenes de inyecciones del complejo de inclusión de pinocembrina (con una concentración de 0,20 mg / ml) o agua destilada. Se agitaron los tubos ligeramente para mezclarlos bien, y luego se insertaron en un baño de agua caliente a 37 °C. Se observaron fenómenos de hemólisis a las 0,5,1,2,3 horas después de la mezcla. No hay diferencias significativas entre los resultados en los tubos que contienen inyecciones del complejo de inclusión de pinocembrina en concentraciones clínicas y en los tubos de control en blanco de solución salina normal. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

5 Tabla 2. Lista de distribución de la muestra en la prueba de hemólisis

Número de tubo	1	2	3	4	5	6	7
2 % de suspensión de glóbulos rojos (mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
10 Solución salina normal (mL)	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	2,5	-
15 Agua destilada (mL)	-	-	-	-	-	-	2,5
20 Inyección del complejo de inclusión de pinocebrina (0,2 mg / ml) (mL)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	-	-

25

30 Tabla 3. Efecto de la inyección del complejo de inclusión de pinocebrina en la hemólisis

Tiempo	1	2	3	4	5	6	7
0,5 h	-	-	-	-	-	-	+
1 h	-	-	-	-	-	-	+
2 h	-	-	-	-	-	-	+
3 h	-	-	-	-	-	-	+

Nota: "+" hemólisis completa, "-" sin hemólisis.

35

3. Prueba de anafilaxia

40

La gravedad de anafilaxia en las cobayas a las que se le administró por vía intravenosa un fármaco de prueba (inyección del complejo de inclusión de pinocebrina) y un fármaco de control positivo (albúmina de huevo) durante 14 días y 21 días respectivamente, se observó y se determinó según la Tabla 4. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

45

Tabla 4. Criterios de anafilaxia

Grado	Síntomas
0	Sin respuesta anormal
1	Sólo un ligero rascado de nariz, temblores, piloerección
2	Frecuente Tos, rascado de narices, temblores, piloerección
3	Tos muy frecuente, dificultad para respirar,
	Convulsiones y tics
4	Convulsiones, tics, senilidad, shock y muerte.

50

55

Tabla 5. Efecto de la inyección del complejo de inclusión de pinocebrina en anafilaxia sistémica activa (ASA) de cobayas.

60

Fármaco	Grado de anafilaxia	
	14 días	21 días
Fármaco de prueba (inyección del complejo de inclusión de pinocebrina)	0	0
Fármaco de control positivo (albúmina de huevo)	4	4

4. Ensayo de respuesta de irritación local por inyección por vía intramuscular

La gravedad de la respuesta muscular se determinó según la Tabla 6. Se le inyectó a los conejos a las 48 horas tras la inyección del complejo de inclusión de pinocembrina, sólo ocurrió una ligera congestión (diámetro < 0,5 cm) y no una respuesta de irritación significativa en la zona de la inyección con grado medio de respuesta de irritación menor de 2,0. Esto demuestra que la inyección por vía intramuscular de la inyección del complejo de inclusión de pinocembrina tiene una baja irritación local. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 6. Criterios de respuesta muscular

Grado	Síntomas
0	No se observaron diferencias significativas en las zonas de inyección entre el fármaco de prueba y el fármaco de control
1	Ligera congestión en la zona muscular inyectada con el fármaco de prueba, más pequeño que 0,5 x 1,0 cm
2	Congestión moderada en la zona muscular inyectada con el fármaco de prueba, mayor que 0,5 x 1,0 cm
3	Congestión severa en la zona muscular inyectada con el fármaco de prueba con degeneración muscular
4	Necrosis en la zona muscular inyectada con el fármaco de prueba con atrofia marrón
5	Necrosis extensa en la zona muscular inyectada con el fármaco de prueba

Tabla 7. Irritación local de la inyección por vía intramuscular de la inyección del complejo de inclusión de pinocembrina

Grupo	Número de animales	Grado	Promedio
Solución salina normal	4	0 1 1 0	0,50
Inyección del complejo de inclusión de pinocembrina	4	1 0 1 1	0,75

Ensayo Farmacológico

El efecto de protección del complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina en la lesión regional aguda de la isquemia cerebral en ratas.

Método de Ensayo: El método de ensayo se llevó a cabo según el método del modelo del OACM tal y como se informa en la literatura (Zhang Juntian, *Modern Experimental Methods in Pharmacology*, octubre de 1998, primera edición, The United Press of Beijing Medical University y Pekin Union Medical College).

Test de Bederson

La puntuación de la conducta animal del grupo de la operación simulada fue de 0. El valor medio de la puntuación del comportamiento de los animales en el grupo de control de vehículo (denominado también a partir de ahora grupo de vehículo) fue de 3,4 ± 0,6. La mayoría de los animales mostraron rotación interna o aducción de las patas delanteras en el lado opuesto al de la operación, fuerza de estiramiento reducida pese a la extrusión lateral a la opuesta, torsión o necesitaron andadores, la puntuación fue de 3. Además, en algunos animales sólo se mostró una rotación interna de las patas delanteras o una fuerza de resistencia reducida para la que la puntuación de conducta fue de 2. Algunos animales presentaron graves síntomas y carecían de actividad autónoma, su puntuación de conducta fue de 4.

Los complejos de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina (1 mg / Kg), 3 mg / kg y 10 mg /kg), calculados sobre el contenido de la pinocembrina del componente activo, abreviado como DL0108, de manera similar a partir de ahora) pueden mejorar notablemente los síntomas dañados de los nervios tras las isquemia cerebral posterior de los animales (P < 0,05, P < 0,01) con una relación dosis-efecto y son superiores a un control positivo de nimodipina (Véase la Figura 3).

Evaluación de la locomoción (prueba de estabilidad)

El tiempo medio para el que las ratas se quedaron en una pendiente inclinada fue de 79,3 ± 10,4 seg en el grupo simulado. En el grupo de vehículo, el tiempo medio para el que el las ratas lesionadas con una isquemia cerebral se quedaron en la pendiente inclinada fue de 4,01 ± 1,42 seg, y se redujo significativamente. En comparación con el

grupo de vehículo, el DL0108 (3 mg / kg, 10 mg / kg) puede prolongar notablemente el tiempo durante el cual los animales permanecieron en la pendiente inclinada ($P < 0,01$) con una relación dosis – efecto. El DL0108 (3 mg / kg, 10 mg / kg) son superiores a los del control positivo de nimodipina (Figura 4).

5 El efecto del DL0108 en FSCr de ratas con tejido de isquemia cerebral aguda.

10 El valor de FSCr (flujo sanguíneo cerebral regional) valorado en la zona que suministra sangre a la arteria de la corteza media se redujo rápidamente en un 20 – 30 % del nivel basal pre – operación debido a la operación de OACM. 24 horas tras la isquemia (pre – decapitación), la compensación de la circulación colateral establecida y el valor de FSCr se incrementó un poco si se compara con el valor durante la operación, pero aún se encuentra por debajo del 50 % del nivel basal. Los resultados se muestran en la Figura 5A.

15 30 minutos tras la isquemia cerebral, el valor de FSCr del grupo del vehículo fue de $31,09 \pm 5,35$ % del valor basal, y los valores de FSCr de los grupos de administración, es decir; el grupo DL0108 del complejo de inclusión (1 mg / Kg), 3 mg / kg , 10 mg /kg) y el grupo de nimodipina fue de $40,76 \pm 6,58$ %, $50,09 \pm 7,09$ %, $53,28 \pm 8,03$ %, $55,58 \pm 6,09$ % del valor basal respectivamente. Los resultados indicaron que los grupos de administración tuvieron una rápida recuperación en el flujo sanguíneo cerebral y mostraron mejoras notables en el grupo de vehículo. El grupo del DL0108 (3, 10 mg / kg) y el grupo de nimodipina (3 mg / kg) presentaron diferencias significativas con el grupo de vehículo ($P < 0,05$). Los resultados se muestran en la Figura 5B.

20 En conclusión, el complejo de inclusión de pinocembrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina de la presente invención puede mejorar enormemente el daño neurológico inducido por la isquemia cerebral focal aguda en ratas y aliviar el grado decreciente de flujo sanguíneo cerebral en la zona que suministra sangre a la arteria de la corteza media.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados, comprende pinocebrina y ciclodextrina o sus derivados, en el que la proporción molar de pinocebrina a ciclodextrina o sus derivados oscila entre 1:1 y 1:100, preferiblemente 1:1 y 1:10.
- 10 2. El complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados según la reivindicación 1, en el que dicha pinocebrina se selecciona del grupo formado por L – pinocebrina, S – pinocebrina, pinocebrina racémica o cualquier combinación a partir de las mismas.
- 15 3. El complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha ciclodextrina o sus derivados se seleccionan del grupo formado por α – ciclodextrina, β – ciclodextrina, γ – ciclodextrina, hidroxietil – β – ciclodextrina, dimetil – β – ciclodextrina, hidroxipropil – β – ciclodextrina, dihidroxipropil – β – ciclodextrina, metil – β – ciclodextrina, ciclodextrina de glucosa, ciclodextrina de maltosa, ciclodextrina de maltotriosa, carboximetil ciclodextrina, ciclodextrina de sulfobutil, sulfobutiléter – β – ciclodextrina y cualquier combinación de los mismos.
- 20 4. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente.
- 25 5. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en el que la composición farmacéutica puede aplicarse en diferentes vías como la vía oral, intravenosa, intramuscular, peritoneal o la inyección por vía subcutánea.
- 30 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 4, en el que una composición farmacéutica puede tener forma de transfusión, inyección, polvo inyectable, una solución oral, un jarabe, un comprimido, una cápsula, un gránulo, un comprimido dispersable, un comprimido de disolución oral, un comprimido bucal entre otros.
- 35 7. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 6, en el que la composición farmacéutica es una inyección del complejo de inclusión de pinocebrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina que tiene una concentración que oscila entre el 0,01 % y el 3 % (g / ml).
- 40 8. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 6, en el que la composición farmacéutica es un polvo inyectable del complejo de inclusión de pinocebrina con hidroxipropil – β – ciclodextrina y una solución en el que dicho polvo inyectable está disuelto y tiene un pH del 3 al 10.
- 45 9. Un método para preparar el complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprenden las etapas de (1) añadir la ciclodextrina o sus derivados a un disolvente para obtener una solución o suspensión de ciclodextrina o sus derivados con una concentración en peso del 1 % al 60 %; (2) añadir la pinocebrina a dicha solución o suspensión y mezclar agitando o moliendo para obtener dicho complejo de inclusión; y opcionalmente (3) eliminar el disolvente de la mezcla del complejo de inclusión obtenida en la etapa (2).
- 50 10. El método según la reivindicación 9, en el que el disolvente se selecciona del grupo formado por agua, etanol, metanol, propanol, isopropanol, etilenglicol, glicerina, acetona o cualquier combinación de los mismos.
11. El complejo de inclusión de pinocebrina con ciclodextrina o sus derivados según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 para su utilización en un procedimiento para prevenir y / o tratar una enfermedad o trastorno, especialmente una enfermedad cardiovascular o cerebrovascular o una apoplejía cerebral o una infección bacteriana o fúngica.

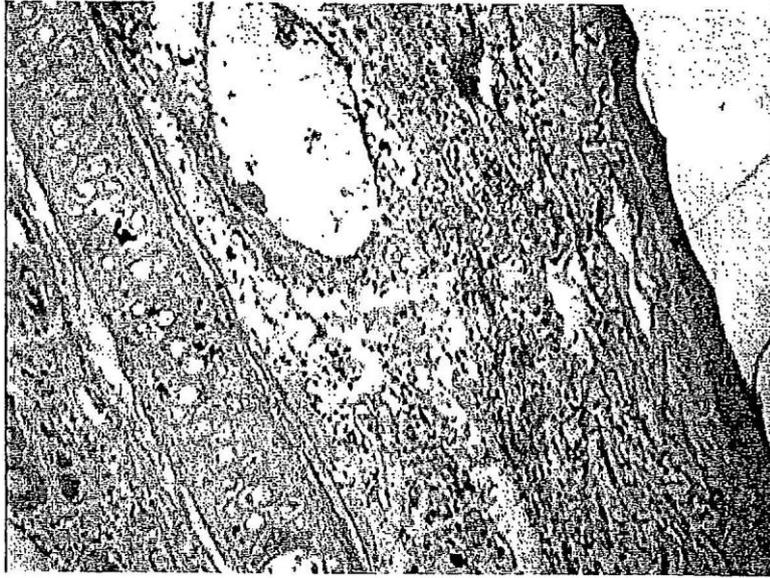


Fig 1

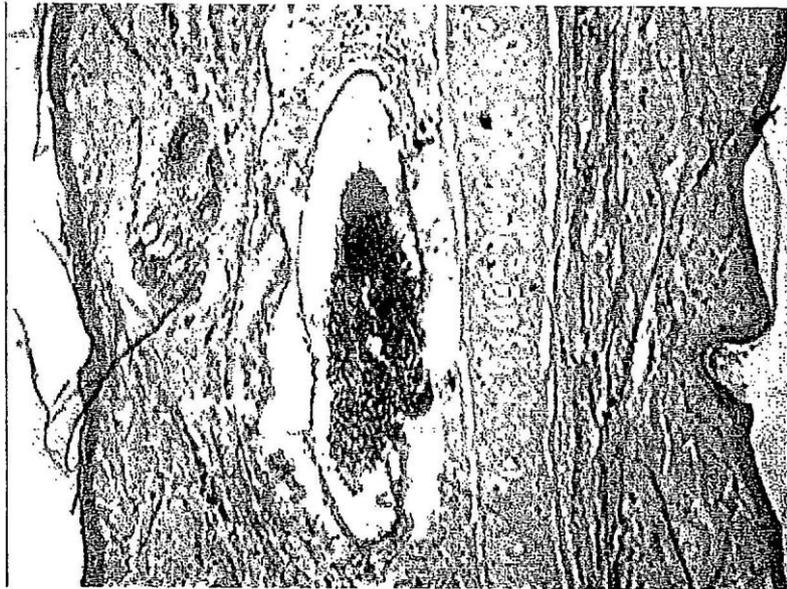


Fig 2

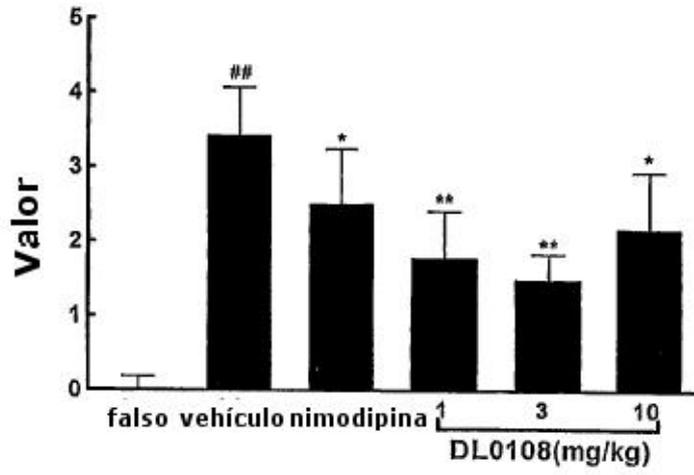


Fig 3

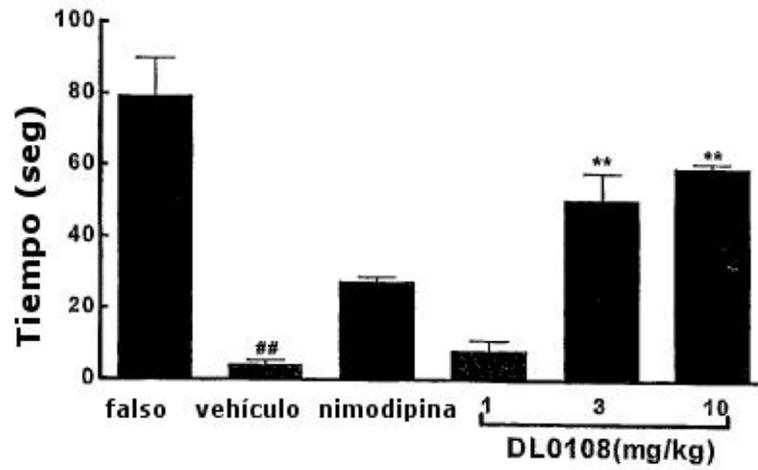


Fig 4

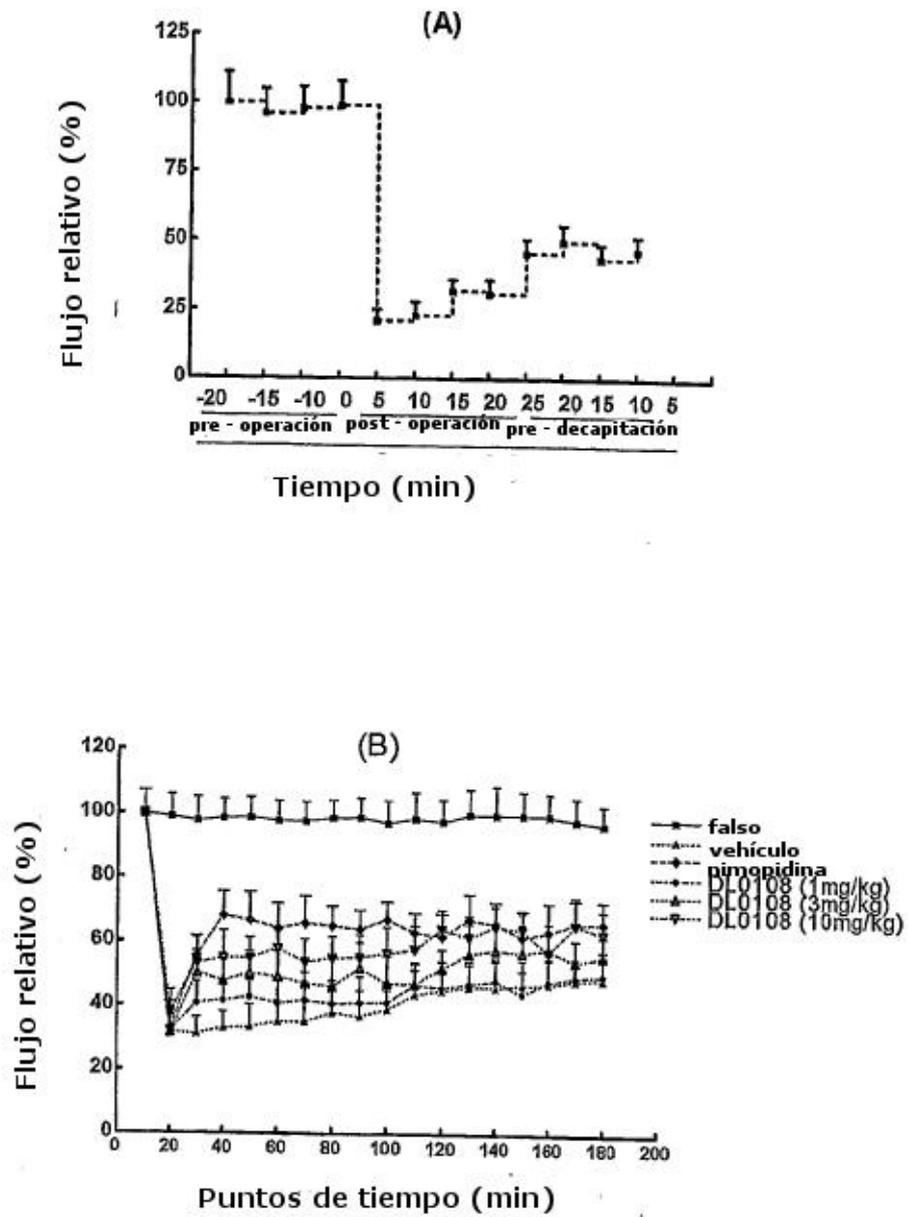


Fig 5