

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 579**

51 Int. Cl.:

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2017** **PCT/EP2017/054614**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2017** **WO17148927**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2017** **E 17707564 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019** **EP 3423034**

54 Título: **Composición farmacéutica disuasiva del abuso**

30 Prioridad:

29.02.2016 EP 16157798

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2020

73 Titular/es:

FOR ALL DESIGNATED STATES (100.0%)
Schlossplatz 1
8502 Lannach, AT

72 Inventor/es:

GÜBITZ, GEORG;
GREIMEL, KATRIN;
BRANDAUER, MARTIN;
HUBER, DANIELA;
BLEYMAIER, KLAUS;
KROUTIL, WOLFGANG;
LECHNER, DORIS;
WACHTER, CHRISTOF;
WAGNER, HARALD y
WINKLER, HEIMO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 745 579 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

Composición farmacéutica disuasiva del abuso

La presente solicitud se refiere a composiciones farmacéuticas disuasivas del abuso.

Muchos principios activos farmacéuticos, además de tener una excelente actividad en su aplicación adecuada, también tienen potencial de abuso, es decir, estos se pueden usar por parte de una persona que los toma en exceso para producir efectos distintos a los médicos previstos. Por ejemplo, los productos opioides recetados son un componente importante del tratamiento moderno del dolor. Sin embargo, el abuso y el uso indebido de estos productos han creado un grave y creciente problema de salud pública. Una etapa potencialmente importante hacia el objetivo de crear analgésicos opioides más seguros ha sido el desarrollo de opioides que están formulados para disuadir el abuso. El desarrollo de estos productos se considera, por ejemplo, por parte de la FDA de los EE. UU. como una alta prioridad de salud pública (véase "Abuse-Deterrent Opioids - Evaluation and Labeling"; Guía de la FDA para la industria, abril de 2015, FDA; "Guía de la FDA").

Debido a que los productos opioides a menudo son manipulados con fines de abuso por diferentes vías de administración o para vencer las propiedades de liberación prolongada (ER por su sigla en inglés), la mayoría de las tecnologías de disuasión del abuso desarrolladas hasta la fecha tienen la intención de dificultar la manipulación o hacer que el abuso del producto manipulado sea menos atractivo o menos gratificante. Cabe señalar que estas tecnologías aún no han demostrado su eficacia para disuadir la forma más común de abuso: ingerir varias cápsulas o comprimidos intactos para lograr una sensación de euforia. Además, el hecho de que un producto tenga propiedades de disuasión del abuso no significa que no haya riesgo de abuso. Esto significa, más bien, que el riesgo de abuso es menor de lo que sería sin tales propiedades. Debido a que los productos opioides deben, al final, ser capaces de administrar el opioide al paciente, siempre puede haber algún abuso de estos productos.

En la Guía de la FDA, las propiedades de disuasión del abuso se definen como aquellas propiedades que se han demostrado que disuaden significativamente el abuso, incluso si estas no previenen completamente el abuso. El término abuso se define como el uso intencional y no terapéutico de un producto o sustancia farmacológica, incluso una vez, para lograr un efecto psicológico o fisiológico deseable. El abuso no es lo mismo que el uso indebido, que se refiere al uso terapéutico intencional de un producto farmacéutico de una manera inadecuada y excluye específicamente la definición de abuso. La Guía de la FDA usa la expresión "disuasivo del abuso" en lugar de "resistente a la manipulación" porque esta última expresión se refiere a, o se usa en relación con, los requisitos de empaquetado aplicables a determinadas clases de fármacos, dispositivos y cosméticos.

La ciencia de la disuasión del abuso es relativamente nueva y tanto las tecnologías de formulación como los procedimientos analíticos, clínicos y estadísticos para evaluar esas tecnologías están evolucionando rápidamente. La Guía de la FDA identifica siete categorías de formulaciones disuasivas del abuso:

1. Barreras físicas/químicas: las barreras físicas pueden evitar deglutir, triturar, cortar, rallar o moler la forma de dosificación. Las barreras químicas, tales como los agentes gelificantes, pueden resistir la extracción del opioide usando disolventes comunes como agua, medios biológicos simulados, alcohol u otros disolventes orgánicos. Las barreras físicas y químicas pueden limitar la liberación del fármaco después de la manipulación mecánica o cambiar la forma física de un fármaco, haciéndolo menos susceptible de abuso.

2. Combinaciones agonistas/antagonistas: se puede añadir un antagonista opioideo para interferir con, reducir o vencer la euforia asociada al abuso. El antagonista puede ser secuestrado y liberado solo tras la manipulación del producto. Por ejemplo, un producto farmacológico puede formularse de tal manera que la sustancia que actúa como antagonista no sea clínicamente activa cuando el producto es ingerido (es decir, administrado de la manera prevista e intacta), pero se activa si el producto es triturado e inyectado o inhalado.

3. Aversión: se pueden añadir sustancias al producto para producir un efecto desagradable si la forma de dosificación se manipula o se usa a una dosificación más alta que la indicada. Por ejemplo, la formulación puede incluir una sustancia irritante para la mucosa nasal si se muele y se inhala.

4. Sistema de administración (incluyendo el uso de formulaciones inyectables de depósito e implantes): determinados diseños de liberación de fármaco o el procedimiento de administración de fármaco pueden ofrecer resistencia al abuso. Por ejemplo, la formulación inyectable de depósito de liberación sostenida o un implante subcutáneo puede ser difícil de manipular.

5. Nuevas entidades moleculares y profármacos: las propiedades de una nueva entidad molecular (NME por su sigla en inglés) o profármaco podrían incluir la necesidad de activación enzimática, diferentes perfiles de enlace al receptor, una penetración más lenta en el sistema nervioso central u otros efectos novedosos. Los profármacos con propiedades de disuasión del abuso podrían proporcionar una barrera química a la conversión *in vitro* al opioide precursor, lo que puede disuadir el abuso del opioide precursor. Las nuevas entidades moleculares y profármacos están sujetos a la evaluación del potencial de abuso a los efectos de la Ley de Sustancias Controladas (CSA por su sigla en inglés).

6. Combinación: dos o más de los procedimientos anteriores podrían combinarse para disuadir el abuso.

7. Nuevos enfoques: esta categoría abarca enfoques o tecnologías novedosos que no se capturan en las categorías anteriores.

Aunque ya existen varias propuestas disponibles basadas en las categorías 1 a 5 anteriores, todavía existe la necesidad insatisfecha de proporcionar combinaciones eficaces de estos procedimientos y enfoques y, especialmente, de proporcionar enfoques novedosos.

- 5 El artículo de Rodríguez Delgado y col. (Trends Anal. Chem. 74 (2015): páginas 21-45) desvela biosensores basados en lacasa para la detección de compuestos fenólicos en la industria alimentaria y para aplicaciones medioambientales y médicas, entre otras cosas, un electrodo de oxígeno Clark con lacasa de inmovilización (Bauer y col., Fresenius J. Anal. Chem. 364 (1999); 179-183).
- El documento WO 98/18909 A1 desvela un organismo transgénico transformado con una enzima que es capaz de transferir equivalentes reductores entre cofactores de nucleótidos de piridina.
- 10 Los documentos EP 0 032 286 A2, US 3 852 157 A y US 4 391 904 A desvelan procedimientos para el análisis de un miembro de un par inmunológico que usa una superficie de ensayo, entre otras cosas, una morfina:conjugado de peroxidasa de rábano picante y una carboximetil-morfina:reductasa de glioxato, para detectar anticuerpos en una muestra.
- 15 Los documentos WO 2012/122422 A2 y US 2011/262359 A1 desvelan profármacos de agente activo con enlazadores heterocíclicos que pueden escindirse enzimáticamente mediante una enzima gastrointestinal una vez que el profármaco ha entrado en el tubo gastrointestinal después de la ingestión oral. Para proporcionar el fármaco a partir del profármaco, la acción de la enzima es necesaria para escindir el profármaco para liberar el fármaco de manera controlada. La provisión de tales profármacos también se usa para disuadir el abuso del fármaco real.
- 20 El documento US 2014/330021 A1 desvela ácidos aril carboxílicos químicamente conjugados con hidromorfona como estrategia para disuadir el abuso.
- Los documentos US 2005/176644 A1 y US 2012/178773 A1 desvelan derivados de oxicodona con un resto químico acoplado a oxicodona para disuadir el abuso o para disminuir sustancialmente la actividad farmacológica de la oxicodona.
- 25 Los documentos AU 2012/201 450 A1 y WO 2006/058249 A2 se refieren a formulaciones de dosificación oral disuasivas del abuso que comprenden un polímero formador de gel, un tensoactivo irritante de la mucosa nasal y un agente de lavado junto con el fármaco con potencial de abuso.
- Todos estos documentos se refieren a estrategias comunes y conocidas para disuadir el abuso de estos fármacos con potencial de abuso, tales como la oxicodona.
- 30 La técnica anterior sobre campos no relacionados desvela diversas composiciones en las que las enzimas se combinan con agentes o composiciones para diversos usos:
el documento WO 00/27204 A1 se refiere a una composición antimicrobiana que comprende una oxidorreductasa y un agente potenciador del tipo N-hidroxianilida. Las composiciones de acuerdo con el documento WO 00/27204 A1 están destinadas como composiciones detergentes o de limpieza, pero también para el uso como desinfectantes o para la conservación de pinturas, alimentos, bebidas, etc.
- 35 El documento WO 01/98518 A2 se refiere a procedimientos para transformar principios biológicamente activos, tales como antibióticos, mediante lacasas y enzimas de peroxidasa de manganeso. De acuerdo con el documento WO 01/98518 A2, los principios activos conocidos deberían transformarse mediante lacasas/peroxidasas de manganeso para introducir grupos funcionales adicionales para llegar a nuevas sustancias activas con propiedades modificadas (por ejemplo, para superar resistencias contra determinados antibióticos).
- 40 El documento EP 0 919 628 A1 desvela un procedimiento para "macromolecularizar" compuestos fenólicos o compuestos de aminas aromáticas mediante la acción de enzimas con una actividad oxidante de polifenoles, tales como lacasa. Por lo tanto, el documento EP 0 919 628 A1 también desvela un procedimiento enzimático para transformar determinadas sustancias, incluyendo agentes antimicrobianos o inhibidores de infección viral, en sustancias con mayor peso molecular que pueden usarse después como espesantes, estabilizadores, pero también
- 45 agentes antimicrobianos o inhibidores de infección viral. También se sugiere someter a tratamiento las aguas residuales para eliminar los compuestos fenólicos o los compuestos de aminas aromáticas mediante macromolecularización. El documento EP 0 919 628 A1 sugiere lacasa, catecol oxidasa, polifenol oxidasa, oxidasa de ácido ascórbico o bilirrubina oxidasa como enzimas que pueden usarse (industrialmente) para el procedimiento descrito.
- 50 El documento WO 97/41215 A1 se refiere a tecnología de enzimas industriales y al problema relacionado con el almacenamiento/la administración de tales enzimas. Estas enzimas se administran en forma seca (en las que se indica que la formación de polvo fino es una desventaja) o de formulaciones líquidas (que tienen dos desventajas: que las enzimas no son estables en almacenamiento y están presentes en su estado activo, es decir, que reaccionan con un sustrato). Al evitar esta acción prematura con un sustrato, el documento WO 97/41215 A1 sugiere proporcionar la enzima y el sustrato en una composición líquida sustancialmente libre de agua que reaccionaría en
- 55 condiciones acuosas, pero no reaccionaría en la composición líquida libre de agua.

El documento DE 10 2006 048 833 A1 desvela una preparación farmacéutica para el tratamiento de osteoporosis que comprende, además de colágeno y una sustancia que contiene calcio (como sustancia activa principal), un agente de reticulación que comprende agentes de reticulación (por ejemplo, polihidroxiaromáticos) y un catalizador de la reacción de reticulación (por ejemplo, una enzima, tal como lacasa) que es capaz de reticular los agentes reticulantes. El objetivo del documento DE 10 2006 048 833 A1 es establecer una matriz tridimensional para soporte óseo ("hueso líquido").

El documento WO 97/27841 A1 se refiere a formulaciones enzimáticas estabilizadas que pueden almacenarse y ponerse a disposición fácilmente por medio de un sistema dispensador de dos componentes ("dispensador"). Por lo tanto, este documento se refiere, en general, a la provisión de enzimas, tales como (por ejemplo) oxidorreductasas o proteasas, por ejemplo, en fluidos de limpieza, champús o preparaciones de vitaminas.

El documento WO 2005/063037 se refiere a gomas de mascar que pueden contener enzimas. Las enzimas se incorporan a la goma de mascar debido a su efecto catalizador sobre la degradación. Prácticamente todas las enzimas posibles se enumeran en este documento sin anotación ("emparejamiento") con otras sustancias. La goma de mascar del documento WO 2005/063037 puede contener, adicionalmente, una sustancia activa farmacéutica, cosmética o biológicamente, seleccionada de una gran lista de sustancias sin ninguna correlación con la enzima.

También el documento WO 2007/143989 A1 se refiere a una goma de mascar que comprende un polímero biodegradable y (entre otras cosas) una enzima que está comprendida en la goma de mascar como una formulación de enzima hidrófoba. De nuevo, la enzima se proporciona para degradar (el polímero biodegradable en la) goma de mascar. La provisión de la enzima en una formulación de enzima hidrófoba se hace, por lo tanto, para prevenir una degradación prematura.

El documento WO 2012/003367 A2 se refiere a un procedimiento de administración de fármacos, en el que una banda no tejida con una pluralidad de filamentos contiene un agente activo en la que la liberación del agente activo del filamento puede desencadenarse mediante una enzima. Este filamento no tejido no es adecuado para la ingestión oral.

El documento WO 00/02464 A1 se refiere a un procedimiento para el tratamiento de tabaco, mediante el uso de una enzima fenoloxidante con el fin de oxidar compuestos fenólicos en tabaco.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo enfoque y tecnología para formulaciones de fármacos disuasivas del abuso.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica disuasiva del abuso que comprende un fármaco con un grupo funcional reactivo con enzimas, en el que el fármaco tiene un potencial de abuso, y una enzima capaz de reaccionar con el grupo funcional reactivo con enzimas (en lo sucesivo en el presente documento denominada "enzima de procesamiento del fármaco"), en la que el fármaco con el grupo funcional reactivo con enzimas está contenido en la composición farmacéutica en un estado reactivo con enzimas y estable en almacenamiento y en condiciones en las que ninguna actividad enzimática actúa sobre el fármaco.

La presente invención proporciona una nueva categoría de estrategia de disuasión del abuso (un "enfoque novedoso") que ofrece una práctica caja de herramientas para prácticamente todas las composiciones farmacéuticas cuando está presente un riesgo de abuso o se ha de suponer. Tal principio aún no se ha propuesto o sugerido en la técnica anterior. Por consiguiente, ninguna composición de la técnica anterior (por ejemplo, las mencionadas anteriormente) ha propuesto o sugerido una composición que comprenda un fármaco con potencial de abuso y una enzima, en la que el fármaco con potencial de abuso esté contenido en la composición farmacéutica junto con una enzima capaz de reaccionar con el grupo funcional reactivo con enzimas del fármaco con potencial de abuso en un estado reactivo con enzimas y estable en almacenamiento y en condiciones en las que ninguna actividad enzimática actúa sobre el fármaco.

El principio de disuasión del abuso es, para todos y cada uno de los fármacos, el mismo: el fármaco con el riesgo de abuso se combina con una o más enzimas (opcionalmente, también con cofactores/cosustratos/mediadores necesarios) en la preparación farmacéutica en un estado estable en almacenamiento (normalmente seco) en la que la enzima es activable (es decir, que proporciona la enzima en un estado reactivo con enzimas); pero en la que la enzima en la preparación farmacéutica está contenida en condiciones que no permiten que la actividad enzimática actúe sobre el fármaco. Por consiguiente, puede haber, por ejemplo, una separación espacial o de reacción en la composición farmacéutica. Por lo tanto, este principio también es especialmente adecuado para los fármacos con alto riesgo de abuso, tales como los opioides, pero también los tranquilizantes (especialmente las benzodiacepinas), los estimulantes y los narcóticos.

Si el fármaco se administra según lo previsto, por ejemplo, mediante ingestión de un comprimido, la enzima se inactiva (en el caso de composiciones administradas por vía oral, preferentemente mediante el entorno ácido en el estómago y/o las enzimas proteolíticamente activas presentes en el tubo GI). Si se abusa del fármaco tratando de extraer la sustancia activa de tales composiciones farmacéuticas, la enzima se activa y actúa sobre el fármaco para procesar el fármaco en otro compuesto que ya no se puede usar más por completo o tiene, al menos, un menor potencial de abuso y, por lo tanto, disminuye la motivación para el abuso (es decir, que hace que sea disuasiva del

abuso la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención).

La presente invención proporciona, por lo tanto, la combinación de un fármaco con un potencial de abuso (en lo sucesivo en el presente documento denominado "el fármaco" o "el fármaco diana") y una enzima de procesamiento del fármaco que se activa una vez que la composición de acuerdo con la presente invención se somete a tratamiento mediante medidas abusivas que tienen como objetivo extraer el fármaco de la presente composición farmacéutica. Mientras que las composiciones de acuerdo con la presente invención, generalmente, se destinan a la administración oral, la extracción del fármaco de manera abusiva se realiza normalmente con el objetivo de proporcionar composiciones inyectables (por vía intravenosa). Las enzimas de procesamiento del fármaco son conocidas en el principio; prácticamente todas las enzimas que procesan el fármaco específico con o sin cofactores/cosustratos/mediadores adicionales son adecuadas en la composición de acuerdo con la presente invención, si pueden fabricarse adecuadamente y pueden proporcionarse en la composición con una actividad (tras disolverse en disolventes acuosos) que sea capaz de procesar el fármaco de manera adecuada. Se sabe que las enzimas catalizan más de 5.000 tipos de reacciones bioquímicas. Las enzimas de acuerdo con la presente invención pueden requerir componentes adicionales para que puedan actuar sobre el fármaco diana de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, las enzimas de acuerdo con la presente invención pueden necesitar cofactores, cosustratos y/o mediadores. Un mediador suele ser una sustancia que transfiere electrones, pero actúa como catalizador (o, de manera similar, como un catalizador). Un cosustrato interviene (estequiométricamente) en la reacción (con el fármaco diana). Los cofactores son "moléculas auxiliares" que ayudan a la enzima en el procedimiento de reacción en la transformación bioquímica con el fármaco. Por consiguiente, la presente invención se aplica a reacciones en las que una enzima cataliza la oxidación o la reducción del compuesto mediador que oxida o reduce el fármaco diana; en las que una enzima cataliza el enlace de cosustratos al fármaco; así como en las que una segunda enzima (o enzimas adicionales) cataliza la transformación del fármaco activado.

Las enzimas de procesamiento del fármaco preferidas son aquellas que son específicas para los diversos grupos funcionales del fármaco, es decir, el grupo metoxi en C3 (la referencia de átomo ejemplificada en lo sucesivo en el presente documento se realiza de acuerdo con la molécula de oxiconona; para otros fármacos de estructura similar (como muchos fármacos diana opioides), una persona experta en la materia puede hallar inmediatamente el grupo funcional correspondiente), el grupo epoxi entre C4 y C5, el grupo oxo en C6 y el grupo metilo en el átomo de N en la posición 17. Estas enzimas preferidas, por lo tanto, incluyen oxidorreductasas (especialmente monooxigenasas), transferasas (tales como acetilasas, sulfotransferasas y glucuronosiltransferasas) e hidrolasas, especialmente hidrolasas de epóxido. Las enzimas preferidas son, por lo tanto, enzimas que catalizan la desmetilación en N (especialmente la desmetilación en O o la desetilación en O), desalquilación en N (especialmente la desmetilación en N o la desetilación en N), reducción en ceto, oxidación en N, reordenación de la cetona a un éster (reacción de Baeyer-Villiger; la cetona se transforma mediante una monooxigenasa en un éster (por ejemplo, también una cetona cíclica en una lactona)), hidroxilación en epoxi, esterificación, desamidación, peroxigenación o deshalogenación del fármaco o adición de moléculas (tales como glucuronidación, sulfatación y acetilación) al fármaco. La desmetilación en O da como resultado principalmente una transformación del grupo metoxi en un grupo hidroxilo, que después puede reaccionar, además, mediante la adición de moléculas adicionales (incluyendo di- o polimerización) u oxidación adicional. La reacción adicional también se puede catalizar mediante una segunda enzima. La desmetilación en N da como resultado principalmente un grupo amino secundaria, que después puede reaccionar, además, mediante la adición de moléculas adicionales (incluyendo di- o polimerización) u oxidación adicional. De nuevo, la reacción adicional también se puede catalizar mediante una segunda enzima. La reducción en ceto da como resultado una transformación del grupo ceto en un grupo hidroxilo, que después puede reaccionar, además, mediante la adición de moléculas adicionales (incluyendo di- o polimerización) u oxidación adicional. De nuevo, la reacción adicional también se puede catalizar mediante una segunda enzima. La oxidación en N conduce a un compuesto de N-óxido, que puede conducir directamente a una inactivación del fármaco o reaccionar después, además, mediante la adición de moléculas adicionales (incluyendo di- o polimerización). La hidroxilación en epoxi da como resultado dihidrodioles (a menudo: trans-dihidrodioles), que después pueden reaccionar, además, mediante la adición de moléculas adicionales (incluyendo di- o polimerización) u oxidación adicional. La adición de moléculas (tales como sulfatación, glucuronidación y acetilación, pero también incluyendo di- o polimerización) conduce a productos que a menudo son insolubles o se ven privados de su potencial abusivo debido al potencial de excreción acelerado). En esta reacción, se pueden añadir sustratos sintéticos (por ejemplo, en glucuronidación) para potenciar la inactivación del fármaco. La esterificación se realiza mediante esterasas (para grupos OH-) o trans-esterasas (por ejemplo, para petidina). La desamidación se puede realizar con amidasas (EC 3.5.1.4), por ejemplo, sobre fentanilo; las peroxigenasas (por ejemplo, EC 1.11.2.1) pueden reaccionar en una diversidad de reacciones P450, las deshalogenasas (tales como EC 3.8.1) pueden reaccionar con fármacos diana que contienen halógeno, tales como cebranopadol.

Con tales enzimas, el fármaco diana se procesa a una forma inactiva o, al menos, a agentes que son menos activos que el fármaco diana y, por lo tanto, son menos atractivos para aquellos que pretenden abusar de las composiciones farmacéuticas de fármacos diana.

Los ejemplos de enzimas de procesamiento del fármaco conocidas son las oxidorreductasas dependientes de NAD(P) (H), tales como las enzimas reductoras del fármaco de la superfamilia de la aldo-ceto reductasa (AKR), especialmente AKR1C1 (20 alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa (EC 1.1.1.149)), AKR1C2 y AKR1C4. Una enzima de procesamiento de oxiconona específicamente preferida es la 3-alfa-hidroxiesteroide 3-deshidrogenasa (EC

1.1.1.213). Las oxidorreductasas dependientes de NAD(P)(H) transforman el fármaco diana en presencia de NAD(P)H en su producto de degradación reducida. Otro grupo preferido de enzimas de procesamiento del fármaco son las ceto-esteroide reductasas, tales como las 3-, 6- y 17-cetoesteroide reductasas.

De acuerdo con una realización preferida, la enzima de procesamiento del fármaco es una monooxigenasa. Las monooxigenasas tienen la capacidad de insertar un átomo de oxígeno en diversos sustratos orgánicos. Resulta necesario activar el oxígeno molecular con el fin de llevar a cabo este tipo de reacción y, para ello, los electrones se transfieren de cofactores (in)orgánicos al oxígeno molecular. Una amplia gama de reacciones oxidativas se cataliza mediante monooxigenasas, como hidroxilaciones de compuestos alifáticos y aromáticos, epoxidaciones de alquenos, oxidaciones de Baeyer-Villiger, sulfoxidaciones, oxidaciones de amina, oxidaciones de seleniuro, halogenaciones, oxidaciones de ésteres de fosfito y oxidaciones de organoboro.

Las monooxigenasas se dividen en las siguientes familias: las monooxigenasas del citocromo P450 o las monooxigenasas dependientes de hemo (EC 1.14.13, EC 1.14.14, EC 1.14.15) es la familia más conocida y más grande de monooxigenasas y está presente principalmente en genomas eucariotas (mamíferos, plantas, hongos), así como bacterianos y son capaces de hidroxilar átomos de carbono no activados. Las monooxigenasas dependientes del hierro de no hemo (EC 1.14.16) catalizan reacciones de hidroxilación y epoxidación y utilizan dos átomos de hierro como cofactor. Las enzimas que pertenecen a esta familia incluyen alqueno monooxigenasas, fenol hidroxilasas, alcano hidroxilasas enlazadas a la membrana, así como monooxigenasas aromáticas. Las monooxigenasas dependientes del cobre (EC 1.14.17 y EC 1.14.18) representan una familia bastante pequeña de enzimas, que requieren iones de cobre para la hidroxilación de los sustratos. Las monooxigenasas dependientes de la flavina (EC 1.13.12 y EC 1.14.13) se hallan principalmente en genomas procariotas y se sabe que catalizan epoxidaciones, oxidaciones de Baeyer-Villiger y halogenaciones. De manera adicional, se descubrieron varios tipos nuevos de monooxigenasas que catalizan hidroxilaciones sin ser dependientes del cofactor (monooxigenasas independientes del cofactor), pero aceptan solo un intervalo restringido de sustratos. Por otro lado, la reacción de desacoplamiento puede revertirse; este mecanismo está presente en el ciclo catalítico de algunas monooxigenasas para usar peróxido de hidrógeno para producir el producto intermedio de enzima oxidativa. Un enfoque más universal y bien establecido implica la regeneración de NAD(P)H. Tanto la regeneración química como la enzimática se usan actualmente. La regeneración química puede usar un catalizador de complejo de rodio junto con formiato como sustrato que se oxida a dióxido de carbono. De este modo, los electrones se transfieren NAD(P)⁺ reduciendo la coenzima. Asimismo, la regeneración enzimática de NAD(P)H está bien establecida y se basa en una gran diversidad de deshidrogenasas dependientes de NAD(P)⁺ como formiato deshidrogenasa o glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Las enzimas fenol oxidasa preferidas son lacasas (EC 1.10.3.2), catecol oxidasas (EC 1.10.3.1), monofenol monooxigenasas (EC 1.14.18.1), ascorbato oxidasas (EC 1.10.3.3); peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP; EC 1.11.1.7).

De acuerdo con una realización preferida adicional, la enzima de procesamiento del fármaco es una peroxigenasa (EC 1.11.1 y 1.11.2). Las peroxigenasas no específicas fúngicas (EC 1.11.2.1) son capaces de oxifuncionalizar diversos compuestos mediante la transferencia de oxígeno transportado por peróxido a diversos sustratos. Las reacciones catalizadas son similares a aquellas que se catalizan mediante las monooxigenasas del citocromo P450 e incluyen hidroxilaciones de compuestos alifáticos, epoxidaciones de alquenos lineales, ramificados y cíclicos, desalquilaciones, oxidaciones de compuestos aromáticos y heterocíclicos, así como oxidaciones de heteroátomos orgánicos y haluros inorgánicos.

Los productos fenólicos son un producto de peroxigenaciones aromáticas y estos fenoles pueden ser posteriormente sujetos de reacciones de acoplamiento y polimerización a través de sus correspondientes radicales fenoxilo debido a la actividad peroxidativa de las enzimas. Estas enzimas se hallan principalmente en Basidiomycota y Ascomycota (por ejemplo, *Agrocybe aegerita*, *Coprinellus radians*, *Marasmius rotula*), pero también Mucoromycotina, Chytridiomycota, Glomeromycota y Oomycota, mientras que no se halló ninguna indicación de que estén presentes en plantas, animales o procariotas. El peróxido de hidrógeno necesario puede ser producido *in situ* mediante una diversidad de oxidasas como la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), la celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18) o la lactato oxidasa (EC 1.1.3.2), enzimas que producen H₂O₂ tras la oxidación de sustratos como glucosa, oligosacáridos, polisacáridos, lactato y otros muchos de los que están presentes en las formulaciones.

Las enzimas oxidantes de fenol son enzimas preferidas en las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención. En el contexto de la presente invención, la enzima oxidante de fenol puede ser una enzima que posee actividad de peroxidasa o una lacasa o una enzima relacionada con lacasa. Los compuestos que poseen actividad de peroxidasa pueden ser cualquier enzima de peroxidasa comprendida mediante la clasificación de enzima (EC 1.11.1.7) o cualquier fragmento derivado de la misma, que presente actividad de peroxidasa. Preferentemente, la peroxidasa de acuerdo con la invención es producible por las plantas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o de soja) o microorganismos, tales como hongos o bacterias. Algunos hongos preferidos incluyen cepas pertenecientes a la subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, por ejemplo, *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Verticillium*, *Arthromyces*, *Caldariomyces*, *Ulocladium*, *Embellisia*, *Cladosporium* o *Dreschlera*, en particular, *Fusarium oxysporum* (DSM 2672), *Humicola insolens*, *Trichoderma reesei*, *Myrothecium verrucaria* (IFO 6113), *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae*, *Arthromyces ramosus* (FERM P-7754),

Caldariomyces fumago, *Ulocladium chartarum*, *Embellisia alli* o *Dreschlera halodes*. Otros hongos preferidos incluyen cepas pertenecientes a la subdivisión Basidiomycotina, clase Basidiomycetes, por ejemplo, *Coprinus*, *Phanerochaete*, *Coriolus*, o *Trametes*, en particular, *Coprinus cinereus* f. *microsporus* (IFO 8371), *Coprinus macrorhizus*, *Phanerochaete chrysosporium* (por ejemplo, NA-12) o *Trametes* (anteriormente denominado *Polyporus*), por ejemplo, *T. versicolor* (por ejemplo, PR4 28-A). Otros hongos preferidos incluyen cepas que pertenecen a la subdivisión Zygomycotina, clase Mycoraceae, por ejemplo, *Rhizopus* o *Mucor*, en particular, *Mucor hiemalis*. Algunas bacterias preferidas incluyen cepas del orden Actinomycetales, por ejemplo, *Streptomyces spheroides* (ATCC 23965), *Streptomyces thermoviolaceus* (IFO 12382) o *Streptoverticillium verticillium* ssp. *verticillium*. Otras bacterias preferidas incluyen *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodomonas palustri*, *Streptococcus lactis*, *Pseudomonas purrocinia* (ATCC 15958), *Pseudomonas fluorescens* (NRRL B-II) y cepas de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus pumilus* (ATCC 12905) y *Bacillus stearothermophilus*. Las bacterias preferidas adicionales incluyen cepas que pertenecen a *Myxococcus*, por ejemplo, *M. virescens*. La peroxidasa puede ser, además, una que sea producible mediante un procedimiento que comprende cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de ADN recombinante que porta una secuencia de ADN que codifica dicha peroxidasa, así como secuencias de ADN que codifican funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN que codifica la peroxidasa, en un medio de cultivo en condiciones que permitan la expresión de la peroxidasa y la recuperación de la peroxidasa del cultivo. Particularmente, una peroxidasa producida recombinantemente es una peroxidasa derivada de una *Coprinus* sp., en particular, *C. macrorhizus* o *C. cinereus* de acuerdo con el documento WO 92/16634 A. En el contexto de la presente invención, los compuestos que poseen actividad de peroxidasa comprenden enzimas de peroxidasa y fragmentos activos de peroxidasa derivados de citocromos, hemoglobina o enzimas de peroxidasa.

La actividad de peroxidasa (POXU) se puede, por ejemplo, determinar de la siguiente manera: una unidad de peroxidasa (POXU) es la cantidad de enzima que cataliza, en las siguientes condiciones, la conversión de 1 pmol de peróxido de hidrógeno por minuto: tampón de fosfato 0,1 M a pH 7,0, peróxido de hidrógeno 0,88 mM, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) 1,67 mM a 30 °C. La reacción está seguida durante 60 segundos (15 segundos después del mezclado) por el cambio en la absorbancia a 418 nm, que debe estar en el intervalo de 0,15 a 0,30. Para el cálculo de la actividad, se usa un coeficiente de absorción de ABTS oxidado de 36 mM⁻¹ cm⁻¹ y una estequiometría de un pmol de H₂O₂ convertido por dos moles de ABTS oxidado.

Las enzimas preferidas también incluyen catecol oxidasas (EC 1.10.3.1), bilirrubina oxidasas (EC 1.3.3.5) monofenol monooxigenasas (EC 1.14.18.1), manganeso peroxidadas (EC 1.11.1.13), monofenol monooxigenasas (EC 1.14.99.1), tirosinasas (EC 1.14.18.1) y ascorbato oxidasas (EC 1.10.3.3).

Las enzimas adicionales específicamente preferidas que se usan como enzimas de procesamiento del fármaco de acuerdo con la presente invención incluyen las siguientes:

desmetilación en O (C3): citocromo P450 (EC 1.14; + hemo + un donador de H, tal como NAD(P)H), especialmente la subfamilia CYP2C; CYP2D6; monooxigenasa no específica (EC 1.14.14.1; + NAD(P)H), codeína 3-O-desmetilasa (CODM; EC 1.14.11.32; + 2-oxoglutarato (+ O₂)); tebaína 6-O-desmetilasa (T6ODM; EC 1.14.11.31; + 2-oxoglutarato (+ O₂)); peroxidadas (EC 1.11.1 y EC 1.11.2; + H₂O₂), especialmente peroxidasa de rábano picante (HRP, EC 1.11.1.7; + H₂O₂) y peroxigenasas no específicas de hongos (EC 1.11.2.1).

Preferentemente, la desmetilación en O se combina con etapas de procesamiento adicionales porque es posible que la oximorfona, alfa- y beta-oximorfol u otros productos de tipo oximorfona puedan dar como resultado tal desmetilación en O del fármaco diana, por ejemplo, en caso de oxicodona. Dado que la oximorfona podría tener un potencial de abuso similar al fármaco diana, se puede proporcionar una etapa adicional (es decir, procesamiento mediante una enzima de procesamiento de oximorfona adicional), tal como una etapa de glucuronidación.

La desmetilación en N (N17): CYP1-3 (todos: EC 1.14.14.1; + hemo + donador de H, tal como NAD(P)H, FAD, FMN, ferredoxina, etc.), preferentemente CYP3A, CYP1A, CYP2B, CYP2C y CYP2D, especialmente CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6, especialmente CYP3A4 y CYP3A5. Las peroxidadas (EC 1.11.1 y EC 1.11.2; + H₂O₂), peroxidasa de rábano picante (HRP, EC 1.11.1.7; + H₂O₂). La desmetilación en N puede conducir a productos, tales como noroxicodona (si, por ejemplo, se transforma oxicodona), noroximorfona, alfa- y beta-noroxicodol, o productos similares con poco o nulo potencial de abuso (aunque tienen una determinada actividad agonista opioide (pero muy baja), pero mucho menos que la oxicodona (también debido a su poca absorción en el cerebro)).

La reducción en ceto (C6): carbonil reductasa (NADPH) (EC 1.1.1.184; + NAD(P)H), tal como dihidromorfinona cetona reductasa (DMKR; tipos I a V) y dihidrocodeinona cetona reductasa (DCKR, tipos I y II); adicionalmente, deshidrogenasas, tales como morfina 6-deshidrogenasa (EC 1.1.1.218; + NAD(P)H). La reducción en ceto puede conducir a productos, tales como alfa- y beta-oxicodol, o nor-6-oxicodol, que no tienen (o solo un débil) potencial de abuso.

La oxidación en N (N): monooxigenasa que contiene flavina (EC 1.14.13.8; + NAD(P), FAD).

La hidroxilación en epoxi: epóxido hidrolasa microsomal (EC 3.3.2.9), epóxido hidratasa (EC 3.3.2.3 y 4.2.1.63), epóxido hidrolasa soluble (EC 3.3.2.10).

La glucuronidación: UDP-glucuronosiltransferasa (EC 2.4.1.17; + UDP-glucuronato), especialmente las enzimas UGT1 y UGT2, tales como UGT1.1, UGT2B7, bilirrubina glucuronósido glucuronosiltransferasa (EC 2.4.1.95; + UDP-glucuronato). En todos los casos, los cosustratos funcionalizados sintéticos se pueden usar, por ejemplo, en lugar de UDP-glucuronato para promover mejor la inactivación del fármaco diana que se puede añadir.

- 5 La acetilación: ac(et)iltransferasa (EC 2.3) y CoA-transferasa (EC 2.8.3), especialmente N-acetiltransferasa (NAT, EC 2.3.1, normalmente + acetil-Coenzima A (ac-CoA)) y O-acetiltransferasa (OAT; EC 2.3.1; normalmente + ac-CoA).

La sulfatación: sulfotransferasas (EC 2.8.2), especialmente las SULT transferasas humanas.

- 10 Una opción adicional para seleccionar enzimas de procesamiento del fármaco adecuadas es seleccionar enzimas desveladas para ser eficaces y específicas para un tipo de reacción dado (por ejemplo, desmetilación en O, desmetilación en N, reducción en ceto, hidroxilación en epoxi, oxidación en N o adición de moléculas (tales como glucuronidación y acetilación)) de bases de datos de enzimas, tales como el portal de enzimas BRENDA (BRaunschweig ENzyme DAtabase) (<http://www.brenda-enzymes.org>). BRENDA es el principal sistema de información de datos bioquímicos y moleculares funcionales de enzimas y proporciona acceso a siete bases de datos interconectadas.

BRENDA contiene 2.7 millones de datos anotados manualmente sobre la producción de enzimas, la función, la cinética y las propiedades moleculares. Cada entrada está conectada a una referencia y al organismo fuente. Los ligandos enzimáticos se almacenan con sus estructuras y se puede acceder a ellos a través de sus nombres, sinónimos o mediante una búsqueda de estructura.

- 20 FRENDA (Full Reference ENzyme DAta) y AMENDA (Automatic Mining of ENzyme DAta) se basan en procedimientos de extracción de textos y representan una encuesta completa de resúmenes de PubMed con información sobre enzimas en diferentes organismos, tejidos u orgánulos. La base de datos suplementaria DRENDA proporciona más de 910.000 nuevas relaciones de número de enfermedades EC en más de 510.000 referencias de búsqueda automática y una clasificación de información relacionada con enzimas y enfermedades. KENDA (Kinetic ENzyme DAta), una nueva modificación extrae y presenta los valores cinéticos de los resúmenes de PubMed.

La integración del EnzymeDetector ofrece una comparación automática, evaluación y predicción de anotaciones de la función enzimática para genomas procariotas. La base de datos de reacciones bioquímicas BKM-react contiene reacciones no redundantes catalizadas por enzimas y espontáneas y se desarrolló para facilitar y acelerar la construcción de modelos bioquímicos.

- 30 Las enzimas de procesamiento del fármaco a menudo requieren cofactores, tales como H₂, y/o donadores de electrones y aceptores, tales como NAD(P)H, FMN, FAD, ferredoxina, 2-oxoglutarato, hemos (superfamilia de CYP); o donadores para los grupos que se añadirán al fármaco diana (acetilo (tal como ac-CoA), glucuronato (tal como UDP-glucuronato), etc.). Estos cofactores también se proporcionan en la composición de acuerdo con la presente invención, a menos que tales factores estén, de alguna manera, ya presentes en una situación potencialmente abusiva (por ejemplo, si la composición se disuelve en una solución acuosa, el O₂ que se requiere para algunas de las reacciones de oxidación desveladas anteriormente o el H₂O necesario para la hidroxilación en epoxi estará disponible en tales condiciones abusivas; a veces, incluso los iones necesarios, siempre que estén contenidos en el disolvente de extracción). En la presente memoria descriptiva, a veces se mencionan explícitamente cofactores necesarios para la reacción enzimática específica con el fármaco diana (y proporcionados en la presente composición, por ejemplo, como grupos prostéticos directamente conectados a la enzima); sin embargo, la persona experta en la materia conoce bien los cofactores necesarios y las condiciones adecuadas para obtener una composición de acuerdo con la presente invención, en la que la actividad enzimática se optimiza normalmente para circunstancias abusivas, por ejemplo, cuando la composición se disuelve en agua o en un tampón acuoso.

- 45 En algunas realizaciones, se puede preferir proporcionar una combinación de enzimas (y sus respectivos cofactores) en la preparación de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, se puede preferir añadir enzimas de procesamiento adicionales, tales como glucuronidasas y/o acetiltransferasas para procesar adicionalmente los productos farmacológicos diana que surgen de la desmetilación en O, desmetilación en N, reducción en ceto, hidroxilación en epoxi u oxidación en N, por ejemplo, mediante la provisión de un derivado glucuronidado/acetilado en el grupo hidroxilo recién creado. Tales combinaciones también se pueden aplicar si el resultado del procesamiento del fármaco en sí mismo representa un objetivo potencial de abuso (como, por ejemplo, para la oximorfona).

- 50 Si la enzima de procesamiento del fármaco es una enzima dependiente de la membrana, la enzima puede proporcionarse en forma liposomal, preferentemente en forma de liposomas secos (en tales casos, se pueden añadir preferentemente sustancias adyuvantes, tales como sacarosa o trehalosa; véase, por ejemplo, Sun y col., Biophys. J 70 (1996): 1769-1776).

De acuerdo con una realización específica, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende una enzima adicional, preferentemente una enzima de procesamiento del fármaco adicional o una enzima que procesa adicionalmente las formas de fármaco procesadas, especialmente lacasa (EC 1.10.3.2).

Una realización específica de la presente invención, por lo tanto, proporciona adicionalmente una lacasa en la presente composición. La lacasa puede dimerizar o polimerizar (o iniciar o ayudar de otra manera a la polimerización de) las moléculas procesadas del fármaco. Aunque la lacasa en sí misma puede no constituir directamente una enzima de procesamiento del fármaco (porque no procesa el fármaco diana en sí mismo), la lacasa puede usarse con las enzimas de procesamiento del fármaco desveladas anteriormente para potenciar además el carácter de disuasión del abuso de las presentes composiciones. La lacasa también se puede usar con mediadores de electrones para oxidar directamente el fármaco diana o con cosustratos con determinadas funcionalidades (aminas fenólicas, aromáticas, dobles enlaces) para formar oligómeros o polímeros que evitan el abuso. Las lacasas también son adecuadas para crear hidrogeles, específicamente cuando se emplean con componentes que forman hidrogeles, tales como quitosano y/o catecol o carboximetilquitosano y/o vanilina. Las lacasas (EC 1.10.3.2; número de registro CAS 80498-15-3) son enzimas de oxidasa que contienen cobre, frecuentemente descritas y analizadas, que se encuentran en muchas plantas, hongos y microorganismos (Riva, Trends in Biotechnology 24 (2006), 219-226). Las lacasas actúan sobre fenoles y moléculas similares, realizando oxidaciones de un solo electrón. De acuerdo con la base de datos BRENDA, el nombre sistemático de lacasa es bencenodiol:oxidorreductasa de oxígeno. Las lacasas se definen como un grupo de proteínas multi-cobre de baja especificidad que actúa tanto sobre los o- como los p-quinoles y que a menudo también actúa sobre los aminofenoles y la fenilenodiamina. La semiquinona puede reaccionar además enzimáticamente o no enzimáticamente.

De manera adicional, algunos sustratos de no lacasa pueden oxidarse mediante el uso de mediadores para la reacción. Cuando estos mediadores de lacasa bien establecidos se oxidan mediante lacasa, generan fuertes especies reactivas oxidantes (radicales, quinonas radicales y quinonas) que pueden reaccionar adicionalmente con sustratos de no lacasa. Si el mediador oxidado de lacasa se reduce a su compuesto original, es de nuevo re-oxidado mediante lacasa para generar especies reactivas que pueden oxidar de nuevo otra molécula. Tales mediadores de lacasa son capaces de oxidar moléculas que no pueden ser oxidadas directamente mediante lacasa. Hay muchos tipos de mediadores usados en las formulaciones de lacasa, incluyendo mediadores centrados aromáticos (ArOH; por ejemplo, ácido ferúlico, siringaldehído) y mediadores centrados en nitrógeno (RNOH; por ejemplo, ácido violúrico, 1-hidroxibenzotriazol).

Los mediadores adecuados están ampliamente disponibles en el presente campo. Por ejemplo, en los documentos WO 95/01426 A1, WO 96/10079 A1 o WO 2012/085016 A1 se desvelan mediadores capaces de potenciar la actividad de las oxidorreductasas, especialmente de las enzimas oxidantes de fenol, tales como lacasa.

Otra estrategia implica el uso de cosustratos junto con lacasa. Los cosustratos se añaden a la reacción y se oxidan por la lacasa reaccionando posteriormente y formando enlaces covalentes con sustratos de no lacasa que dan como resultado oligómeros o polímeros. En general, muchos sustratos de lacasa pueden actuar como cosustratos para enlazarse a sustratos de no lacasas, tales como fenólicos (catecol), aminas aromáticas, alquenos, etc.

Las lacasas desempeñan un papel en la formación de lignina al promover el acoplamiento oxidativo de los monolignoles, una familia de fenoles naturales. Las lacasas pueden ser poliméricas y la forma enzimáticamente activa puede ser un dímero o trímero. Otras lacasas, tales como las producidas por el hongo *Pleurotus ostreatus*, desempeñan un papel en la degradación de la lignina y, por lo tanto, pueden incluirse en la amplia categoría de enzimas modificadoras de la lignina. Debido a que la lacasa pertenece a la familia de la enzima de oxidasa, requiere oxígeno como un segundo sustrato para la acción enzimática. La espectrofotometría se puede usar para detectar lacasas, usando los sustratos ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), siringaldazina, 2,6-dimetoxifenol y dimetil-p-fenilenodiamina. La actividad también se puede controlar con un sensor de oxígeno, ya que la oxidación del sustrato se combina con la reducción de oxígeno a agua.

La lacasa usada en la presente composición puede seleccionarse fácilmente y optimizarse por disponibilidad, reactividad con el fármaco seleccionado y las condiciones de almacenamiento y administración planificadas. Las lacasas están disponibles a través de diversas fuentes, por ejemplo, de hongos, bacterias o plantas. La mayoría de las lacasas comunes también se pueden producir de manera recombinante. Se prefiere la producción recombinante si se necesitan cantidades consistentes y continuas y en los casos en los que las fuentes naturales son problemáticas, por ejemplo, debido a posibles impurezas. Hay una serie de lacasas que se usan industrialmente y, por lo tanto, también están disponibles en cantidades necesarias para la producción en masa. Por ejemplo, las lacasas fúngicas están disponibles a través de *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Podospora*, *Phlebia* (*P. radiata*), *Coriolus* (*C. hirsutus*), *Botrytis*, *Polyporus* (*P. pinsitus* o *P. versicolor*, *Rhizoctonia solani*, *Scytalidium* (*S. thermophilum*), *Pyricularia* (*P. oryzae*), *Coprinus* (*C. cinereus*), *Trametes*, (*T. hirsuta*, *T. villosa* y *T. versicolor*), *Coriolopsis* (*C. gallica*), *Phanerochaete chrysosporium*, *Heterobasidion annosum*, *Spiniger meineckellus* y *Myceliophthora thermophila*; las lacasas bacterianas están disponibles a través de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Azospirillum*. Las lacasas específicamente preferidas son de *Trametes villosa*, de *Myceliophthora thermophila* y de *Pleurotus ostreatus*.

Las lacasas preferidas son aquellas que ya se aplican industrialmente, por ejemplo, aquellas usadas en biosensores basados en lacasa, tal como se revisaron en Rodríguez-Delgado y col. (Trends Anal. Chem. 74 (2015), 21-45, especialmente en el punto 2 y en las Tablas 2 a 5 de este documento). Otros ejemplos adecuados y preferidos de lacasas se desvelan en el documento WO 00/27204 A1, tales como las lacasas de hongos que incluyen una lacasa derivable de una cepa de *Aspergillus*, *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*,

Lentinus, *Pleurotus*, *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* y *T. versicolor*, *Rhizoctonia*, por ejemplo, *R. solani*, *Coprinus*, por ejemplo, *C. cinereus*, *C. comatus*, *C. friesii*, y *C. plicatilis*, *Psathyrella*, por ejemplo, *P. condelleana*, *Panaeolus*, por ejemplo, *P. papilionaceus*, *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*, *Schytalidium*, por ejemplo, *S. thermophilum*, *Polyporus*, por ejemplo, *P. pinsitus*, *Pycnoporus*, por ejemplo, *P. cinnabarinus*, *Phlebia*, por ejemplo, *P. radita* (documento WO 92/01046 A), o *Coriolus*, por ejemplo, *C. hirsutus* (documento JP 2-238885); los ejemplos de bacterias incluyen una lacasa derivable de una cepa de *Bacillus*; lacasas derivadas de *Coprinus*, *Myceliophthora*, *Polyporus*, *Pycnoporus*, *Scytalidium* o *Rhizoctonia*; lacasas derivadas de *Coprinus cinereus*, *Myceliophthora thermophila*, *Polyporus pinsitus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Scytalidium thermophilum* o *Rhizoctonia solani*.

Una manera de determinar la actividad de lacasa (LACU) es la determinación de la actividad de lacasa a partir de la oxidación de la siringaldazina en condiciones aeróbicas. El color violeta producido se mide espectrofotométricamente a 530 nm. Las condiciones analíticas son siringaldazina 19 mM, tampón de acetato 23 mM, pH 5,5, 30 °C, tiempo de reacción de 1 minuto. 1 unidad de lacasa (LACU) es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1,0 pmol de siringaldazina por minuto en estas condiciones (documento WO 00/27204 A1).

La presente invención proporciona la combinación del fármaco diana con enzimas de procesamiento del fármaco como un enfoque novedoso para formulaciones farmacológicas farmacéuticas disuasivas del abuso. La nueva estrategia sobre la que se basa la presente invención es el uso de una enzima de procesamiento del fármaco (o un sistema enzimático) para convertir un fármaco en una forma no activa (por ejemplo, en un producto precipitado o inactivado o menos activo) haciéndolo no usable (por ejemplo, transformándolo en una forma inactiva (o al menos: menos activa) o haciendo que sea imposible inyectar el fármaco con una jeringa). Por otro lado, si el fármaco diana se administra según lo previsto (por ejemplo, por vía oral), las proteasas del cuerpo (o el entorno total del estómago y el intestino delgado) desactivan la enzima de procesamiento del fármaco y el fármaco diana puede desplegar su efecto sin ser inactivado por la enzima acompañante. Para una degradabilidad de proteasa mejorada, las enzimas de procesamiento del fármaco se pueden modificar mediante la introducción de sitios de escisión de proteasa (adicionales) para aumentar la velocidad de degradación de estas enzimas después de la exposición a tales proteasas.

Un requisito previo de la estrategia de disuasión del abuso de acuerdo con la presente invención es que durante el almacenamiento y antes de su uso la composición de acuerdo con la presente invención que contiene una combinación del fármaco diana y la enzima de procesamiento del fármaco se mantenga en un entorno en el que la enzima de procesamiento del fármaco no reaccione (todavía) con el fármaco diana. Esto puede, por ejemplo, protegerse manteniendo (almacenando) ambos componentes en condiciones en las que la enzima de procesamiento del fármaco está inactiva o por separación espacial de los dos componentes. Por ejemplo, si la composición se mantiene en forma seca, la enzima de procesamiento del fármaco no puede reaccionar con el fármaco diana porque tal reacción requiere condiciones acuosas. Tan pronto como una composición seca de acuerdo con la presente invención se disuelve en agua (por ejemplo, con el fin de extraer el fármaco opioide para abuso), la enzima de procesamiento del fármaco puede reaccionar con el fármaco diana y enzimáticamente transforma el fármaco diana en una molécula que ya no puede (ab)usarse más debido a su degradación o porque está polimerizado. Otro ejemplo para evitar que la enzima de procesamiento del fármaco reaccione sobre el fármaco diana es separar espacialmente la enzima de procesamiento del fármaco diana del fármaco diana de tal manera que, de nuevo, solo después del contacto de la composición con agua o un disolvente comparable, la enzima de procesamiento del fármaco puede reaccionar en el fármaco diana. Tal separación espacial puede, por ejemplo, establecerse proporcionando la enzima de procesamiento del fármaco y el fármaco diana en diferentes compartimentos de la formulación farmacéutica, proporcionando recubrimientos específicos, por granulación separada, etc.

Por otro lado, la enzima de procesamiento del fármaco en las composiciones de acuerdo con la presente invención debe ser reactiva, por ejemplo, una vez se expone al entorno acuoso o a otras situaciones que no están en línea con las vías de administración o actividades de administración previstas (es decir, si es probable que haya abuso), tiene que reaccionar con el fármaco diana acompañante para prevenir o al menos disuadir el abuso de este fármaco.

La nueva estrategia de disuasión del abuso de acuerdo con la presente invención es, en principio, aplicable para cualquier fármaco diana que tenga un riesgo de abuso. Para cada uno de tales fármacos, se puede hallar una enzima adecuada (o sistema enzimático) de acuerdo con los fundamentos dados en la presente memoria descriptiva.

Los fármacos diana preferidos de acuerdo con la presente invención son aquellos fármacos con el mayor potencial de abuso, especialmente opioides, anfetaminas sustituidas, barbitúricos, benzodiazepinas (particularmente flunitrazepam, oxazepam, alprazolam, lorazepam, diazepam y clonazepam), cocaína, metacualona, cáñamo. Los opioides preferidos sometidos a la estrategia de disuasión del abuso de acuerdo con la presente invención se seleccionan del grupo morfina, tapentadol, oxycodona, buprenorfina, cebranopadol, diamorfina (= heroína), dihidrocodeína, etilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, metadona y levometadona, oximorfona, pentazocina, petidina, fentanilo, levorfanol y levometorfanol y sales, ésteres, profármacos y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Otros fármacos diana preferidos se pueden seleccionar del grupo que consiste en opiáceos, opioides,

tranquilizantes, preferentemente benzodiazepinas, estimulantes y otros narcóticos. La forma de dosificación de acuerdo con la invención es particularmente adecuada para prevenir el abuso de opiáceos, opioides, tranquilizantes y otros narcóticos que se seleccionan del grupo que consiste en N-{1-[2-(4-etil-5-oxo-2-tetrazolin-1-il)etil]-4-metoximetil-4-piperidil}propionanilida (alfentanilo), ácido 5,5-dialilbarbitúrico (alobarbital), alilprodina, alfaprodina, 8-cloro-1-metil-6-fenil-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]-benzodiazepina (alprazolam), 2-dietilaminopropiofenona (anfeparamona), (±)-[alfa]-metilfenetilamina (anfetamina), 2-([alfa]-metilfenetilamino)-2-fenilacetnitrilo (anfetaminilo), ácido 5-etil-5-isopentilbarbitúrico (amobarbital), anileridina, apocodeína, ácido 5,5-dietilbarbitúrico (barbital), bencilmorfina, becitrámida, 7-bromo-5-(2-piridil)-1H-1,4-benzodiazepina-2(3H)-ona (bromazepam), 2-bromo-4-(2-clorofenil)-9-metil-6H-tieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepina (brotizolam), 17-ciclopropilmetil-4,5[alfa]-epoxi-7[alfa]([S]-1-hidroxi-1,2,2-trimetil-propil)-6-metoxi-6,14-endo-etanomorfina-3-ol (buprenorfina), ácido 5-butil-5-etilbarbitúrico (butobarbital), butorfanol, (7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-2-oxo-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-3-il)dimetilcarbamato (camazepam), (1S, 2S)-2-amino-1-fenil-1-propanol (catina/D-norpseudoefedrina), 7-cloro-N-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-2-ilamina 4-óxido (clordiazepóxido), 7-cloro-1-metil-5-fenil-1H-1,5-benzodiazepina-2,4(3H,5H)-diona (clobazam), 5-(2-clorofenil)-7-nitro-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (clonazepam), clonitaceno, ácido 7-cloro-2,3-dihidro-2-oxo-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepina-3-carboxílico (clorazepato), 5-(2-clorofenil)-7-etil-1-metil-1H-tieno[2,3-e][1,4]diazepin-2(3H)-ona (clotiazepam), 10-cloro-11b-(2-clorofenil)-2,3,7,11b-tetrahydrooxazolo[3,2-d][1,4]benzodiazepin-6(5H)-ona (cloxazolam), (-)-metil-[3-[beta]-benzoiloxi-2[beta](1[alfa]H,5[alfa]H)-carboxilato de tropano] (cocaína), 4,5[alfa]-epoxi-3-metoxi-17-metil-7-morfina-6[alfa]-ol (codeína), ácido 5-(1-ciclohexenil)-5-etilbarbitúrico (ciclobarbitál), ciclorfano, ciprenorfina, 7-cloro-5-(2-clorofenil)-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (delorazepam), desomorfina, dextromoramida, (+)-(1-bencil-3-dimetilamino-2-metil-1-fenilpropil)propionato (dextropropoxifeno), dezocina, diampromida, diamorfona, 7-cloro-1-metil-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (diazepam), 4,5[alfa]-epoxi-3-metoxi-17-metil-6[alfa]-morfina-6[alfa]-ol (dihidrocodeína), 4,5[alfa]-epoxi-17-metil-3,6[alfa]-morfina-6[alfa]-ol (dihidromorfina), dimenoxadol, dimefetamol, dimetiltiambuteno, butirato de dioxafetilo, dipipanona, (6aR,10aR)-6,6,9-trimetil-3-pentil-6a,7,8,10a-tetrahidro-6H-benzo[c]cromen-1-ol (dronabinol), eptazocina, 8-cloro-6-fenil-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepina (estazolam), etoheptazina, etilmetiltiambuteno, [7-cloro-5-(2-fluorofenil)-2,3-dihidro-2-oxo-1H-1,4-benzodiazepina-3-carboxilato] de etilo (loflazepato de etilo), 4,5a-epoxi-3-etoxi-17-metil-7-morfina-6a-ol (etil morfina), etonitaceno, 4,5[alfa]-epoxi-7[alfa]-(1-hidroxi-1-metilbutil)-6-metoxi-17-metil-6,14-endo-eteno-morfina-3-ol (etorfina), N-etil-3-fenil-8,9,10-trinorbornan-2-ilamina (fencamfamina), 7-[2-([alfa]-metilfenetilamino)etil]-teofilina (fenetilina), 3-([alfa]-metilfenetilamino)propionitrilo (fenproporex), N-(1-fenil-4-piperidil)propionanilida (fentanilo), 7-cloro-5-(2-fluorofenil)-1-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (fludiazepam), 5-(2-fluorofenil)-1-metil-7-nitro-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (flunitrazepam), 7-cloro-1-(2-dietilaminoetil)-5-(2-fluorofenil)-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (flurazepam), 7-cloro-5-fenil-1-(2,2,2-trifluoroetil)-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (halazepam), 10-bromo-11b-(2-fluorofenil)-2,3,7,11b-tetrahidro[1,3]oxazolo[3,2-d][1,4]benzodiazepin-6(5H)-ona (haloxazolam), heroína, 4,5[alfa]-epoxi-3-metoxi-17-metil-6-morfina-6[alfa]-ol (hidrocodona), 4,5[alfa]-epoxi-3-hidroxi-17-metil-6-morfina-6[alfa]-ol (hidromorfona), hidroxi-petidina, isometadona, hidroximetilmorfina, 11-cloro-8,12b-dihidro-2,8-dimetil-12b-fenil-4H-[1,3]oxazino[3,2-d][1,4]benzodiazepina-4,7(6H)-diona (ketazolam), 1-[4-(3-hidroxifenil)-1-metil-4-piperidil]-1-propanona (cetobemidona), acetato de (3S,6S)-6-dimetilamino-4,4-difenilheptan-3-ilo (levacetilmetadol (LAAM)), (-)-6-dimetilamino-4,4-difenol-3-heptanona (levometadona), (-)-17-metil-3-morfina-6[alfa]-ol (levorfanol), levofenacilmorfano, lofentanilo, 6-(2-clorofenil)-2-(4-metil-1-piperazinilmetileno)-8-nitro-2H-imidazo[1,2-a][1,4]benzodiazepin-1(4H)-ona (loprazolam), 7-cloro-5-(2-clorofenil)-3-hidroxi-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (lorazepam), 7-cloro-5-(2-clorofenil)-3-hidroxi-1-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (lormetazepam), 5-(4-clorofenil)-2,5-dihidro-3H-imidazo[2,1-a]isindol-5-ol (mazindol), 7-cloro-2,3-dihidro-1-metil-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepina (medazepam), N-(3-cloropropil)-[alfa]-metilfenetilamina (mefenorex), meperidina, dicarbamato de 2-metil-2-propiltrimetileno (meprobamato), meptazinol, metazocina, metilmorfina, N,[alfa]-dimetilfenetilamina (metanfetamina), (±)-6-dimetilamino-4,4-difenol-3-heptanona (metadona), 2-metil-3-o-tolil-4(3H)-quinazolinona (metacualona), [2-fenil-2-(2-piperidil)acetato] de metilo (metilfenidato), ácido 5-etil-1-metil-5-fenilbarbitúrico (metilfenobarbital), 3,3-dietil-5-metil-2,4-piperidinadiona (metiprilon), metopon, 8-cloro-6-(2-fluorofenil)-1-metil-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepina (midazolam), 2-(bencidrilisulfonil)acetamida (modafinilo), 4,5[alfa]-epoxi-17-metil-7-morfina-3,6[alfa]-diol (morfina), mirofina, (±)-trans-3-(1,1-dimetilheptil)-7,8,10,10[alfa]-tetrahidro-1-hidroxi-6,6-dimetil-6H-dibenzo-[b,d]piran-9(6[alfa]H)-ona (nabilona), nalbufeno, nalorfina, narceína, nicomorfina, 1-metil-7-nitro-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (nimetazepam), 7-nitro-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (nitrazepam), 7-cloro-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (nordazepam), norlevorfanol, 6-dimetilamino-4,4-difenil-3-hexanona (normetadona), normorfina, norpipanona, la exudación de plantas pertenecientes a la especie *Papaver somniferum* (opio), 7-cloro-3-hidroxi-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (oxazepam), (cis-trans)-10-cloro-2,3,7,11b-tetrahidro-2-metil-11b-feniloxazolo[3,2-d][1,4]benzodiazepin-6(5H)-ona (oxazolam), 4,5[alfa]-epoxi-14-hidroxi-3-metoxi-17-metil-6-morfina-6[alfa]-ol (oxicodona), oximorfona, plantas y partes de plantas pertenecientes a la especie *Papaver somniferum* (incluyendo la subespecie *setigerum*) (*Papaver somniferum*), *papaveretum*, 2-imino-5-fenil-4-oxazolidinona (permolina), 1,2,3,4,5,6-hexahidro-6,11-dimetil-3-(3-metil)-2-butenil)-2,6-metano-3-benzazocin-8-ol (pentazocina), ácido 5-etil-5-(1-metilbutil)-barbitúrico (pentobarbital), (1-metil-4-fenil-4-piperidinacarboxilato) de etilo (petidina), fenadoxona, fenomorfanol, fenazocina, fenoperidina, piminodina, folcodeína, 3-metil-2-fenilmorfina (fenmetrazina), ácido 5-etil-5-fenilbarbitúrico (fenobarbital), [alfa],[alfa]-dimetilfenetilamina (fentermina), 7-cloro-5-fenil-1-(2-propinil)-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (pinazepam), alcohol de [alfa]-(2-piperidil)bencidrilol (pipradrol), 1'-(3-ciano-3,3-difenilpropil)[1,4'-bipiperidina]-4'-carboxamida (pirritamida), 7-cloro-1-(ciclopropilmetil)-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (prazepam), profadol, proheptazina, promedol, properidina, propoxifeno, N-(1-metil-2-piperidinoetil)-N-(2-piridil)propionamida, {3-[4-metoxycarbonil-4-(N-fenilpropanamido)piperidino]propanoato} de metilo (remifentanilo), ácido 5-sec-butil-5-

etilbarbitúrico (secbutabarbita), ácido 5-alil-5-(1-metilbutil)-barbitúrico (secobarbita), N-{4-metoximetil-1-[2-(2-tienil)etil]-4-piperidil}propionanilida (sufentanilo), 7-cloro-2-hidroxi-metil-5-fenil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (temazepam), 7-cloro-5-(1-ciclohexenil)-1-metil-1H-1,4-benzodiazepin-2(3H)-ona (tetrazepam), etil(2-dimetilamino-1-fenil-3-ciclohexeno-1-carboxilato) (tilidina, cis y trans)), tramadol, 8-cloro-6-(2-clorofenil)-1-metil-4H-[1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepina (triazolam), ácido 5-(1-metilbutil)-5-vinilbarbitúrico (vinilbital), (1R*,2R*)-3-(3-dimetilamino-1-etil-2-metil-propil)-fenol, (1R,2R,4S)-2-(dimetilamino)metil-4-(p-fluorobenciloxi)-1-(m-metoxifenil)ciclohexanol, en cada caso, opcionalmente, en la forma de compuestos estereoisoméricos correspondientes y derivados correspondientes, en particular, ésteres o éteres, y respectivos compuestos fisiológicamente aceptables correspondientes, en particular, sales y solvatos.

Los opioides específicamente preferidos se pueden seleccionar del grupo que consiste en opioides que comprenden un grupo hidroxi fenólico, tales como morfina, tapentadol, hidromorfona, etorfina, desomorfina, oximorfona, buprenorfina, péptidos opioides que comprenden un residuo de fenilalanina, tales como adrenorfina, amidorfina, casomorfina, DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-encefalina), DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-encefalina), dermorfina, endomorfina, morfeceptina y TRIMU 5 (L-tirosil-N-[(3-metilbutil)amino]acetil)-D-alaninamida); oripavina, 6-MDDM (6-metilenodihidrodexomorfina), clornaltrexamina, dihidromorfina, hidromorfinol, metildesorfina, N-fenetilnormorfina, RAM-378 (7,8-dihidro-14-hidroxi-N-fenetilnormorfina), heterocodeína, 7-espiroindaniloximorfona, morfina, pentamorfona, semorfona, cloromorfida, nalbufina, oximorfazona, 1-yodomorfina, morfina-6-glucurónido, 6-monoacetilmorfina, normorfina, morfina-N-óxido, ciclorfano, dextralorfano, levorfanol, levofenacilmorfano, norlevorfanol, oxilorfano, fenomorfano, furetilnorlevorfanol, xorfanol, butorfanol, 6,14-endoetenotetrahidronoripavina, BU-48 (N-ciclopropilmetil-[7 α ,8 α ,2',3']-ciclohexano-1'[S]-hidroxi-6,14-endo-etenotetrahidronoripavina), buprenorfina, ciprenorfina, dihidroetorfina, etorfina, norbuprenorfina, 5'-guanidinonaltrindol, diprenorfina, levalorfanol, metilnaltrexona, nalfurafina, nalmefeno, naloxazona, naloxona, nalorfina, naltrexona, naltribeno, naltrindol, 6 β -naltrexol-d4, pseudomorfina, naloxonazina, norbinaltorfimina, alazocina, bremazocina, dezocina, cetazocina, metazocina, pentazocina, fenazocina, ciclazocina, hidroxipetidina (bemidona), cetobemidona, preferentemente morfina, tapentadol, buprenorfina, especialmente morfina. Un ejemplo de un fármaco opioide con un grupo amino fenólico es anileridina. Estos opioides mencionados anteriormente pueden, por ejemplo, procesarse mediante lacasa como enzima de procesamiento del fármaco.

Las composiciones farmacéuticas específicamente preferidas de acuerdo con la presente invención son composiciones en las que el fármaco con potencial de abuso se selecciona de morfina, oxicodona, tapentadol, diacetilmorfina, hidromorfona, metadona, oximorfona y dihidrocodeína.

Preferentemente, la morfina se somete a oxidación en fenol en C3 mediante lacasas (EC 1.10.3.2) y enzimas relacionadas: por ejemplo, catecol oxidasas (EC 1.10.3.1), monofenol monooxigenasas (EC 1.14.18.1), ascorbato oxidasas (EC 1.10.3.3), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); desalquilación en N mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP3A4; CYP2C8), monooxigenasas (EC 1.14), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); reducción en cetox/oxidación en OH en C6 mediante morfina deshidrogenasa (EC 1.1.1.218), oxidasas secundarias de alcohol (EC 1.1.3.18); oxidación en N en N17 mediante peroxidasas/poroxigenasas (EC 1.11), FAD-monooxigenasas (EC 1.14.13.8); hidratación en epoxi en C4/5 mediante epóxido hidrolasa (EC 3.3.2.9); mediante otra actividad de oxigenasa con una introducción adicional de oxígeno mediante hidroxilación de fenol mediante fenol 2-monooxigenasa (EC 1.14.13.7); adición de moléculas en C3/C6 mediante glucuronosil transferasas, N-acetiltransferasas, sulfotransferasas, O-metiltransferasas (EC 2.1.1).

Preferentemente, el tapentadol se somete a oxidación de fenol en C1 mediante lacasas (EC 1.10.3.2) y enzimas relacionadas: por ejemplo, catecol oxidasas (EC 1.10.3.1), monofenol monooxigenasas (EC 1.14.18.1), ascorbato oxidasas (EC 1.10.3.3), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); desalquilación en N mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP3A4; CYP2C8), monooxigenasas (EC 1.14), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); oxidación en N mediante peroxidasas/poroxigenasas (EC 1.11), FAD-monooxigenasas (EC 1.14.13.8); mediante otra actividad de oxigenasa mediante hidroxilación mediante CYP2D6; adición de moléculas en C1 mediante glucuronosil transferasas y N-acetiltransferasas.

Preferentemente, la oxicodona se somete a desalquilación en O mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP2D6); monooxigenasas (EC 1.14); peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); desalquilación en N mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP3A4; CYP2C8), monooxigenasas (EC 1.14), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); reducción en cetox/oxidación en OH mediante 3 alfa-hidroxiesteroide3-deshidrogenasa (EC 1.1.1.213); NADPH deshidrogenasa (OYE); 20 alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa (EC 1.1.1.149); oxidación en N en N17 mediante peroxidasas/poroxigenasas (EC 1.11), FAD-monooxigenasas (EC 1.14.13.8); hidratación en epoxi en C4/5 mediante epóxido hidrolasa (EC 3.3.2.9); mediante monooxigenasa no específica (EC 1.14.14.1), mediante otra actividad de oxigenasa con una introducción adicional de oxígeno mediante reacción de Baeyer-Villiger catalizada por monooxigenasa (EC 1.14.13.7); condensación aldólica (dimerización) mediante aldolasas (EC 4.1.2).

Preferentemente, la diacetilmorfina se somete a desalquilación en N mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP3A4; CYP2C8), monooxigenasas (EC 1.14), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); oxidación en N en N17 mediante peroxidasas/poroxigenasas (EC 1.11), FAD-monooxigenasas (EC 1.14.13.8); hidratación en epoxi en C4/5 mediante epóxido hidrolasa (EC 3.3.2.9); mediante otra actividad de

oxigenasa con una introducción adicional de oxígeno; retirada de moléculas mediante desacetilación con enzimas hidrolíticas, por ejemplo, esterasas, cutinasas; carboxilesterasa (EC 3.1.1.1), acetilesterasa (EC 3.1.1.6); colinaesterasa (EC 3.1.1.8).

5 Preferentemente, la hidromorfona se somete a oxidación de fenol en C3 mediante lacasas (EC 1.10.3.2) y enzimas relacionadas: por ejemplo, catecol oxidasas (EC 1.10.3.1), monofenol monooxigenasas (EC 1.14.18.1), ascorbato oxidasas (EC 1.10.3.3), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); desalquilación en N mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP3A4; CYP2C8), monooxigenasas (EC 1.14); reducción en cetox/oxidación en OH en C6 mediante 3 alfa-hidroxiesteroide 3-deshidrogenasa (EC 1.1.1.213), NADPH deshidrogenasa (OYE); oxidación en N en N17 mediante peroxidasas/poroxigenasas (EC 1.11), FAD-monooxigenasa (EC 1.14.13.8); hidratación en epoxi en C4/5 mediante epóxido hidrolasa (EC 3.3.2.9); mediante otra actividad de oxigenasa mediante ciclooxigenasa (EC 1.14.99.1), mediante monooxigenasa no específica (EC 1.14.14.1), formación de dihidromorfina, reacción de Baeyer-Villiger, mediante hidroxilación de fenol mediante fenol 2-monooxigenasa (EC 1.14.13.7); adición de moléculas en C3 mediante glucuronosil transferasas, N-acetiltransferasas, sulfotransferasas; condensación aldólica (dimerización) mediante aldolasas (EC 4.1.2).

15 Preferentemente, la metadona se somete a desalquilación en N mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP3A4; CYP2C8), monooxigenasas (EC 1.14), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); reducción en cetox/oxidación en OH en C5 a metadol mediante NADPH deshidrogenasa (OYE); mediante otra actividad de oxigenasa mediante monooxigenasas (EC 1.14.13), con una introducción adicional de oxígeno y formación de grupos fenólicos, mediante la reacción de Baeyer-Villiger.

20 Preferentemente, la oximorfona se somete a oxidación en fenol en C3 mediante lacasas (EC 1.10.3.2) y enzimas relacionadas: por ejemplo, catecol oxidasas (EC 1.10.3.1), monofenol monooxigenasas (EC 1.14.18.1), ascorbato oxidasas (EC 1.10.3.3), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); desalquilación en N mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP3A4; CYP2C8), monooxigenasas (EC 1.14), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); reducción en cetox/oxidación en OH mediante 3 alfa-hidroxiesteroide 3-deshidrogenasa (EC 1.1.1.213), NADPH deshidrogenasa (OYE); oxidación en N en N17 mediante peroxidasas/poroxigenasas (EC 1.11), FAD-monooxigenasa (EC 1.14.13.8); hidratación en epoxi en C4/5 mediante epóxido hidrolasa (EC 3.3.2.9); mediante otra actividad de oxigenasa con una introducción adicional de oxígeno mediante hidroxilación de fenol mediante fenol 2-monooxigenasa (EC 1.14.13.7); adición de moléculas en C3 mediante glucuronosil transferasas, N-acetiltransferasas, sulfotransferasas; condensación aldólica (dimerización) mediante aldolasas (EC 4.1.2).

35 Preferentemente, la dihidrocodeína se somete a desalquilación en O y desalquilación en N mediante la función oxidasa mixta Cyt.P450 (CYP3A4; CYP2C8), monooxigenasas (EC 1.14), peroxidasas, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7); reducción en cetox/oxidación en OH en C6 mediante morfina deshidrogenasa (EC 1.1.1.218), oxidasas de alcohol secundario (EC 1.1.3.18), codeinona reductasa (EC 1.1.1.247); oxidación en N en N17 mediante peroxidasas/poroxigenasas (EC 1.11), FAD-monooxigenasa (EC 1.14.13.8); hidratación en epoxi en C4/5 mediante epóxido hidrolasa (EC 3.3.2.9); mediante otra actividad de oxigenasa con una introducción adicional de oxígeno; adición de moléculas en C3/C6 mediante glucuronosil transferasas, N-acetiltransferasas, sulfotransferasas.

40 Las composiciones farmacéuticas específicamente preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden, por lo tanto, morfina, oxycodona, tapentadol, diacetilmorfina, hidromorfona, metadona, oximorfona o dihidrocodeína (como fármacos con potencial de abuso) con una enzima, tal como se ha descrito anteriormente (como enzima de procesamiento del fármaco).

45 Las composiciones farmacéuticas preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden como enzima de procesamiento del fármaco/fármaco una combinación seleccionada de morfina/lacasa, tapentadol/lacasa, oximorfona/lacasa, hidromorfona/lacasa, pentazocina/lacasa, buprenorfina/lacasa, diacetilmorfina/hidrolasa/lacasa, levorfanol/lacasa y enzima de procesamiento de oxycodona/lacasa/oxycodona.

50 La presente composición farmacéutica puede formularse de acuerdo con la vía de administración prevista (no disuasiva del abuso), si es necesario, adaptada a la presente invención (por ejemplo, cuando la enzima de procesamiento del fármaco y el fármaco diana están espacialmente separados). Preferentemente, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se proporciona como una unidad de dosis. Por lo tanto, se prefiere proporcionar la presente composición como un comprimido, por ejemplo, un mini-comprimido (es decir, comprimidos pequeños con un diámetro de 3 mm o por debajo), un comprimido de núcleo recubierto (comprimido recubierto), un comprimido de dos capas, un comprimido de múltiples capas, una cápsula, un comprimido efervescente, un comprimido soluble, un comprimido dispersable, una pella, un MUPS (sistema de pellas de múltiples unidades), un granulado, un polvo, especialmente formas recubiertas, recubiertas de azúcar y/o funcionalmente recubiertas de los mismos (por ejemplo, con recubrimiento entérico). Los recubrimientos entéricos son específicamente ventajosos para la prevención de la inactivación prematura de la enzima de procesamiento del fármaco, es decir, antes de que las proteasas fisiológicas actúen sobre la enzima de procesamiento del fármaco. Un recubrimiento entérico generalmente se define como una barrera polimérica aplicada sobre medicamentos orales para proteger los fármacos de la acidez del estómago. Los recubrimientos entéricos son, por lo tanto, generalmente

estables al pH altamente ácido encontrado en el estómago, pero se degradan rápidamente a un pH menos ácido (relativamente más básico, pH 7-9) en el intestino (es decir, después de abandonar el estómago). Las sustancias/materiales típicos usados para tales recubrimientos entéricos son goma laca, acetato ftalato de celulosa (CAP), acetato ftalato de polivinilo (PVAP), hidroxipropilmetilcelulosa ftalato y copolímeros de éster de ácido metacrílico, o zeína, por ejemplo, así como polímeros hidrófobos o hidrófilos y mezclas de tales sustancias, si corresponde. Los recubrimientos poliméricos hidrófobos incluyen polímero acrílico, copolímero acrílico, polímero metacrílico o copolímero metacrílico, incluyendo Eudragit® L100, Eudragit® L100-55, Eudragit® L 30D-55, Eudragit® S100, Eudragit® 4135F, Eudragit® RS, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, copolímero de alquilamina de ácido metacrílico, metacrilato de polimetilo, anhídrido de ácido polimetacrílico, polimetacrilato, poliacrilamida, anhídrido de ácido polimetacrílico y copolímeros de metacrilato de glicidilo, una alquilcelulosa, tal como etilcelulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxialquilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosas, tales como ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, y acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa y acetato trimaleato de celulosa, acetato ftalato de polivinilo, poliéster, ceras, goma laca, zeína o similares. El recubrimiento también puede incluir materiales hidrófilos, tales como un polímero soluble en agua farmacéuticamente aceptable, tal como óxido de polietileno (PEO), copolímeros de óxido de etileno-óxido de propileno, polietileno-polipropilenglicol (por ejemplo, poloxámero), carbómero, policarbofilo, quitosano, polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), hidroxialquil celulosas, tales como hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxietil metilcelulosa, poliacrilatos, tales como carbómero, poliacrilamidas, polimetacrilamidas, polifosfazinas, polioxazolidinas, ácidos polihidroxialquilcarboxílicos, ácido alginico y sus derivados, tales como alginatos de carragenatos, alginato de amonio y alginato de sodio, almidón y derivados de almidón, polisacáridos, carboxipolimetileno, polietilenglicol, gelatina o similares.

Los materiales de recubrimiento entérico preferidos son copolímeros de acrilato de metilo-ácido metacrílico, acetato succinato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato ftalato de polivinilo (PVAP), copolímeros de metacrilato de metilo-ácido metacrílico, goma laca, acetato trimelitato de celulosa, alginato de sodio y zeína.

Una realización adicional de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es una composición de recubrimiento en la que el recubrimiento comprende la enzima de procesamiento del fármaco. La enzima de procesamiento del fármaco actúa sobre el fármaco diana cuando la composición de recubrimiento se disuelve en líquidos acuosos (para extraer los fármacos (opioides)), mientras que la enzima de procesamiento del fármaco se destruye o inactiva inmediatamente después de la ingestión (de acuerdo con la vía de administración recetada (oral)) en el estómago o en el intestino.

Dado que se supone que las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se administran a pacientes humanos que necesitan los fármacos contenidos en las mismas, las preparaciones se fabrican y terminan como preparaciones farmacéuticas de acuerdo con las GMP, preferentemente de acuerdo con las normas proporcionadas por la Farmacopea Europea. Esto implica que las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se comercialicen en forma apropiadamente estéril, limpia y adecuadamente envuelta, según lo requerido por las autoridades reguladoras de productos farmacológicos comercializados, especialmente según lo requerido por la EMA de fármacos opioides, tales como morfina u oxicodona.

Una realización específicamente preferida es una composición en la que la enzima de procesamiento del fármaco está recubierta para mantener inactiva la enzima de procesamiento del fármaco en el fármaco diana siempre que se siga la vía de administración planificada, es decir, que mantenga la actividad de la enzima de procesamiento del fármaco del fármaco diana mientras está recubierta, por ejemplo, hasta la excreción de la enzima (aún recubierta) de procesamiento del fármaco por parte del paciente, mientras que la actividad de abuso destruye el recubrimiento de tal manera que la enzima de procesamiento del fármaco actúa inmediatamente sobre el fármaco diana. Por ejemplo, la enzima de procesamiento del fármaco puede estar recubierta por una o más de las sustancias/materiales mencionados anteriormente usados para recubrimientos entéricos, por ejemplo, Eudragit® L 30D-55 o Kollicoat® MAE 30D. Los ejemplos específicamente preferidos de tales recubrimientos de película o materiales secuestrantes son Eudragit® RS (30D), Eudragit® NE 30 D; etilcelulosa, polimetacrilatos (todos desvelados en Rowe y col. (Eds.) "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 6ª edición (2009), Pharmaceutical Press, páginas 262 y sigs., 525 y sigs.); o las sustancias usadas en otras composiciones opioides para recubrir antagonistas opioides (véanse, por ejemplo, los documentos EP 2 034 975 B1, US 8,465,774 B2 y WO 2004/026283 A1), excepto, por supuesto y de autocomprensión, las sustancias que tienen un riesgo de degradación mediante la actividad de la enzima de procesamiento del fármaco (por ejemplo, porque contienen un grupo que se convierte mediante la enzima de procesamiento del fármaco proporcionada en la composición de acuerdo con la presente invención).

La composición farmacéutica preferentemente contiene el fármaco diana en la cantidad prevista en la composición original no disuasiva del abuso. Por consiguiente, el fármaco diana está contenido preferentemente en una cantidad de 0,1 a 5.000 mg (es decir, de 0,1 mg a 5 g), preferentemente de 0,5 a 1.000 mg, especialmente de 1 a 500 mg, por unidad de dosificación. Las preparaciones del fármaco diana comercializadas actualmente contienen 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 40, 80, 120 o 160 mg del fármaco, especialmente de oxicodona, por ejemplo, como forma de sal, tal

como el clorhidrato. Las cantidades preferidas del fármaco diana en tales unidades de dosificación únicas pueden proporcionarse, por lo tanto, de 0,5 a 500 mg, especialmente de 1 a 200 mg. Dependiendo de la formulación y la actividad esperada de la enzima de procesamiento del fármaco durante la administración normal, también se puede proporcionar un aumento de la cantidad del fármaco diana (en comparación con la composición original no disuasiva del abuso, es decir, con la formulación farmacéutica del fármaco diana sin las características de disuasión del abuso), por ejemplo, para compensar la posible pérdida de la actividad del fármaco (si tal pérdida menor de actividad es probable o no puede excluirse por completo).

La cantidad de la enzima de procesamiento del fármaco en la presente composición farmacéutica se puede ajustar principalmente basándose en la cantidad del fármaco diana y los detalles de la formulación. Los ejemplos ilustrativos para determinar la actividad de las enzimas de procesamiento del fármaco preferidas se enumeran en la sección de Ejemplos.

Más específicamente, la cantidad de la enzima de procesamiento del fármaco en la presente composición farmacéutica puede ajustarse basándose principalmente en la cantidad de fármaco, la reactividad de la enzima y los detalles de la formulación. Por ejemplo, la enzima de procesamiento del fármaco se puede añadir en la composición de acuerdo con la presente invención en una cantidad de 0,1 a 10.000 unidades (es decir, de 0,1 u a 10 ku). De acuerdo con una realización preferida (por ejemplo, si se usa lacasa como enzima de procesamiento del fármaco), la lacasa está contenida en una cantidad de 1 a 1.000 unidades (es decir, de 1 u a 1 ku), preferentemente de 10 a 100 unidades. Hay varias maneras de determinar la actividad de la lacasa. Para la presente invención, las actividades se determinan mediante el control de la oxidación de ABTS espectrofotométricamente a 420 nm ($\epsilon = 11,4 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 25 °C en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 7). La actividad enzimática se expresa en unidades, mientras que una unidad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 pmol de ABTS por minuto ($1 \text{ U} = \mu\text{mol min}^{-1}$) (en lo sucesivo en el presente documento denominado "ensayo de lacasa de acuerdo con la presente invención").

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son composiciones secas, habitualmente con un contenido de humedad (pocillo) por debajo del 10 %, preferentemente con un contenido de humedad por debajo del 5 %, especialmente por debajo del 2 %.

El contenido de humedad se determina preferentemente mediante procedimientos aceptados en el presente archivo, por ejemplo, por la Farmacopea Europea. Un procedimiento específicamente preferido para la determinación de la humedad es el procedimiento de valoración de Karl Fischer (Farmacopea Europea 8.5 (2015), 2.5.12: semi-determinación de agua), en el que el agua del contenido de cristalización se incluye de nuevo.

Aunque la presente invención proporciona una estrategia completamente nueva para fármacos disuasivos del abuso, el presente enfoque novedoso también se puede combinar con otras estrategias de disuasión del abuso, por ejemplo, las que se han identificado en la Guía de la FDA 2015 o en Schaeffer, J. Med. Toxicol. 8 (2012), 400-407. Por consiguiente, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende preferentemente una característica adicional de disuasión del abuso, por ejemplo, una característica seleccionada del grupo que consiste en: una barrera física o química, especialmente una dureza aumentada del comprimido, un antagonista del fármaco (insensible a la enzima de procesamiento del fármaco), un componente de aversión, un sistema de administración disuasivo del abuso y un profármaco. La provisión de una barrera física, especialmente una dureza aumentada del comprimido o un componente de aversión, especialmente un agente gelificante y/o un agente que aumenta la viscosidad no gelificante (por ejemplo, λ -carragenano) o, por ejemplo, un emético o un irritante nasal, es específicamente preferida. Por ejemplo, la presente composición se puede proporcionar como una formulación con una resistencia de más de 400 N, especialmente más de 500 N, tal como se receta en la Farmacopea Europea (Farm.Europ.8 (2014) 2.9.8). Otros ejemplos de características de disuasión del abuso que se pueden combinar con la presente invención son la provisión de partículas separadas de refuerzo mecánico (documento WO 2012/061779 A1), de materiales que son tanto hidrófilos como hidrófobos (documento WO 2012/112952 A1), de un ingrediente soluble en ácido (un polímero catiónico) con un ingrediente de tampón (documento US 9.101.636 B2), de una forma de dosificación oral solidificada monolítica preparada mediante un procedimiento térmico (documento US 2008/0075771 A1), de un emético o un irritante nasal (documento US 2008/075771 A1), de una formulación extruida (documento US 2015/0057304 A1) o de sales de ácido orgánico amorfo o polimérico del opioide (documento US 2015/016835 A1), etc.

De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica comprende una matriz que contiene del 1 al 80 % en peso de uno o más polímeros hidrófobos o hidrófilos, preferentemente una matriz que comprende agar, ácido alámico, ácido alginico, carmelosa, carboximetilcelulosa sódica, carbómero (tal como Carbopol® carragenano, quitosano, especialmente carboximetilquitosano, catecol, copovidona, dextrina, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, copolímero de ácido metacrílico, derivados de metilcelulosa, celulosa microcristalina, ácido poliacrílico, óxido de polialquileño, especialmente polietilenglicol, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, povidona, alginato de propilenglicol, copolímero de injerto de polivinilcaprolactama-acetato de polivinilo-polietilenglicol, pululano, dióxido de silicio, alginato de sodio, almidón, copolímeros de vinilpirrolidona-acetato de vinilo o formadores de matriz no poliméricos como cera microcristalina, alcoholes grasos y ácidos grasos como alcohol estearílico, alcohol cetil estearílico, ácido esteárico, ácido palmítico o sales y mezclas de los mismos, mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos saturados con una longitud de cadena entre 16 y 22 átomos de carbono y

una mezcla de tales mono-, di- y triglicéridos, respectivamente.

De acuerdo a una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica comprende un componente formador de hidrogel y/o reticulantes adecuados que permite la generación de hidrogeles reticulados insolubles del fármaco una vez que la enzima de procesamiento del fármaco se activa mediante etapas abusivas (opcionalmente, una lacasa, tal como se ha desvelado anteriormente, también puede contribuir a tal reticulación). Los componentes formadores de hidrogel preferidos son quitosano y carboximetilquitosano; los reticulantes preferidos son reticulantes fenólicos, especialmente catecol y vanilina. Los ejemplos preferidos de tales composiciones de hidrogel/reticulante son composiciones que comprenden quitosano y catecol o composiciones que comprenden carboximetilquitosano y vanilina.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención es preferentemente una composición estable al almacenamiento, preferentemente que comprende menos del 5 %, especialmente menos del 1 %, de productos de degradación del fármaco diana procesados con enzima de procesamiento del fármaco después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C en condiciones secas.

En general, las enzimas de procesamiento del fármaco deberían ser lábiles a los ácidos, de tal manera que su actividad en la presente composición se inactiva inmediatamente tan pronto como la enzima de procesamiento del fármaco esté en contacto con el fluido estomacal y/o el entorno intestinal del paciente a quien se administra la composición.

La presente composición farmacéutica puede proporcionarse como una composición de liberación modificada, especialmente una composición de liberación prolongada. La expresión "forma modificada" pretende incluir formas de liberación acelerada, liberación controlada y liberación sostenida. Determinadas formas de liberación se pueden caracterizar por su perfil de disolución. La expresión "perfil de disolución" significa un gráfico de la cantidad de principio activo liberado en función del tiempo (Farm.Europ.8 (2014) 2.9.3). El perfil de disolución puede medirse utilizando el ensayo de liberación de fármaco <724>, que incorpora el ensayo convencional USP 26 (Ensayo <711>) de la Farmacopea de EE. UU. Un perfil se caracteriza por las condiciones de ensayo seleccionadas. Por tanto, el perfil de disolución se puede generar en un aparato, una velocidad del eje, una temperatura, un volumen y un pH del medio de disolución preseleccionados. Un primer perfil de disolución puede medirse a un nivel de pH que se aproxime al del estómago. Un segundo perfil de disolución puede medirse a un nivel de pH que se aproxime al de un punto en el intestino o a varios niveles de pH que se aproximen a múltiples puntos en el intestino. Un pH altamente ácido puede simular el estómago y un pH de menos ácido a básico puede simular el intestino. Por la expresión "pH altamente ácido" se entiende un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 4. Con la expresión "pH de menos ácido a básico" se entiende un pH de más de aproximadamente 4 a aproximadamente 7,5, preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 7,5. Se puede usar un pH de aproximadamente 1,2 para simular el pH del estómago. Se puede usar un pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,5, preferentemente aproximadamente 7,5 para simular el pH del intestino.

En contraste con la liberación modificada, la "liberación inmediata" es la forma de liberación convencional o no modificada en la que se libera más de o igual a aproximadamente el 50 % o más preferentemente aproximadamente el 75 % de un fármaco de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, dentro de las dos horas de la administración, preferentemente dentro de una hora de la administración, especialmente dentro de los 30 min de la administración. Por "liberación controlada" se entiende una forma de dosificación en la que la liberación del fármaco se controla o modifica durante un período de tiempo. Controlada puede significar, por ejemplo, liberación acelerada, sostenida, retardada o pulsada en un tiempo particular. Como alternativa, controlada puede significar que la liberación del fármaco se prolonga durante más tiempo de lo que sería en una dosificación de liberación inmediata durante, es decir, al menos durante varias horas.

La "liberación retardada" indica que hay un retraso de tiempo antes de que se logren niveles en plasma significativos del fármaco. Una formulación de liberación retardada de acuerdo con la presente invención evita una absorción rápida inicial del fármaco o puede formularse de tal manera que se evite la liberación del fármaco en el estómago. Una formulación de "liberación pulsada" puede contener una combinación de formulaciones de liberación inmediata, de liberación sostenida y/o de liberación retardada en la misma forma de dosificación. Una formulación de "liberación semi-retardada" es una "formulación de liberación pulsada" en la que se proporciona una dosificación moderada inmediatamente después de la administración y una dosificación más grande algunas horas después de la administración.

Las expresiones "liberación sostenida" o "liberación prolongada" incluyen la liberación del fármaco a tal velocidad que los niveles en sangre (por ejemplo, plasma) se mantienen dentro de un intervalo terapéutico, pero por debajo de niveles tóxicos durante al menos aproximadamente 8 horas, preferentemente al menos aproximadamente 12 horas, especialmente al menos 24 horas (específicamente preferido para un régimen de dosificación por día) después de la administración en estado estacionario. La expresión "estado estacionario" significa que se ha alcanzado un nivel en plasma para un fármaco dado y que se mantiene con dosis posteriores del fármaco a un nivel que está en o por encima del nivel terapéutico eficaz mínimo y está por debajo del nivel en plasma tóxico o de sobredosis mínimo para un fármaco dado. La mayoría de las matrices poliméricas y los formadores de matriz no poliméricos mencionados anteriormente tienen la capacidad de proporcionar capacidad de liberación prolongada o sostenida para un fármaco

dado en la formulación de acuerdo con la presente invención.

De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende el fármaco diana solo (como el único ingrediente eficaz) o en combinación con otros principios farmacéuticamente activos, preferentemente en combinación con un analgésico no opioide, especialmente con ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, paracetamol y ácido acetilsalicílico.

En una realización preferida, la enzima en la composición farmacéutica esencialmente no actúa sobre el fármaco (o cualquier otro constituyente de la composición farmacéutica) *in vivo* cuando la composición se administra de la manera prevista e intacta (es decir, se ingiere intacta).

Preferentemente, la enzima en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención está presente en la composición en una forma esencialmente no liberable cuando la composición se administra de la manera prevista e intacta (es decir, se ingiere intacta).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la enzima en la presente composición farmacéutica se desactiva *in vivo*.

De acuerdo con un aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un procedimiento para fabricar una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención que comprende las etapas de mezclar el fármaco diana o una sal, un hidrato, un solvato, un éster o un profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo con la enzima de procesamiento del fármaco y terminar la mezcla en una composición farmacéutica. Como alternativa, el procedimiento para fabricar la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende las etapas de proporcionar el fármaco diana o una sal, un hidrato, un solvato, un éster o un profármaco farmacéuticamente aceptable del mismo y la enzima de procesamiento del fármaco en forma separada y terminar los componentes separados en una composición farmacéutica.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el fármaco diana y un componente formador de hidrogel y/o un reticulante. El componente formador de hidrogel y/o el reticulante permiten la generación de moléculas reticuladas insolubles, especialmente como hidrogel, del fármaco una vez que la composición farmacéutica se mezcla con una mezcla acuosa en el procedimiento de etapas abusivas. Los componentes preferidos formadores de hidrogel son quitosano y carboximetilquitosano; los reticulantes preferidos son reticulantes fenólicos, especialmente catecol y vanilina. Los ejemplos preferidos de tales composiciones de hidrogel/reticulante son composiciones que comprenden quitosano y catecol o composiciones que comprenden carboximetilquitosano y vanilina.

Preferentemente, las composiciones de acuerdo con la presente invención se proporcionan como hidrogeles. Esto implica la inclusión de otro enfoque de disuasión del abuso, concretamente para crear un sistema que cambie las propiedades reológicas de la solución de reacción, es decir, la formación de un hidrogel. Los hidrogeles son muy viscosos y, como consecuencia, aspirar con una aguja no es posible.

La presente invención también se refiere, por su naturaleza, a un procedimiento de administración de la composición farmacéutica disuasiva del abuso de acuerdo con la presente invención (es decir, que comprende un fármaco con un grupo funcional reactivo con enzimas, en el que el fármaco tiene un potencial de abuso, y una enzima capaz de reaccionar con el grupo funcional reactivo con enzimas (una enzima de procesamiento del fármaco), en la que el fármaco con el grupo funcional reactivo con enzimas está contenido en la composición farmacéutica en un estado estable al almacenamiento, reactivo con enzimas y en condiciones en las que ninguna actividad enzimática actúa sobre el fármaco) a un paciente que lo necesita, en el que la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se administra por vía oral a este paciente en una cantidad eficaz y en el que la enzima de procesamiento del fármaco se desactiva automáticamente en el curso de esta administración oral (mediante los componentes presentes en el tubo gastrointestinal del paciente (boca, esófago, estómago e intestino/s (delgado)), por ejemplo, mediante la saliva del paciente, jugo gástrico y fluidos intestinales y las enzimas del paciente contenidas en el mismo) para que la enzima de procesamiento del fármaco no actúe sobre el fármaco y el fármaco pueda, por lo tanto, presentar su efecto destinado en el paciente.

La presente invención se ilustra, adicionalmente, mediante los siguientes ejemplos y las figuras, aunque sin restringirse a los mismos.

La Fig. 1 muestra la estrategia de la presente invención, ejemplificada mediante el ejemplo de morfina como fármaco. El sistema de morfina/lacasa de disuasión del abuso de acuerdo con la presente invención convierte la morfina en un producto precipitado o crea, en combinación con aditivos, un hidrogel con el que ya no es posible inyectar el fármaco con una jeringa. Si el fármaco se administra según lo previsto, las proteasas del cuerpo desactivan la lacasa y el fármaco despliega su efecto.

La Fig. 2 muestra los opioides que se investigan en los ejemplos (morfina (izquierda), tapentadol (medio) y oxicodona (derecha)).

La Fig. 3 muestra la oxidación de morfina en lacasa con *Myceliophthora thermophila* (MtL) (violeta) y *Trametes villosa* (TvL) (verde).

La Fig. 4 muestra la oxidación de tapentadol en lacasa con MtL (violeta) y TvL (verde).

La Fig. 5 muestra la oxidación de oxicodona en lacasa con MTL (verde) y TvL (violeta).

La Fig. 6 muestra una TLC de morfina después de la conversión enzimática en diferentes puntos de tiempo en comparación con la morfina como referencia (primera calle).

La Fig. 7 muestra una TLC de tapentadol después de la conversión enzimática en diferentes puntos de tiempo en comparación con tapentadol como referencia (primera calle).

La Fig. 8 muestra una FTIR de precipitado de morfina (línea roja: referencia de morfina, línea azul: polímero de morfina precipitado).

La Fig. 9 muestra la medición mediante HPLC de la morfina oxidada enzimáticamente.

La Fig. 10 muestra los espectros de CG-EM de la morfina después de la conversión enzimática.

La Fig. 11 muestra los espectros de CG-EM de la morfina de una biblioteca de base de datos de CG-EM; comparación del espectro medido con el espectro de la base de datos.

La Fig. 12 muestra la conversión de morfina mediante lacasa, detectada mediante CG-EM.

La Fig. 13 muestra el hidrogel de quitosano-catecol-morfina.

La Fig. 14 muestra el hidrogel de carboximetilquitosano-morfina.

La Fig. 15 muestra la estrategia de la presente invención. El sistema de enzima de procesamiento de oxicodona/oxicodona disuasivo del abuso de acuerdo con la presente invención convierte oxicodona en un derivado de oxicodona procesado sin o con bajo potencial de abuso o crea, en combinación con aditivos, un hidrogel con el que ya no es posible inyectar el fármaco con una jeringa. Si se administra oxicodona según lo previsto, las proteasas del cuerpo (y las condiciones en el estómago y en el intestino delgado) desactivan la enzima de procesamiento de oxicodona y la oxicodona despliega su efecto.

La Fig. 16 muestra la conversión enzimática de oxicodona en un producto parcialmente precipitado.

La Fig. 17 muestra las mediciones de la concentración de oxígeno con diversos opioides y lacasa.

La Fig. 18 muestra la medición de la concentración de oxígeno para el sistema mediador de lacasa.

La Fig. 19 muestra la medición de la concentración de oxígeno para el sistema mediador de lacasa y la oxicodona, con los mediadores vanilina, etilvanilina, ácido gálico y ácido síngico.

La Fig. 20 muestra las concentraciones de oxicodona en porcentaje para diversos experimentos de LMS con oxicodona y los controles respectivos.

La Fig. 21 muestra el área de pico [PA] hallada mediante el análisis EM-TOF para la molécula de Fórmula $C_{17}H_{19}NO_4$, que es oximorfona.

La Fig. 22 muestra la medición de la concentración de oxígeno para el sistema mediador de lacasa y la metadona, con el mediador ABTS.

La Fig. 23 muestra el esquema de reacción para la desacetilación enzimática de diacetilmorfina a morfina con esterasas. La morfina puede, a su vez, oxidarse mediante lacasas.

La Fig. 24 muestra el rendimiento del acetato a lo largo del tiempo con diferentes enzimas y temperaturas medidas mediante HPLC/RI.

La Fig. 25 muestra las concentraciones de DAM y morfina para las pruebas con diferentes enzimas y temperaturas.

La Fig. 26 muestra la inactivación de enzimas dentro del cuerpo humano.

La Fig. 27 muestra el gel de SDS-Page que muestra la degradación proteolítica de diferentes enzimas, concretamente de lacasa de *Myceliophthora thermophila* MTL, cutinasa de *Humicola insolens* HiC y peroxidasa de rábano picante HRP.

La Fig. 28 muestra el perfil de actividad de pH de MTL usando ABTS como sustrato.

La Fig. 29 muestra el perfil de estabilidad de MTL en diferentes niveles de pH a lo largo del tiempo.

La Fig. 30 muestra la eliminación de diversas concentraciones de morfina con 10 U/ml de lacasa.

La Fig. 31 muestra que el aumento de la concentración de lacasa es lineal con respecto a la disminución en la concentración de morfina ($\rightarrow$ 10 veces más resultados de lacasa en una degradación $\sim$ 10 veces más rápida).

La Fig. 32 muestra el resultado con 60.000 mg/l de morfina, casi en el límite de solubilidad de la morfina.

Ejemplos:

I.: Lacasa para su uso en formulaciones opioides disuasivas del abuso

Los opioides son un componente importante del tratamiento moderno del dolor, aunque el abuso y/o uso indebido de esos fármacos ha creado un problema creciente de salud pública. Para contrarrestar este problema, existe una fuerte demanda de nuevas tecnologías para prevenir el abuso de opioides. Por lo tanto, este proyecto intenta abordar este problema de una manera única basada en el uso de enzimas.

Se investigó el potencial de las enzimas para polimerizar opioides, evitando de este modo el abuso. Estas enzimas no estarán activas cuando los opioides se administren correctamente. Estas posibilidades son investigadas a fondo por el presente proyecto.

En el presente ejemplo, se muestra el desarrollo de un sistema enzimático adecuado para eliminar los opioides de la solución. Además, se proporcionan condiciones de reacción optimizadas para la conversión eficaz de la solución opioide que previene la administración a través de la inyección. Finalmente, la función del sistema se verifica mostrando la inactivación proteolítica de las enzimas que destruyen los opioides cuando los fármacos se administran según lo previsto.

1. Materiales

Los opioides que se investigaron fueron morfina, tapentadol y oxicodona, tal como se muestra en la Fig. 2.

Se usaron dos lacasas diferentes para lograr la eliminación de los opioides: uno de ellos originado de *Trametes villosa* (TvL) y el otro de *Myceliophthora thermophila* (MtL).

2. Mediciones de oxígeno

Para determinar si las lacasas actúan sobre cualquiera de los opioides dados (morfina, tapentadol, oxicodona), se usó un sensor de oxígeno óptico. Las lacasas usan oxígeno como aceptor de electrones, por lo tanto, la concentración de oxígeno disminuye con la oxidación del sustrato.

Las condiciones para las siguientes reacciones se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1: Condiciones para la medición de oxígeno de la oxidación catalizada mediante lacasa de opioides	
Enzima (Lacasa)	10 U/ml
Sustrato	2 mg/ml
Disolvente	Agua destilada
Temperatura	Temperatura ambiente

En la Fig. 3, se muestra la oxidación de la morfina mediante dos lacasas diferentes, es decir, de *Myceliophthora thermophila* (MtL) y *Trametes villosa* (TvL). Las líneas azul y roja representan las dos muestras de ensayo en blanco, azul con agua destilada y enzima y roja agua destilada con morfina. Las líneas violeta y verde representan las dos reacciones con las enzimas (violeta: MtL, verde: TvL). Después de aprox. 5 minutos, hay una clara disminución en la concentración de oxígeno en la solución, lo que significa que las lacasas están convirtiendo la morfina en un producto de reacción. Además, las dos soluciones se volvieron turbias, lo que significa que el producto de reacción precipitó. No hubo ninguna diferencia significativa entre las dos enzimas.

En la Fig. 4, se muestra la oxidación de tapentadol mediante MtL (violeta) y TvL (verde). La disminución de oxígeno con MtL es mucho más lenta en comparación con la disminución de oxígeno con TvL. Esto podría deberse a que TvL tiene un potencial de reducción-oxidación mucho más alto que MtL. Las diferentes curvas también muestran que la especificidad de las dos enzimas es muy diferente en tapentadol. TvL convierte tapentadol mejor, que se indica mediante la pendiente de la curva, así como el hecho de que la curva en el caso de TvL cae a casi el 0 % de oxígeno.

En la Fig. 5, se muestra la oxidación de oxicodona. Todas las curvas son similares, lo que indica que las dos enzimas usadas no son capaces de convertir la oxicodona. La causa de eso es el grupo fenólico -OH que falta en la oxicodona (que se muestra en la Fig. 2), que es necesario para las lacasas.

3. Cromatografía de capa fina

Las reacciones de morfina y tapentadol también se analizaron mediante cromatografía de capa fina y se muestran en las Fig. 6 y 7. La Fig. 6 muestra la conversión de morfina. La primera calle representa morfina como referencia, mientras que las otras calles muestran las muestras que se tomaron en diferentes puntos de tiempo (2, 10, 30, 60, 120 minutos). Después de solo 2 minutos, aparecen dos nuevos puntos en la placa de TLC, lo que indica que se forma un nuevo producto a partir de la reacción enzimática con morfina. El punto de referencia de la morfina desaparece después de 30 minutos, lo que indica que toda la morfina se convierte. El mismo procedimiento se muestra en la Fig. 7 para tapentadol. La conversión de tapentadol es mucho más lenta, pero también aparece un nuevo punto después de 2 minutos y el punto de tapentadol desaparece después de 120 minutos.

4. Análisis del producto precipitado

Tal como se ha mencionado anteriormente, el producto de reacción de morfina precipitó, por consiguiente, la siguiente parte fue el análisis de este precipitado. Las siguientes condiciones se usaron para la reacción (Tabla 2).

Tabla 2: Condiciones para el análisis del precipitado de morfina que se forma tras la reacción enzimática con MtL	
Enzima (Lacasa)	20 U/ml
Sustrato	20 mg/ml
Disolvente	Agua destilada
Temperatura	Temperatura ambiente

Después de 24 horas, la mezcla de reacción se centrifugó durante 15 min a 16.100 rcf (fuerza centrífuga relativa). El sobrenadante se descartó y el precipitado restante se liofilizó durante una noche. Al día siguiente, el precipitado seco se analizó mediante FTIR, tal como se muestra en la Fig. 8. La línea roja muestra morfina, la línea azul el producto de reacción precipitado. Se puede observar que surgen nuevos picos y disminuyen otros picos debido a la reacción de polimerización de la morfina.

Para un análisis adicional, se realizó un ensayo de solubilidad del precipitado. Tal como se indica en la Tabla 3, los resultados para el ensayo de solubilidad fueron ambivalentes. En ninguno de los disolventes usados, el precipitado era soluble, lo que probablemente significa que se formó un producto de alto peso molecular tras la reacción enzimática. Esto resulta deseable para el objetivo principal del proyecto, pero para un análisis posterior es necesario un compuesto soluble.

Tabla 3: Ensayos de solubilidad del precipitado formado tras la oxidación catalizada mediante lacasa de morfina

Disolvente	Concentración de precipitado de morfina [mg/ml]	Solubilidad
Acetonitrilo	0,4	-
THF	0,3	-
Dietiléter	0,4	-
Tolueno	0,4	-
Hexano	0,3	-
Tampón de citrato 100 mM a pH 4	1	~
Tampón de fosfato 100 mM a pH 3	1	~
Tampón de formiato de amonio 50 mM a pH 3	0,001	~

5. Análisis del producto precipitado

Para abordar la segunda tarea, el cambio de las propiedades reológicas de la mezcla de reacción, se añadieron diferentes aditivos para aumentar la viscosidad de la solución. Los aditivos sometidos a ensayo se muestran en la Tabla 4 y se mezclaron con la reacción, tal como se indica. La mayoría de los aditivos elegidos ya se usan en aplicaciones farmacéuticas. El aumento deseado en la viscosidad solo se logró cuando se usó hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Tabla 4: Aditivos para la reacción enzimática de morfina para aumentar la viscosidad

Aditivo	Relación/concentración	Solución de problemas	Viscosidad aumentada
Ácido ferúlico	1:1		-
Catecol	1:1	tóxico	-
Almidón	1:1	solubilidad	-
Polivinilpirrolidona (PVP)	50 mg/ml	solubilidad	-
Polietilenglicol (PEG6000)	50 mg/ml		-
HPMC	100 mg/ml	tiempo	+
Catequina	1:1		-
Neohesperidina dihidrocalcona	1:1		-

6. Mediciones de conversión enzimática usando HPLC y CG

La cinética de la conversión enzimática de la morfina se analizó a través de análisis de HPLC y CG.

Se tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo (0, 2, 5, 10, 15, 30 minutos) durante la reacción. La solución de partida fue 0,2 mg/ml de morfina en agua destilada. Para comenzar la reacción, se añadió M_L hasta una concentración final de 78,3 U/ml. Se tomaron 100 µl de muestra y se pusieron en 900 µl de metanol (MeOH) para precipitar la enzima. La solución se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un vial de HPLC a través de un filtro de 0,2 µm. Después, la solución se midió con las siguientes condiciones de HPLC que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Condiciones para la medición de HPLC de la determinación de la velocidad de reacción de morfina oxidada enzimáticamente

Columna	Poroshell 120 EC-C18 de 3,0 x 0,5 mm
Flujo	0,8 ml/min
Isocrático	H ₂ O mQ al 85 %, MeOH al 5 %, ácido fórmico al 10 %
Volumen de inyección	5 µl
Temperatura de columna	40 °C
Longitud de onda de la señal	240 nm

El resultado de la medición de HPLC se muestra en la Fig. 9. Resulta claramente visible que la morfina se convierte mediante la lacasa. Después de 15 minutos, ya no se midió ninguna señal de morfina. Esto significa que después de aprox. 15 minutos, el 100 % de la morfina se convirtió en un producto parcialmente precipitado. Se debe investigar un análisis adicional del mecanismo de reacción exacto y del producto de reacción.

Además del procedimiento de HPLC, se estableció un procedimiento de CG-EM y las muestras se analizaron usando las siguientes condiciones que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones de CG-EM para la determinación de la velocidad de reacción de morfina oxidada enzimáticamente

Columna	Agilent Technologies DB17MS
Programa de temperatura	120 °C - 320 °C
Tiempo de ciclo	11,5 min

El espectro de EM en la Fig. 10 muestra el resultado de la medición de CG-EM de la morfina después de la reacción. El pico agudo a la derecha representa la morfina, que se confirma mediante la biblioteca de espectro de EM que se muestra en la Fig. 11. Esta es la prueba en la que se detectó morfina.

En la Fig. 12, se muestra la velocidad de conversión de la reacción de morfina y lacasa de *Myceliophthora thermophila*. Para esta reacción, se usó una concentración de 2 mg/ml de morfina en agua destilada. Para iniciar la reacción, se añadió MtL hasta una concentración final de 78,3 U/ml. Para la preparación de la muestra, se tomaron 100 µl de muestra y se añadieron a 900 µl de metanol (MeOH) para precipitar la enzima. La solución se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un vial de HPLC a través de un filtro de 0,2 µm. En el vial había NaSO₄ para enlazar el agua restante de la enzima que podría causar problemas en el cromatógrafo de CG.

La velocidad de conversión, en comparación con las condiciones de los mencionados anteriormente, medida mediante HPLC, es mucho más lenta. Después de 30 minutos aprox., el 60 % de la morfina se convierte. La causa de esto es muy probablemente la diferente relación de enzima/sustrato. Para la medición de HPLC, se usó mucha más enzima en comparación con las muestras que se prepararon para la medición de CG. Esto muestra que resulta posible influir en la velocidad de conversión con la proporción de enzima respecto a sustrato.

7. Hidrogel

De acuerdo con una realización preferida, las composiciones de acuerdo con la presente invención se proporcionan como hidrogeles. Esto implica la inclusión de otro enfoque de disuasión del abuso, concretamente para crear un sistema que cambie las propiedades reológicas de la solución de reacción, es decir, la formación de un hidrogel. Los hidrogeles son muy viscosos y, como consecuencia, aspirar con una aguja no resulta posible. Para este fin, se probaron diferentes configuraciones, tal como se muestra en la Tabla 7. Las sustancias se mezclaron en conjunto hasta que se formó un gel.

La primera prueba con quitosano formó un hidrogel después de aprox. 15 minutos. La idea es que el catecol reticule las moléculas de quitosano y que la morfina se embeba de manera covalente a través de las reacciones de tipo Michael. Esta prueba fue una prueba de concepto exitosa, mientras que el catecol debe reemplazarse con otras moléculas que ya se usan como aditivos para fármacos.

La segunda prueba con carboximetilquitosano formó un hidrogel justo con morfina después de aprox. 24 h. Este sistema no sería dañino y el tiempo de reacción se puede optimizar.

Tabla 7: Condiciones para hidrogeles enzimáticos reticulados

Sustancias	Viscosidad aumentada
Quitosano 2 % (p/v) + catecol 500 µM + morfina a 10 mg/ml + MtL a 2 U/ml	+ (después de 15 min)
Carboximetilquitosano 2 % (p/v) + morfina a 10 mg/ml + MtL a 2 U	+ (después de 24 horas)

La Fig. 13 muestra el hidrogel de quitosano-catecol-morfina. La Fig. 14 muestra el hidrogel de carboximetilquitosano-morfina. Ambos hidrogeles no son inyectables nuevamente y ya no pueden usarse para la administración.

Discusión:

Este estudio demuestra un enfoque enzimático completamente nuevo para el desarrollo de opioides disuasivos del abuso. El tapentadol y la morfina se convirtieron con éxito mediante la enzima lacasa, que se confirmó mediante mediciones de consumo de oxígeno, análisis de TLC, HPLC-EM, FTIR y CG-EM.

Dado que la conversión enzimática de la morfina fue bastante directa, se eligió esta reacción como modelo para un análisis posterior. La velocidad de reacción de la lacasa de *Myceliophthora thermophila* sobre morfina se analizó a través de medición de HPLC y CG. Después de aprox. 15 minutos, el 100 % de la morfina se convirtió en un producto que precipitó. El producto de reacción precipitado se analizó a través de FTIR y también se llevaron a cabo ensayos de solubilidad. El precipitado era difícilmente soluble en cualquiera de los disolventes usados, lo que se desea para la prevención del abuso.

En general, se desarrolló con éxito el sistema de prevención de abuso deseado basado en la polimerización enzimática. De acuerdo con los resultados presentados, resulta plausible que el presente sistema sea extensible en principio a todos los fármacos, especialmente a todos los opioides que tienen un grupo funcional reactivo con lacasa.

II. Inactivación de oxycodona con un sistema enzimático que consiste en peroxidasa/lacasa

Los opioides son un componente importante del tratamiento moderno del dolor, aunque el abuso y/o uso indebido de esos fármacos ha creado un problema de salud pública cada vez mayor. Para contrarrestar este problema, existe una fuerte demanda de nuevas tecnologías para prevenir el abuso de opioides. Por lo tanto, este proyecto intenta abordar este problema de una manera única basada en el uso de enzimas.

Se investigó el potencial de las enzimas para polimerizar opioides, evitando de este modo el abuso. Estas enzimas no estarán activas cuando los opioides se administren correctamente. Estas posibilidades son investigadas a fondo por el presente proyecto.

En el presente ejemplo, se puede mostrar el desarrollo de un sistema enzimático adecuado para eliminar los opioides de la solución. Se usa una peroxidasa para producir un grupo hidroxilo en la oxycodona, mientras que tal molécula "activada" es transformada adicionalmente mediante la lacasa. Además, se proporcionan condiciones de reacción optimizadas para la conversión eficaz de la solución opioide que previene la administración a través de la inyección. Finalmente, la función del sistema se verifica mostrando la inactivación proteolítica de las enzimas que destruyen los opioides cuando los fármacos se administran según lo previsto.

20 Materiales

El opioide que se investiga es oxycodona.

Para lograr la eliminación de la oxycodona, se usan las siguientes enzimas: la peroxidasa de rábano picante y una lacasa que se origina de *Myceliophthora thermophila* (MtL). La glucosa oxidasa (GOD, de *Aspergillus niger*) se usa para generar H_2O_2 , que se requiere para la reacción de la peroxidasa.

25 Mediciones de oxígeno

Para determinar si la lacasa actúa sobre la oxycodona activada, se usa un sensor de oxígeno óptico. Las lacasas usan oxígeno como aceptor de electrones, por lo tanto, la concentración de oxígeno disminuye con la oxidación del sustrato.

Las condiciones para las siguientes reacciones se muestran en

Tabla 1:

Enzima HRP	10 U/ml
Enzima glucosa oxidasa	20 U/ml
Enzima lacasa	25 U/ml
Oxycodona	10 mg/ml
Glucosa	10 mg/ml
Disolvente	Agua destilada
Temperatura	Temperatura ambiente

30 Mediciones de conversión enzimática usando HPLC

La cinética de la conversión enzimática de la morfina se analiza a través de análisis de HPLC-EM.

Las muestras se toman en diferentes puntos de tiempo (0, 2, 5, 10, 15, 30 minutos) durante la reacción. Se toman muestras de 500 μ l y se ponen en 500 μ l de metanol (MeOH) para precipitar la enzima. La solución se centrifuga usando Vivaspin 500 y se transfiere a un vial de HPLC. Después, la solución se mide con las siguientes condiciones de HPLC que se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2: Condiciones para la medición de HPLC-EM de la determinación de la velocidad de reacción de oxycodona oxidada enzimáticamente

Columna	Agilent Technologies ZORBAX HILIC plus
Flujo	0,4 ml/min
Gradiente	A partir de tampón al 100 % de formiato de amoniaco 65 mM a pH 3 en MQ (18,2 M) hasta ACN al 100 % en 15 min; ciclo total 20 min
Volumen de inyección	1 μ l
Temperatura de columna	40 °C
Detección	A través de EM-TOF en modo pos.

El resultado puede evaluarse mediante la medición de HPLC-EM. A partir de estos datos, resultará claramente visible que la oxycodona se convierte enzimáticamente en un producto parcialmente precipitado. Se realiza un análisis adicional del mecanismo de reacción exacto y del producto de reacción con los siguientes procedimientos: GPC y RMN.

Hidrogel

De acuerdo con una realización preferida, las composiciones de acuerdo con la presente invención se proporcionan como hidrogeles. Esto implica la inclusión de otro enfoque de disuasión del abuso, concretamente para crear un sistema que cambie las propiedades reológicas de la solución de reacción, es decir, la formación de un hidrogel. Los hidrogeles son muy viscosos y, como consecuencia, aspirar con una aguja no es posible.

Discusión

Este estudio demuestra un enfoque enzimático completamente nuevo para el desarrollo de opioides disuasivos del abuso. La oxycodona se convierte con éxito mediante las enzimas HRP y lacasa (con generación de cofactores mediante glucosa oxidasa), que se confirma mediante mediciones de consumo de oxígeno y análisis de HPLC-EM.

- 10 La velocidad de reacción de las enzimas en la oxycodona se analiza a través de la medición de HPLC-EM. La oxycodona se convierte en un producto que precipitó.

En general, se desarrolla con éxito el sistema de prevención de abuso deseado basado en la polimerización enzimática. A partir de los resultados actuales, resulta plausible que el presente sistema sea extensible en principio a todos los fármacos, especialmente a todos los opioides que tienen un grupo funcional reactivo con lacasa.

- 15 III. Las pruebas enzimáticas para las enzimas de procesamiento de oxycodona seleccionadas y preferidas son bien conocidas y están disponibles para la mayoría de las enzimas preferidas enumeradas en el presente documento. Como ejemplo, en lo sucesivo en el presente documento, se describe una configuración de prueba conocida para la desmetilación en O dependiente de 2-oxoglutarato por motivos ilustrativos:

Desmetilación en O (dependiente de 2-oxoglutarato)

- 20 La prueba enzimática directa para la actividad de la dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato puede realizarse usando una mezcla de reacción de Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), glicerol al 10 % (v/v), 2-mercaptoetanol 14 mM, alcaloide 1 mM, 2-oxoglutarato 10 mM, ascorbato de sodio 10 mM, FeSO₄ 0,5 mM y hasta 100 µg de enzima recombinante purificada. Las pruebas se llevan a cabo a 30 °C durante 1 o 4 horas, se detienen sumergiendo el tubo de reacción en agua en ebullición durante 5 min y se someten a análisis de CL-EM/EM. La actividad de dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato también se prueba usando un procedimiento indirecto basado en la descarboxilación acoplada a la desmetilación en O de [1-¹⁴C]2-oxoglutarato. En resumen, la prueba convencional contenía 10 µM de una solución al 1 0% mol/mol (n/n) de [1-¹⁴C]2-oxoglutarato (actividad específica de 55 mCi/mmol) diluido con 90 % n/n de 2-oxoglutarato no marcado, sustrato alcaloide no marcado 10 µM, ascorbato de sodio 10 mM, sulfato de hierro 0,5 mM y 5 µg de enzima purificada en 500 µl de solución de tampón de reacción (Tris-HCl 100 mM, glicerol al 10 % [v/v], 2-mercaptoetanol 14 mM, a pH 7,4). Las pruebas se inician mediante la adición de enzima, se incuban durante 45 minutos a 30 °C y se detienen retirando los filtros de fibra de vidrio que retienen ¹⁴CO₂ (Whatman grado GF/D, sometido a tratamiento previo con solubilizante de tejido NCS-II, Amersham Biosciences) del vial de reacción. Para análisis cinéticos enzimáticos, se usa 10 µM de una solución al 1 % (n/n) de [1-¹⁴C]2-oxoglutarato (actividad específica de 55 mCi/mmol) diluido con el 99 % (n/n) de 2-oxoglutarato no marcado. Los resultados de las pruebas que carecen de un sustrato de alcaloide se restan de las pruebas correspondientes que contienen sustratos de alcaloides para dar cuenta del consumo desacoplado de 2-oxoglutarato. Los datos cinéticos para, por ejemplo, T6ODM se pueden obtener variando las concentraciones de sustrato en la reacción entre 1 y 500 µM a una concentración constante de 2-oxoglutarato de 500 µM. Por el contrario, la concentración de 2-oxoglutarato puede variarse entre 1 y 500 µM a una concentración de sustrato constante de 30 µM, que produce la velocidad máxima de reacción. Los datos cinéticos para, por ejemplo, CODM se pueden obtener variando los 500 µM y variando la concentración de 2-oxoglutarato entre 1 y 500 µM a una concentración constante de codeína de 50 µM. Las curvas de saturación y las constantes cinéticas se pueden calcular basándose en la cinética de Michaelis-Menten usando FigP v. 2.98 (BioSoft, Cambridge, Reino Unido; <http://www.biosoft.com>). La liberación de formaldehído tras la desmetilación en O del alcaloide puede controlarse usando una modificación basada en la fluorescencia de la prueba de Nash. El reactivo de Nash se prepara añadiendo 0,3 ml de ácido acético glacial y 0,2 ml de acetil acetona a 100 ml de acetato de amonio 2 M. Las pruebas enzimáticas se pueden realizar tal como se ha descrito anteriormente, excepto que se usa 2-oxoglutarato no marcado y las reacciones se inactivan mediante la adición de 2 volúmenes de reactivo de Nash, seguido de un período de incubación de 10 min a 60 °C para convertir el formaldehído en diacetildihidrolutidina (DDL). La fluorescencia de DDL puede registrarse usando un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Varian; www.varianinc.com) a λ_{ex} = 412 nm y λ_{em} = 505 nm. Las acilciclohexanodionas, prohexadiona cálcica o trinexapac-etilo se pueden someter a ensayo como posibles inhibidores enzimáticos a concentraciones de hasta 500 µM usando 2-oxoglutarato 100 µM en una prueba convencional.

IV. Experimentos adicionales

- 55 1. Mediciones adicionales de O₂ en lacasa adicional

Se realizaron mediciones de la concentración de oxígeno para confirmar los resultados que se recopilaron en los experimentos previos. Se sometieron a ensayo los siguientes opioides adicionales: metadona, dihidrocodeína,

diacetilmorfina e hidromorfona.

Mezcla de reacción final: 1.000 mg l⁻¹ de opioide, 10 unidades de lacasa por ml en solución de tampón de NaPi 50 mM a pH 7.

Los resultados de las mediciones se pueden observar en la Fig. 17. Las reacciones confirman las mediciones previas de oxycodona, tapentadol y morfina, en las que una disminución en la concentración de oxígeno y, por lo tanto, la actividad de lacasa solo podría ser presenciada en presencia de un grupo fenólico. Para los opioides recién sometidos a ensayo, exclusivamente la hidromorfona mostró actividad de lacasa, mientras que con todos los demás opioides la concentración se mantuvo estable.

2. Sistema mediador de lacasa (LMS): eliminación de opioides

Los mediadores se pueden usar como transportes de electrones para facilitar la oxidación de sustratos complejos que de otro modo no podrían oxidarse mediante una lacasa por sí mismos. Mientras que los opioides que contienen un grupo fenólico sirven fácilmente como sustrato para las lacasas, otros opioides, tales como oxycodona, metadona o dihidrocodeína, no se oxidan tan fácilmente. El intervalo de sustrato de las lacasas se puede aumentar con los mediadores: Estas moléculas, a menudo pequeñas, son oxidadas por la lacasa en una primera etapa y, a continuación, reaccionan en su estado oxidado con una amplia diversidad de sustratos diana.

Durante la reacción, el oxígeno actúa como aceptor de electrones y se reduce a agua mediante las lacasas, mientras los mediadores se oxidan. La concentración de oxígeno se midió tal como se ha descrito anteriormente. El oxígeno se consume hasta que el mediador esté completamente oxidado. Se eligió una configuración experimental abierta; por tanto, la concentración de oxígeno puede recuperarse a su valor inicial. La segunda etapa de la reacción es iniciada mediante la adición del sustrato diana, que es consecuentemente oxidado por los mediadores. Los mediadores ahora reducidos pueden volver a ser la diana de las lacasas, lo que conduce a una disminución en la concentración de oxígeno una vez más (véase la Fig. 18).

En los presentes experimentos, las mezclas de reacción finales contenían mediador de 0,2 a 6 mM, 1-10 unidades de lacasa por ml y 100 – 3.000 mg l⁻¹ de opioide.

2.1. LMS y oxycodona

La Fig. 19 muestra los niveles de concentración de oxígeno para oxycodona en el sistema mediador de lacasa. Los diferentes mediadores se usaron a concentraciones de 2 mM con 10 unidades de lacasa ml⁻¹ y 1.000 mg l⁻¹ de oxycodona. La primera caída en la concentración de oxígeno representa la oxidación de los mediadores respectivos con la lacasa, la segunda caída, que se produjo justo después de la adición del opioide, se debió a la posterior oxidación del opioide.

Los mediadores vanilina, etilvanilina y ácido sirínico mostraron una caída en la concentración de oxígeno después de la adición de oxycodona, que se puede observar en la Fig. 19. Esto muestra una oxidación de la oxycodona.

Para confirmar adicionalmente la oxidación y la eliminación de oxycodona se realizaron mediciones de HPLC-EM/TOF.

Las concentraciones se determinaron con un espectrómetro de masas de cromatografía líquida-ionización por electropulverización-tiempo de vuelo (HPLC-ESI-TOF) de Agilent (serie A1260, Agilent US). Las sustancias contenidas en las muestras fueron separadas por una columna Zorbax Hilic Plus, de 2,1x100 mm, 3,5 µm (Agilent, US). El gradiente se ajustó al 100 % de la fase móvil A (formiato de amonio 65 mM a pH 3,2) con una velocidad de flujo de 0,4 ml/min a 40 °C y cambió al 100 % de fase móvil B (acetonitrilo) en 15 minutos con un volumen de inyección de 1 µl. Los espectros se adquirieron en el intervalo m/z de 100 a 3.000 a una velocidad de barrido de dos espectros por segundo. La curva típica para cada opioide se realizó con los patrones correspondientes que varían de 0,001 a 50 mg l⁻¹.

Además de las reacciones mostradas en la Fig. 18, el mediador vanilina se usó a una concentración más alta (6 mM). Los resultados se pueden observar en la Fig. 20 y la Fig. 21. Se confirmó la disminución en la concentración de oxycodona. Uno de los principales productos de degradación de la oxycodona, oximorfona, se halló en todas las muestras. La oximorfona es una impureza de oxycodona y, por lo tanto, está presente incluso en los controles en los que no se usó lacasa o mediador. Sin embargo, un aumento en el área de pico de la oximorfona a lo largo del tiempo solo se puede observar para la oxycodona en combinación con el sistema mediador de lacasa. El único mediador que no tuvo efecto aparente en la oxycodona fue el ácido gálico, una observación que fue respaldada tanto por la medición de la concentración de oxígeno como por el análisis de EM-TOF.

2.2. LMS y metadona

Para la metadona, se realizaron mediciones de oxígeno, pero con una paleta extendida de mediadores: además de los mediadores mencionados anteriormente, se sometieron a ensayo el ácido sirínico, TEMPO, sirínol y ABTS. El mejor efecto se observó con ABTS, tal como se puede observar en la Fig. 22. De nuevo, la disminución en la

concentración de oxígeno muestra la oxidación de la sustancia diana.

3. Pareja de enzimas API Diacetilmorfina (DAM) Esterasa

5 Como ejemplo de una reacción en dos etapas para una pareja de enzimas API, se investigó la diacetilmorfina. En una primera reacción, se usa una esterasa para desacetilar la diacetilmorfina a monoacetilmorfina y, posteriormente, a morfina. El esquema de reacción general se puede observar en la Fig. 23. La morfina se puede oxidar mediante lacasas, tal como se ha descrito anteriormente.

Además de la cuantificación de HPLC EM-TOF, el aumento de acetato resultante de la desacetilación de DAM se midió mediante HPLC/RI.

3.1. Prueba de actividad de esterasa

10 La actividad de esterasa se determinó fotométricamente en solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7) usando acetato de p-nitrofenol (pNPA) como sustrato. El procedimiento usado fue descrito por Huggins y col., J. Biol. Chem. 170 (1947) 467-482 con algunas modificaciones (Herrero Acero y col., Macromolecules 44 (2011), 4632-4640). Las esterases pueden hidrolizar pNPA a ácido acético y p-nitrofenol. Además, se puede medir el aumento de la absorbancia de p-nitrofenol.

15 Se preparó una solución madre de pNPA 8,3 mM en DMSO y se diluyó en tampón de fosfato de sodio. La mezcla de reacción final contenía 200 µl de solución de pNPA y 20 µl de solución enzimática diluida adecuadamente. La absorbancia de p-nitrofenol liberado se midió a 30 °C y 405 nm ($\epsilon = 90,32 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH 7) usando un lector de microplacas multimodo. Una unidad de actividad de esterasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de p-nitrofenol por minuto en condiciones de prueba. Para las muestras de ensayo en blanco, la mezcla de
20 reacción se preparó de la misma manera, excepto que la solución de enzima se sustituyó por agua. Se midió una prueba de ensayo en blanco usando 20 µl de solución de tampón en lugar de muestra. La actividad volumétrica de la enzima se calculó usando una adaptación de la ley Lambert Beer (Hughes y col., Anal. Chem. 24 (1952), 1349-1354).

3.2. Conversión enzimática de Diacetilmorfina a Morfina

25 La cutinasa de *Humicola insolens* (HiC) se adquirió a través de Novozymes (Dinamarca) y se produjo y purificó la cutinasa 1 de *Thermobifida cellulosilytica* (THC) según lo descrito por Herrero Acero y col., 2011. Estas enzimas han demostrado ser capaces de hidrolizar estructuras complejas en el pasado (Perz y col., Nat. Biotechnol. 33, (2016), 295-304). Las actividades de ambas enzimas se determinaron mediante la prueba de actividad de pNPA.

La conversión enzimática de diacetilmorfina a morfina se llevó a cabo usando las dos esterases diferentes, HiC y
30 THC. La reacción de hidrólisis se realizó incubando 15 mg de diacetilmorfina en solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7) con 10 U ml⁻¹ de la enzima respectiva a temperatura ambiente y a 50 °C durante 5 días. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 10 ml y se agitó a 400 rpm durante todo el experimento. Dado que el ácido acético es volátil, la reacción tuvo que llevarse a cabo en un tubo de vidrio sellado herméticamente. Se extrajeron muestras de 1 ml en cada punto de tiempo y se filtraron a través de una jeringa y un filtro de membrana
35 con un tamaño de poro de 0,45 µm y, posteriormente, se precipitaron usando la precipitación de Carrez para retirar la enzima. A 1 ml de muestra se añadieron 20 µl de reactivo de Carrez 1 (10,6 % en p/v de hexacianoferrato de potasio (II)-trihidrato) y se agitaron en vórtice. Después de 1 minuto, se añadieron 20 µl de C2 (28,8 % en p/v de heptahidrato de sulfato de zinc), se agitaron en vórtice y se incubaron durante otros 5 minutos, seguido de centrifugación durante 30 minutos y 13.000 rpm. El sobrenadante se usó para un análisis posterior.

40 La cantidad de ácido acético resultante se detectó mediante detector de RI, después de la separación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (los parámetros se describen a continuación). La cantidad de ácido acético resultante se detectó mediante análisis de HPLC-RI. Para la cuantificación, se prepararon patrones de ácido acético en un intervalo de 1 g l⁻¹ a 0,01 g l⁻¹ en agua ultrapura. Antes del análisis de HPLC, el pH de cada muestra tenía que ajustarse a 4-6 mediante la adición de 10-20 µl de HCl 1 M. Todos los experimentos se realizaron como duplicados.
45 Como control positivo, la diacetilmorfina se hidrolizó químicamente en NaOH 0,1 M, tal como se describe por Nakamura y col. (Nakamura y col., J. Chromatogr. 110 (1975), 81-89).

3.3. Cuantificación de la desacetilación mediante HPLC

Los productos obtenidos se separaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de Agilent (serie A1100, Agilent US). Esto fue realizado por una columna ICsep ION 300, de 7,8x300 mm, 7 µm suministrada por Transgenomic (US). Como fase móvil, se usó H₂SO₄ 0,01 N con un caudal de 0,325 ml min⁻¹ a 45 °C. El volumen de
50 inyección fue de 40 µl de muestra en un tiempo de ciclo de 60 min. La cantidad de ácido acético fue determinada por el detector RI del instrumento. El procedimiento fue calibrado usando patrones de ácido acético dentro de un intervalo de 10 mg l⁻¹ a 1.000 mg l⁻¹.

3.4. Resultados

El rendimiento total de acetato a lo largo del tiempo puede observarse en la Fig. 24. A una temperatura de 50 °C, ambas enzimas pudieron hidrolizar más del 50 % de la diacetilmorfina, lo que indica una desacetilación completa de la morfina.

- 5 La medición directa de las concentraciones de opioides confirma esta suposición, que se puede observar en la Fig. 25: Mientras que la concentración de DAM disminuye en todas las muestras, la concentración de morfina solo aumenta en las muestras que se incubaron a 50 °C. A temperaturas más bajas, parece que solo se produce monoacetilmorfina.

4. Inactivación de enzimas - SGF y proteasas

- 10 La inactivación de las enzimas cuando los fármacos se administran como está previsto es una parte integral de la invención. La inactivación puede lograrse tanto por desnaturalización ácida como por degradación proteolítica (Fig. 26).

Para evaluar la viabilidad de los procedimientos de inactivación, se realizaron pruebas de digestión de proteasas, así como pruebas de estabilidad de enzimas en diversos niveles de pH.

4.1. Prueba de digestión de pepsina

- 15 El procedimiento usado para demostrar la digestión con pepsina de MTL fue descrito por Thomas y col. (Thomas y col., Regul. Toxicol. Pharmacol. 39 (2004), 87-98) y es un protocolo estandarizado que usa fluido gástrico simulado (SGF por su sigla en inglés). El SGF contiene HCl 0,084 M, NaCl 0,035 M, 4.000 U de pepsina por mezcla de reacción y tiene un nivel de pH de 1,2 de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos (1995). Se usó una relación de 10.000 Unidades de actividad de pepsina a 1 mg de proteína de ensayo durante toda la prueba, que se
20 basa en una evaluación de la actividad promedia de pepsina recomendada en la Farmacopea de los Estados Unidos (24ª edición, 2000) con algunas modificaciones. La pepsina (ref. n.º P7000) se adquirió a través de Sigma-Aldrich (EE. UU.). Todas las proteínas que se usaron se disolvieron en Tris-HCl 50 mM (pH 9,5) a una concentración de 5 mg ml⁻¹. La mezcla de reacción contenía 1,52 ml de SGF precalentado a 37 °C antes de la adición de 0,08 ml de solución de proteína (Thomas y col., 2004). La mezcla se colocó en un termomezclador a 37 °C y se agitó a
25 400 rpm. Para desnaturalizar el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), las muestras de 160 µl se tomaron a los 0 minutos, 0,5 minutos y 15 minutos después del inicio.

4.2. Análisis SDS-PAGE

- 30 Se realizó el SDS-PAGE para analizar e inspeccionar visualmente las bandas de proteína teñidas, ya sea que la banda de proteína todavía esté intacta o fragmentada después de la prueba de digestión. Se adquirieron geles de tris-glicina prefabricados (ref. n.º 456-1086) con el 4-15 % de poliacrilamida, solución de tampón de tris-glicina-SDS 10 veces (TGS) (ref. n.º 1610772) y solución de tampón de muestra Laemmli 4 veces (ref. n.º 1610747) a través de Bio-Rad Laboratories (Hercules, EE. UU.). La solución de tampón Laemmli 4 veces se diluyó en 10:1 con 2-mercaptoetanol antes de su uso. El siguiente procedimiento de preparación de muestras fue descrito por Thomas y col. (Thomas y col., 2004).

- 35 Cada 160 µl de las muestras de digestión se inactivaron añadiendo 56 µl de NaHCO₃ 200 mM como etapa de neutralización y 56 µl de solución de tampón Laemmli (Laemmli 1970) para electroforesis. Las muestras se calentaron inmediatamente hasta 99 °C durante 10 minutos y se analizaron directamente o se almacenaron a -20 °C. Las muestras de control para la pepsina y la estabilidad de la proteína de ensayo (SGF sin pepsina, pero con proteína de ensayo) se sometieron a tratamiento de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Las
40 muestras de digestión con punto de tiempo cero se prepararon de manera diferente, ya que la pepsina comienza inmediatamente a digerir y autodigerir tan pronto como está en solución. Antes de añadir la proteína de ensayo, la pepsina ya estaba desnaturalizada en una solución de inactivación y calentada hasta 99 °C durante 5 minutos. Después, la muestra se calentó de nuevo durante 5 minutos para garantizar la desnaturalización adecuada de la proteína de ensayo. Se cargaron 15 µl de cada muestra y 5 µl de marcador de proteína preteñida IV (ref. n.º 27-2110, Peqlab) en el gel y, posteriormente, se ciclaron en tampón de ciclación de tris-glicina durante 30-45 minutos a
45 200 V. Para la visualización, los geles se incubaron con una solución de tinción con azul de Coomassie (Coomassie R250 al 0,1 % en p v⁻¹, ácido acético al 10 % en v v⁻¹, metanol al 45 % en v v⁻¹) durante 30 minutos, seguido de una etapa de destinción (ácido acético 10 % en v v⁻¹, metanol 40 % en v v⁻¹) durante 10-30 minutos.

- 50 Los resultados de la degradación de la enzima proteolítica se pueden observar en la Fig. 27. MTL y HRP son muy susceptibles a la degradación proteolítica, ya que sus bandas de proteína respectivas desaparecieron en 30 segundos. El HiC presentó una disminución moderada en la concentración.

4.3. Prueba de estabilidad de la lacasa

- 55 Para establecer un perfil de pH para las actividades enzimáticas de MTL se midieron a diferentes niveles de pH de ácido a neutro (pH 2,5 – pH 7) a lo largo del tiempo usando ABTS como sustrato. Para cada nivel de pH, la MTL se diluyó en 1:100 en la solución de tampón respectiva y se incubó durante una hora y temperatura ambiente. La actividad enzimática se midió en puntos de tiempo distintivos. La actividad se midió y se calculó mediante prueba de

ABTS (descrita anteriormente), usando diferentes coeficientes de extinción para cada nivel de pH (pH 7: $\epsilon = 11,38 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 6: $\epsilon = 23,34 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 5: $\epsilon = 32,03 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 4: $\epsilon = 35,49 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 3, 2: $\epsilon = 36,00 \text{ ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; tesis de máster ("Laccasas as effective siccatives in alkyl resins"), Scholz, 2015.

- 5 El perfil de pH de la MTL se puede observar en la Fig. 28, mientras que el perfil de estabilidad en diferentes niveles de pH a lo largo del tiempo se muestra en la Fig. 29. MTL tiene dos máximos de actividad, uno a pH 7 y el segundo a pH 3 y no muestra actividad en condiciones de medio de SGF. El perfil de estabilidad indica que MTL permanece la mayor parte de su actividad en un intervalo de pH de 4 a 7, pero pierde actividad bastante rápidamente a pH más bajos.

5. Lacasa adicional: pruebas con morfina (altas concentraciones)

- 10 Se realizaron varios experimentos adicionales usando diversas concentraciones de morfina y lacasa. Los resultados presentados en los siguientes ejemplos y figuras respaldan las reivindicaciones de que la velocidad de degradación se correlaciona directamente con la cantidad de lacasa, así como con la concentración de opioides. Los ejemplos presentes también se basan en un análisis aún más fiable y mejorado.

5.1. Polimerización de morfina con lacasa de *Myceliophthora thermophila*

- 15 La polimerización de morfina se llevó a cabo en diferentes enfoques, con concentraciones de morfina que varían de 1 mg l^{-1} a 60.000 mg l^{-1} . Las reacciones se llevaron a cabo en solución de tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 7. El procedimiento de oxidación se inició mediante la adición de lacasa MTL con una actividad final de 10 U a 100 U. En la Fig. 30 se muestran diversas concentraciones de morfina.

- 20 La Fig. 31 muestra que un aumento de la concentración de lacasa es lineal con respecto a la disminución de la concentración de morfina (es decir, 10 veces más lacasa da como resultado una degradación ~10 veces más rápida). La Fig. 32 muestra la conversión de 60.000 mg/l de morfina, casi en el límite de solubilidad de la morfina.

Por lo tanto, estos resultados están completamente en línea con el 1.6 anterior.

Realizaciones preferidas:

La presente invención, por lo tanto, se refiere a las siguientes realizaciones preferidas:

- 25 1. Composición farmacéutica disuasiva del abuso que comprende un fármaco con un grupo funcional reactivo con enzima, en la que el fármaco tiene un potencial de abuso y una enzima capaz de reaccionar con el grupo funcional reactivo con enzima (una enzima de procesamiento del fármaco), en la que el fármaco con el grupo funcional reactivo con enzima está contenido en la composición farmacéutica en un estado reactivo con enzima estable al almacenamiento y en condiciones en las que ninguna actividad enzimática actúa sobre el fármaco.
- 30 2. Composición farmacéutica de acuerdo con la realización 1, en la que la enzima se selecciona del grupo de reductasas y/o transferasas y/o hidrolasas, especialmente una monooxigenasa.
3. Composición farmacéutica de acuerdo con la realización 1 o 2, en la que el grupo funcional reactivo con enzima es un grupo hidroxilo fenólico o un grupo amino fenólico, preferentemente un grupo hidroxilo fenólico.
- 35 4. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en la que la enzima cataliza la desalquilación en O, preferentemente desmetilación en O, la desalquilación en N, preferentemente la desmetilación en N, reducción en ceto, oxidación en N, la hidroxilación en epoxi, la esterificación, la desamidación, la peroxigenación o la deshalogenación del fármaco o la adición de moléculas, especialmente la glucuronidación, la sulfatación y la acetilación, al fármaco.
- 40 5. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en la que la enzima se selecciona del grupo de 3-alfa-hidroxiesteroide 3-deshidrogenasa (EC 1.1.1.213), citocromo P450 (EC 1.14), especialmente monooxigenasa dependiente de hierro de no hemo (EC 1.14.16), monooxigenasas dependientes de cobre (EC 1.14.17 y EC 1.14.18), la subfamilia CYP2C; CYP2D6; monooxigenasa no específica (EC 1.14.14.1), codeína 3-O-desmetilasa (CODM; EC 1.14.11.32), CYP1-3 (EC 1.14.14.1), preferentemente CYP3A, CYP1A, CYP2B, CYP2C y CYP2D, especialmente CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9,
- 45 CYP2C19 y CYP2D6; peroxidasa (EC 1.11.1 y EC 1.11.2), preferentemente peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7) y peroxigenasa no específica de hongos (EC 1.11.2.1); carbonil reductasa (NADPH) (EC 1.1.1.184), preferentemente dihidromorfina cetona reductasa (DMKR; tipos I a V), dihidrocodeinona cetona reductasa (DCKR, tipos I y II) o morfina 6-deshidrogenasa (EC 1.1.1.218); monooxigenasas dependientes de flavina (EC 1.13.12 y EC 1.14.13), especialmente monooxigenasa que contiene flavina (EC 1.14.13.8); epóxido hidrolasa microsomal (EC 3.3.2.9), monooxigenasa independiente de cofactores; epóxido hidratasa (EC 3.3.2.3 y 4.2.1.63) y epóxido hidrolasa soluble (EC 3.3.2.10); UDP-glucuronosil transferasa (EC 2.4.1.17), preferentemente las enzimas UGT1 y UGT2, especialmente UGT1.1 y UGT2B7; bilirrubin-glucuronósido glucuronosil transferasa (EC 2.4.1.95); ac(et)iltransferasa (EC 2.3), sulfotransferasas (EC 2.8.2), CoA-transferasa (EC 2.8.3), especialmente N-acetiltransferasa (NAT, EC 2.3.1) y O-acetiltransferasa (OAT; EC 2.3.1); catecol oxidasas (EC 1.10.3.1), bilirrubin oxidasas (EC 1.3.3.5), monofenol monooxigenasas (EC 1.14.18.1), manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13), monofenol monooxigenasas (EC 1.14.99.1), tirosinasas (EC 1.14.18.1) y ascorbato oxidasas (EC 1.10.3.3).
- 50 6. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en la que el fármaco es

un fármaco opioide con un grupo funcional reactivo con enzima, preferentemente seleccionado del grupo morfina, tapentadol, oxicodona, buprenorfina, cebranopadol, diamorfina (=heroína), dihidrocodeína, etilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, metadona y levometadona, oximorfona, pentazocina, petidina, fentanilo, levorfanol y levometorfanol y sales, ésteres, profármacos y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos, especialmente oxicodona o morfina.

7. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en la que la composición comprende una combinación de fármaco/enzima seleccionada de morfina/lacasa, tapentadol/lacasa, oximorfona/lacasa, hidromorfona/lacasa, pentazocina/lacasa, buprenorfina/lacasa, diacetilmorfina/hidrolasa/lacasa, levorfanol/lacasa, oxicodona/lacasa/enzima de procesamiento de oxicodona.

8. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en la que la composición farmacéutica se selecciona de un comprimido, un mini-comprimido, un comprimido de núcleo recubierto (comprimido recubierto), un comprimido de dos capas, un comprimido de múltiples capas, un comprimido efervescente, un comprimido soluble, un comprimido dispersable, una cápsula, una pella, un MUPS (sistema de pellas de unidades múltiples), un granulado, un polvo, formas especialmente recubiertas, recubiertas con azúcar y/o funcionalmente recubiertas de los mismos. (por ejemplo, con recubrimiento entérico).

9. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 8, en la que el fármaco está contenido en una cantidad de 0,1 a 5.000 mg, preferentemente de 0,5 a 1.000 mg, especialmente de 1 a 500 mg, por unidad de dosificación.

10. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la enzima está contenida en una cantidad de 1 a 1.000 unidades, preferentemente de 10 a 100 unidades.

11. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 10, en la que la composición comprende una característica adicional de disuasión del abuso, preferentemente seleccionada del grupo de una barrera física o química, especialmente una dureza aumentada del comprimido, un antagonista del fármaco, un componente de aversión, un sistema de administración de disuasión del abuso y un profármaco, especialmente una barrera física o un componente de aversión, especialmente un agente gelificante y/o un agente que aumenta la viscosidad no gelificante.

12. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 11, en la que la composición comprende cofactores de la enzima, preferentemente H y/o donadores y aceptores de electrones, especialmente NAD(P)H, FMN, FAD, ferredoxina, 2-oxoglutarato, y/o hemos; o donadores para los grupos que se añadirán al fármaco, especialmente la acetil Coenzima A (ac-CoA) o el UDP-glucuronato.

13. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 12, en la que la composición comprende una matriz que contiene del 1 al 80 % en peso de uno o más polímeros hidrófobos o hidrófilos, preferentemente una matriz que comprende agar, ácido alámico, ácido algínico, carmelosa, carboximetilcelulosa sódica, carbómero, carragenano, quitosano, especialmente carboximetilquitosano, catecol, copovidona, dextrina, gelatina, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de ácido metacrílico, derivados de metilcelulosa, celulosa microcristalina, ácido poliácrico, óxido de polialquileño, especialmente polietilenglicol, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, povidona, alginato de propilenglicol, copolímero de injerto de polivinilcaprolactama-acetato de polivinilo-polietilenglicol, pululano, dióxido de silicio, alginato de sodio, almidón, copolímeros de vinilpirrolidona-acetato de vinilo o de un formador de matriz no polimérica, preferentemente cera microcristalina, alcoholes grasos y ácidos grasos, especialmente alcohol estearílico, alcohol cetil estearílico, ácido esteárico, ácido palmítico o sales y mezclas de los mismos, mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos saturados con una longitud de cadena entre 16 y 22 átomos de carbono y una mezcla de tales mono-, di- y triglicéridos.

14. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 13, en la que la composición es estable al almacenamiento, preferentemente que comprende menos del 5 %, especialmente menos del 1 %, de fármaco procesado enzimáticamente después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C en condiciones secas.

15. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 14, en la que la enzima es lábil a los ácidos.

16. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 15, que comprende, además, un componente formador de hidrogel y/o un reticulante, preferentemente quitosano y/o catecol o carboximetilquitosano y/o vanilina.

17. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 16, en la que la composición es una composición de liberación modificada, especialmente una composición de liberación prolongada.

18. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 17, que comprende una enzima adicional, preferentemente una enzima de procesamiento del fármaco adicional o una enzima que procesa adicionalmente las formas del fármaco procesado, especialmente lacasa (EC 1.10.3.2).

19. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 18, en la que el fármaco es un fármaco opioide con un grupo funcional reactivo con lacasa, preferentemente seleccionado del grupo morfina, tapentadol, hidromorfona, desomorfina, oximorfona, buprenorfina, péptidos opioides que comprenden un residuo de fenilalanina, tal como adrenorfina, amidorfina, casomorfina, DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-encefalina), DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-encefalina), dermorfina, endomorfina, morfineceptina, y TRIMU 5 (L-tirosil-N-[(3-metilbutil)amino]acetil-D-alaninamida); oripavina, 6-MDDM (6-metilenodihidrodexomorfina), clonaltrexamina, dihidromorfina, hidromorfinol, metildesorfina, N-fenetilnormorfina, RAM-378 (7,8-dihidro-14-hidroxi-N-fenetilnormorfina), heterocodeína, dihidroheterocodeína, 7-espiroindaniloximorfona, morfinona,

pentamorfona, semorfona, cloromorfida, nalbufina, oximorfazona, 1-yodomorfina, morfina-6-glucurónido, 6-monoacetilmorfina, normorfina, morfina-N-óxido, ciclorfano, dextralorfano, levorfanol, levofenacilmorfano, norlevorfanol, oxilorfano, fenomorfano, furetilnorlevorfanol, xorfanol, butorfanol, 6,14-endoetenotetrahidrooripavina, BU-48 (N-ciclopropilmetil-[7 α ,8 α ,2',3']-ciclohexano-1'[S]-hidroxi-6,14-endoetenotetrahidronororipavina), ciprenorfina, dihidroetorfina, etorfina, norbuprenorfina, 5'-guanidinonaltrindol, diprenorfina, levalorfanol, meptazinol, metilnaltrexona, nalfurafina, nalmefeno, naloxazona, naloxona, nalorfina, naltrexona, naltribeno, naltrindol, 6 β -naltrexol-d4, pseudomorfina, naloxonazina, norbinaltorfimina, alazocina, bremazocina, dezocina, cetazocina, metazocina, pentazocina, fenazocina, ciclazocina, hidroxipetidina (bemidona), cetobemidona, metil cetobemidona, propil cetobemidona, alvimopano, picenadol y sales, ésteres, profármacos y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos, más preferentemente morfina, tapentadol, buprenorfina, especialmente morfina.

20. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 19, en la que el fármaco es un fármaco opioide seleccionado del grupo que consiste en morfina, tapentadol, hidromorfona, desomorfina, oximorfona, buprenorfina, péptidos opioides que comprenden un residuo de fenilalanina, tal como adrenorfina, amidorfina, casomorfina, DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-encefalina), DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-encefalina), dermorfina, endomorfina, morfeceptina y TRIMU 5 (L-tirosil-N-[(3-metilbutil)amino]acetil-D-alaninamida); oripavina, 6-MDDM (6-metilenodihidrodesoximorfina), clornaltrexamina, dihidromorfina, hidromorfinol, metildesorfina, N-fenetilnormorfina, RAM-378 (7,8-dihidro-14-hidroxi-N-fenetilnormorfina), heterocodeína, dihidroheterocodeína, 7-espiroindaniloximorfona, morfinona, pentamorfona, semorfona, cloromorfida, nalbufina, oximorfazona, 1-yodomorfona, morfina-6-glucurónido, 6-monoacetil morfina, normorfina, morfina-N-óxido, ciclorfano, dextralorfano, levorfanol, levofenacilmorfano, norlevorfanol, oxilorfano, fenomorfano, furetilnorlevorfanol, xorfanol, butorfanol, 6,14-endoetenotetrahidrooripavina, BU-48 (N-ciclopropilmetil-[7 α ,8 α ,2',3']-ciclohexano-1'[S]-hidroxi-6,14-endoetenotetrahidronororipavina), ciprenorfina, dihidroetorfina, etorfina, norbuprenorfina, 5'-guanidinonaltrindol, diprenorfina, levalorfanol, meptazinol, metilnaltrexona, nalfurafina, nalmefeno, naloxazona, naloxona, nalorfina, naltrexona, naltribeno, naltrindol, 6 β -naltrexol-d4, pseudomorfina, naloxonazina, norbinaltorfimina, alazocina, bremazocina, dezocina, cetazocina, metazocina, pentazocina, fenazocina, ciclazocina, hidroxipetidina (bemidona), cetobemidona, metil cetobemidona, propil cetobemidona, picenadol, codeína, tebaína, diacetil morfina (diacetato de morfina; heroína), nicomorfina (dinicotinato de morfina), dipropanoil morfina (dipropionato de morfina), diacetildihidromorfina, acetilpropionilmorfina, dibenzoilmorfina, dihidrocodeína, etilmorfina, hidrocodona, oxícodona, fentanilo, α -metilfentanilo, alfentanilo, sufentanilo, remifentanilo, carfentanilo, ohmefentanilo, petidina (meperidina), MPPP, alilprodina, α -prodina, PEPAP, propoxifeno, dextropropoxifeno, dextromoramida, becitramida, piritramida, metadona, levometadona, petidina, dipipanona, acetato de levometadilo (LAAM), difenoxina, difenoxilato, levometorfanol, dextrometorfanol, lefetamina, mitraginina, tilidina, tramadol, eluxadolina, 2,4-dinitrofenilmorfina, dihidroheroína, 6-MAC, bencilmorfina, bromometilato de codeína, folcodina, mirofina, 8-CAC, 4-fluoromeperidina, alilnorpetidina, anileridina, bencetidina, carperidina, etoxeridina, furetidina, morferidina, oxofeneridina, feneridina, fenoperidina, piminodina, properidina, sameridina, α -meprodina, prosidol, trimeperidina, acetoxicetobemidona, droxipropina, dipipanona, normetadona, fenadoxona, dimefeptanol, levacetilmetadol, dextromoramida, levomoramida, racemoramida, dietiltiambuteno, dimetiltiambuteno, etilmetiltiambuteno, piperidiltiambuteno, pirrolidiniltiambuteno, tiambuteno, tipepidina, dimenoxadol, dextropropoxifeno, levopropoxifeno, norpropoxifeno, butirato de dioxafetilo, diampromida, fenampromida, propiram, metiodona, isoaminilo, lefetamina, R-4066, 3-alilfentanilo, 3-metilfentanilo, 4-fenilfentanilo, alfentanilo, α -metilacetilfentanilo, β -hidroxifentanilo, β -hidroxitiofentanilo, β -metilfentanilo, brifentanilo, lofentanilo, mirfentanilo, ocfentanilo, parafluorofentanilo, fenaridina, tiofentanilo, trefentanilo, etoheptazina, metoheptazina, metetoheptazina, proheptazina, becitramida, piritramida, clonitaceno, etonitaceno, 18-MC, 7-hidroximitraginina, acuamina, eserolina, hodgkinsina, mitraginina, pericina, BW373U86, DPI-221, DPI-287, DPI-3290, SNC-80, AD-1211, AH-7921, azaprocina, bromadol, BRL-52537, bromadolina, C-8813, ciramadol, doxipicomina, enadolina, faxeladol, GR-89696, herkinorina, ICI-199441, ICI-204448, J-113397, JTC-801, LPK-26, metofolina, MT-45 y sales, hidratos, solvatos, ésteres, profármacos y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos, más preferentemente morfina, oxícodona, tapentadol, buprenorfina, cebranopadol, diamorfina (=heroína), dihidrocodeína, etilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, metadona y levometadona, oximorfona, pentazocina, petidina, fentanilo, levorfanol y levometorfanol, especialmente oxícodona y morfina.

21. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 20, en la que la composición produce liberación inmediata, liberación modificada o una combinación de las mismas.

22. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 21, en la que la composición comprende un analgésico opioide solo o en combinación con un analgésico no opioide, especialmente con ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, paracetamol y ácido acetilsalicílico.

23. Procedimiento para fabricar una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 22 que comprende las etapas de mezclar el fármaco con la enzima y terminar la mezcla en una composición farmacéutica.

24. Procedimiento para fabricar una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 22 que comprende las etapas de proporcionar el fármaco y la enzima en forma separada y terminar el fármaco y la enzima separados en una composición farmacéutica.

25. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 22 para su uso en el tratamiento de la adicción a los fármacos.

26. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 22 para su uso en el tratamiento del dolor.

27. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 22, en la que la enzima de procesamiento del fármaco esencialmente no actúa sobre el fármaco *in vivo* cuando la composición se administra de la manera prevista e intacta.

28. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 22, en la que la enzima de procesamiento del fármaco existe en la formulación en una forma esencialmente no liberable cuando la composición se administra de la manera prevista e intacta.

29. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 22, en la que la enzima de procesamiento del fármaco se desactiva *in vivo*.

30. Composiciones farmacéuticas de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 29, con un contenido de humedad por debajo del 10 %, preferentemente con un contenido de humedad por debajo del 5 %, especialmente con un contenido de humedad por debajo del 2 %.

31. Procedimiento de administración de la composición farmacéutica disuasiva del abuso de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 30 a un paciente que lo necesita, en el que la composición farmacéutica se administra por vía oral a este paciente en una cantidad eficaz y en el que la enzima de procesamiento del fármaco se desactiva automáticamente en el curso de esta administración oral.

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica disuasiva del abuso que comprende un fármaco con un grupo funcional reactivo con enzima, en la que el fármaco tiene un potencial de abuso y una enzima capaz de reaccionar con el grupo funcional reactivo con enzima (una enzima de procesamiento del fármaco), en la que el fármaco con el grupo funcional reactivo con enzima está contenido en la composición farmacéutica en un estado reactivo con enzima, estable en almacenamiento y en condiciones en las que ninguna actividad enzimática actúa sobre el fármaco.
2. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enzima se selecciona del grupo de reductasas y/o transferasas y/o hidrolasas, especialmente una monooxigenasa.
3. Composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el grupo funcional reactivo con enzima es un grupo hidroxilo fenólico o un grupo amino fenólico, preferentemente un grupo hidroxilo fenólico.
4. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la enzima cataliza la desalquilación en O, preferentemente la desmetilación en O, la desalquilación en N, preferentemente la desmetilación en N, la reducción en ceto, la oxidación en N, la hidroxilación en epoxi, la esterificación, la desamidación, la peroxigenación o la deshalogenación del fármaco o la adición de moléculas, especialmente la glucuronidación, la sulfatación y la acetilación, al fármaco.
5. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la enzima se selecciona del grupo de 3-alfa-hidroxiesteroide 3-deshidrogenasa (EC 1.1.1.213), citocromo P450 (EC 1.14), especialmente monooxigenasa dependiente de hierro de no hemo (EC 1.14.16), monooxigenasas dependientes de cobre (EC 1.14.17 y EC 1.14.18), la subfamilia CYP2C; CYP2D6; monooxigenasa no específica (EC 1.14.14.1), codeína 3-O-desmetilasa (CODM; EC 1.14.11.32), CYP1-3 (EC 1.14.14.1), preferentemente CYP3A, CYP1A, CYP2B, CYP2C y CYP2D, especialmente CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6; peroxidasas (EC 1.11.1 y EC 1.11.2), preferentemente peroxidasa de rábano picante (EC 1.11.1.7) y peroxigenasa no específica de hongos (EC 1.11.2.1); carbonil reductasa (NADPH) (EC 1.1.1.184), preferentemente dihidromorfina cetona reductasa (DMKR; tipos I a V), dihidrocodeinona cetona reductasa (DCKR, tipos I y II) o morfina 6-deshidrogenasa (EC 1.1.1.218); monooxigenasas dependientes de flavina (EC 1.13.12 y EC 1.14.13), especialmente monooxigenasa que contiene flavina (EC 1.14.13.8); epóxido hidrolasa microsomal (EC 3.3.2.9), monooxigenasa independiente de cofactores; epóxido hidratasa (EC 3.3.2.3 y 4.2.1.63) y epóxido hidrolasa soluble (EC 3.3.2.10); UDP-glucuronosiltransferasa (EC 2.4.1.17), preferentemente las enzimas UGT1 y UGT2, especialmente UGT1.1 y UGT2B7; bilirrubin-glucuronósido glucuronosiltransferasa (EC 2.4.1.95); ac(et)iltransferasa (EC 2.3), sulfotransferasas (EC 2.8.2), CoA-transferasa (EC 2.8.3), especialmente N-acetiltransferasa (NAT, EC 2.3.1) y O-acetiltransferasa (OAT; EC 2.3.1).
6. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el fármaco es un fármaco opioide con un grupo funcional reactivo con enzima, preferentemente seleccionado del grupo morfina, tapentadol, oxycodona, buprenorfina, cebranopadol, diamorfina (=heroína), dihidrocodeína, etilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, metadona y levometadona, oximorfona, pentazocina, petidina, fentanilo, levorfanol y levometorfanol y sales, ésteres, profármacos y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos, especialmente oxycodona o morfina.
7. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición comprende una combinación de fármaco/enzima seleccionada de morfina/lacasa, tapentadol/lacasa, oximorfona/lacasa, hidromorfona/lacasa, pentazocina/lacasa, buprenorfina/lacasa, diacetilmorfina/hidrolasa/lacasa, levorfanol/lacasa, oxycodona/lacasa/enzima de procesamiento de oxycodona.
8. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición farmacéutica se selecciona de un comprimido, un mini-comprimido, un comprimido de núcleo recubierto (comprimido recubierto), un comprimido de dos capas, un comprimido de múltiples capas, una cápsula, una pella, un MUPS (sistema de pellas de unidades múltiples), un granulado, un polvo, especialmente formas recubiertas, recubiertas de azúcar y/o funcionalmente recubiertas de los mismos (por ejemplo, con recubrimiento entérico).
9. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición es estable en almacenamiento, que comprende preferentemente menos del 5 %, especialmente menos del 1 %, de fármaco procesado enzimáticamente después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C en condiciones secas.
10. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende una enzima adicional, preferentemente una enzima de procesamiento del fármaco adicional o una enzima que procesa adicionalmente las formas de fármaco procesadas, especialmente lacasa (EC 1.10.3.2).
11. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el fármaco es un fármaco opioide con un grupo funcional reactivo con lacasa, preferentemente seleccionado del grupo morfina, tapentadol, hidromorfona, desomorfina, oximorfona, buprenorfina, péptidos opioides que comprenden un residuo de fenilalanina, tal como adrenorfina, amidorfina, casomorfina, DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-Enkefalina), DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-encefalina), dermorfina, endomorfina, morficeptina y TRIMU 5 (L-tirosil-N-[(3-

metilbutil)amino]acetil}-D-alaninamida); oripavina, 6-MDDM (6-metilenodihidrodesoximorfina), clornaltrexamina, dihidromorfina, hidromorfinol, metildesorfina, N-fenetilnormorfina, RAM-378 (7,8-dihidro-14-hidroxi-N-fenetilnormorfina), heterocodeína, dihidroheterocodeína, 7-espiroindaniloximorfona, morfina, pentamorfona, semorfona, cloromorfida, nalbufina, oximorfazona, 1-yodomorfina, morfina-6-glucurónido, 6-monoacetilmorfina, normorfina, morfina-N-óxido, ciclorfano, dextralorfano, levorfanol, levofenacilmorfano, norlevorfanol, oxilorfano, fenomorfano, furetilnorlevorfanol, xorfano, butorfanol, 6,14-endoetenotetrahidrooripavina, BU-48 (N-ciclopropilmetil-[7 α ,8 α ,2',3']-ciclohexano-1'[S]-hidroxi-6,14-endo-etenotetrahidronororipavina), ciprenorfina, dihidroetorfina, etorfina, norbuprenorfina, 5'-guanidinonaltrindol, diprenorfina, levalorfano, meptazinol, metilnaltrexona, nalfurafina, nalmefero, naloxazona, naloxona, nalorfina, naltrexona, naltribeno, naltrindol, 6 β -naltrexol-d4, pseudomorfina, naloxonazina, norbinaltorfimina, alazocina, bremazocina, dezocina, cetazocina, metazocina, pentazocina, fenazocina, ciclazocina, hidroxipetidina (bemidona), cetobemidona, metil cetobemidona, propil cetobemidona, alvimopano, picenadol y sales, ésteres, profármacos y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos, más preferentemente morfina, tapentadol, buprenorfina, especialmente morfina.

12. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el fármaco es un fármaco opioide seleccionado del grupo que consiste en morfina, tapentadol, hidromorfona, desomorfina, oximorfona, buprenorfina, péptidos opioides que comprenden un residuo de fenilalanina, tal como adrenorfina, amidorfina, casomorfina, DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-Encefalina), DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol]-encefalina), dermorfina, endomorfina, morfeceptina y TRIMU 5 (L-tirosil-N-[(3-metilbutil)amino]acetil}-D-alaninamida); oripavina, 6-MDDM (6-metilenodihidrodesoximorfina), clornaltrexamina, dihidromorfina, hidromorfinol, metildesorfina, N-fenetilnormorfina, RAM-378 (7,8-dihidro-14-hidroxi-N-fenetilnormorfina), heterocodeína, dihidroheterocodeína, 7-espiroindaniloximorfona, morfina, pentamorfona, semorfona, cloromorfida, nalbufina, oximorfazona, 1-yodomorfona, morfina-6-glucurónido, 6-monoacetilmorfina, normorfina, morfina-N-óxido, ciclorfano, dextralorfano, levorfanol, levofenacilmorfano, norlevorfanol, oxilorfano, fenomorfano, furetilnorlevorfanol, xorfano, butorfanol, 6,14-endoetenotetrahidrooripavina, BU-48 (N-ciclopropilmetil-[7 α ,8 α ,2',3']-ciclohexano-1'[S]-hidroxi-6,14-endo-etenotetrahidronororipavina), ciprenorfina, dihidroetorfina, etorfina, norbuprenorfina, 5'-guanidinonaltrindol, diprenorfina, levalorfano, meptazinol, metilnaltrexona, nalfurafina, nalmefero, naloxazona, naloxona, nalorfina, naltrexona, naltribeno, naltrindol, 6 β -naltrexol-d4, pseudomorfina, naloxonazina, norbinaltorfimina, alazocina, bremazocina, dezocina, cetazocina, metazocina, pentazocina, fenazocina, ciclazocina, hidroxipetidina (bemidona), cetobemidona, metil cetobemidona, propil cetobemidona, picenadol, codeína, tebaína, diacetilmorfina (diacetato de morfina; heroína), nicomorfina (dinicotinato de morfina), dipropanoilmorfina (dipropionato de morfina), diacetildihidromorfina, acetilpropionilmorfina, dibenzoilmorfina, dihidrocodeína, etilmorfina, hidrocodona, oxicodona, fentanilo, α -metilfentanilo, alfentanilo, sufentanilo, remifentanilo, carfentanilo, ohmefentanilo, petidina (meperidina), MPPP, alilprodina, α -prodina, PEPAP, propoxifeno, dextropropoxifeno, dextromoramida, becitramida, piritramida, metadona, levometadona, petidina, dipipanona, acetato de levometadilo (LAAM), difenoxina, difenoxilato, levometorfanol, dextrometorfanol, lefetamina, mitraginina, tilidina, tramadol, eluxadolina, 2,4-dinitrofenilmorfina, dihidroheroína, 6-MAC, bencilmorfina, bromometilato de codeína, folcodina, mirofina, 8-CAC, 4-fluoromeperidina, alilnorpetidina, anileridina, bencetidina, carperidina, etoxeridina, furetidina, morferidina, oxofeneridina, feneridina, fenoperidina, piminodina, properidina, sameridina, α -meproquina, prosidol, trimeperidina, acetoxicetobemidona, droxipropina, dipipanona, normetadona, fenadoxona, dimefeptanol, levacetilmetadol, dextromoramida, levomoramida, racemoramida, dietiltiambuteno, dimetiltiambuteno, etilmetiltiambuteno, piperidiltiambuteno, pirrolidiniltiambuteno, tiambuteno, tipepidina, dimenoxadol, dextropropoxifeno, levopropoxifeno, norpropoxifeno, butirato de dioxafetilo, diampromida, fenampromida, propiram, metiodona, isoaminilo, lefetamina, R-4066, 3-alilfentanilo, 3-metilfentanilo, 4-fenilfentanilo, alfentanilo, α -metilacetilfentanilo, β -hidroxifentanilo, β -hidroxiofentanilo, β -metilfentanilo, brifentanilo, lofentanilo, mirfentanilo, ocfentanilo, parafluorofentanilo, fenaridina, tiofentanilo, trefentanilo, etoheptazina, metoheptazina, metetoheptazina, proheptazina, becitramida, piritramida, clonitaceno, etonitaceno, 18-MC, 7-hidroximitraginina, acuamina, eserolina, hodgkinsina, mitraginina, pericina, BW373U86, DPI-221, DPI-287, DPI-3290, SNC-80, AD-1211, AH-7921, azaprocina, bromadol, BRL-52537, bromadolina, C-8813, ciramadol, doxipicomina, enadolina, faneladol, GR-89696, herkinorina, ICI-199441, ICI-204448, J-113397, JTC-801, LPK-26, metofolina, MT-45 y sales, hidratos, solvatos, ésteres, profármacos y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos, más preferentemente morfina, oxicodona, tapentadol, buprenorfina, cebranopadol, diamorfina (=heroína), dihidrocodeína, etilmorfina, hidrocodona, hidromorfona, metadona y levometadona, oximorfona, pentazocina, petidina, fentanilo, levorfanol y levometorfanol, especialmente oxicodona y morfina.

13. Composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento del dolor y/o adicción a los fármacos.

14. Procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las etapas de mezclar el fármaco con la enzima y terminar la mezcla en una composición farmacéutica.

15. Procedimiento de fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende las etapas de proporcionar el fármaco y la enzima en forma separada y terminar el fármaco y la enzima separados en una composición farmacéutica.

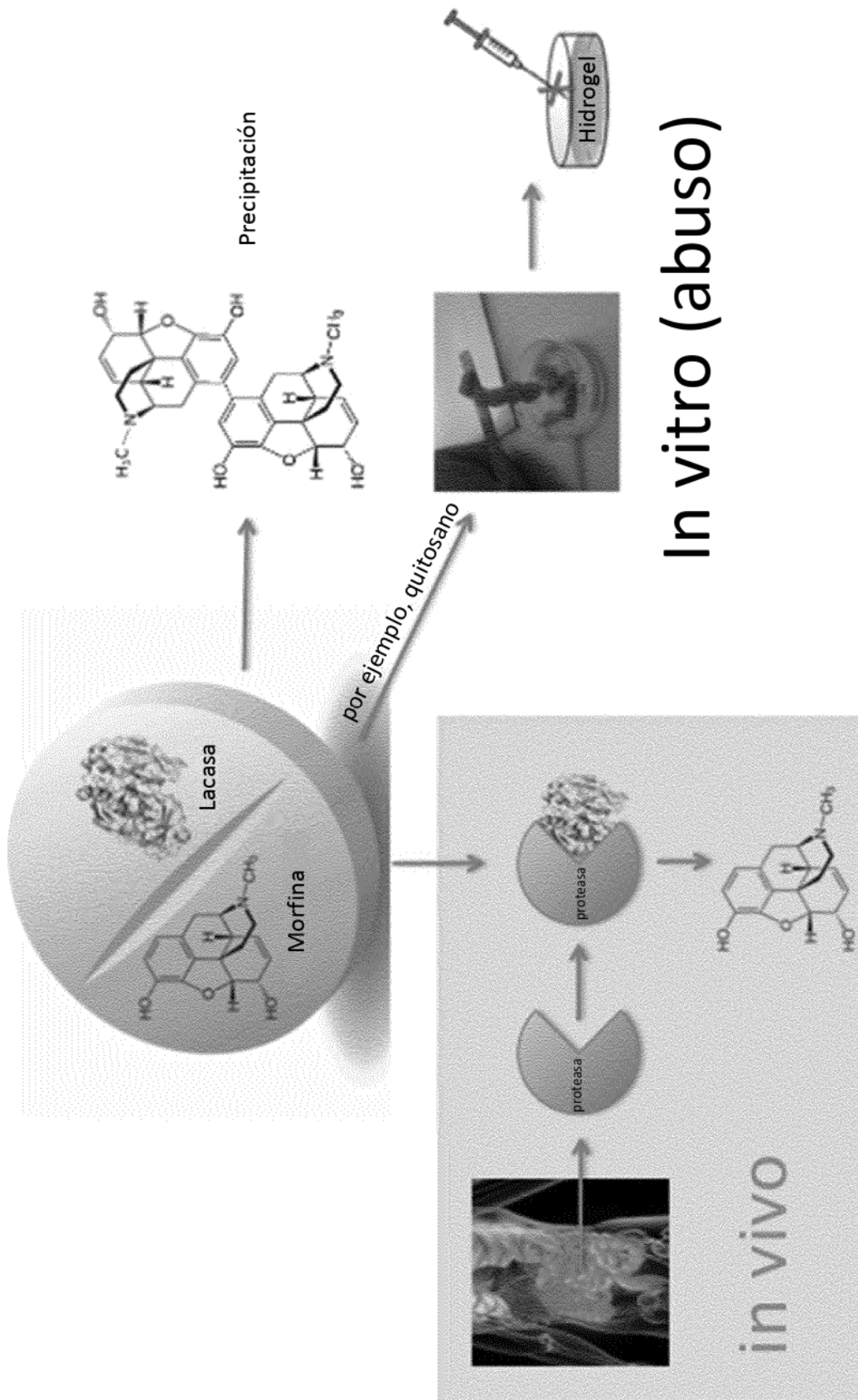


Fig. 1

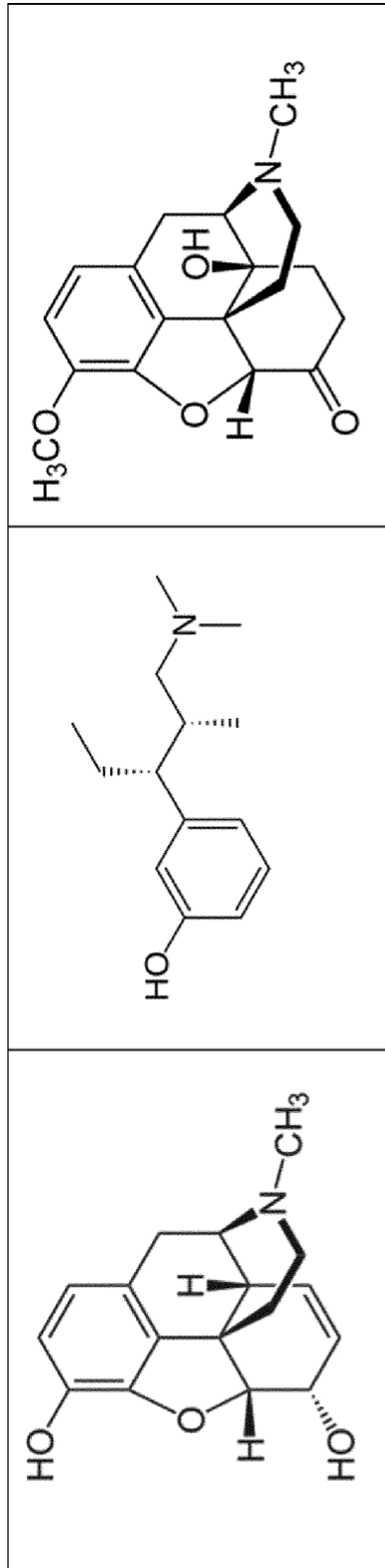


Fig. 2

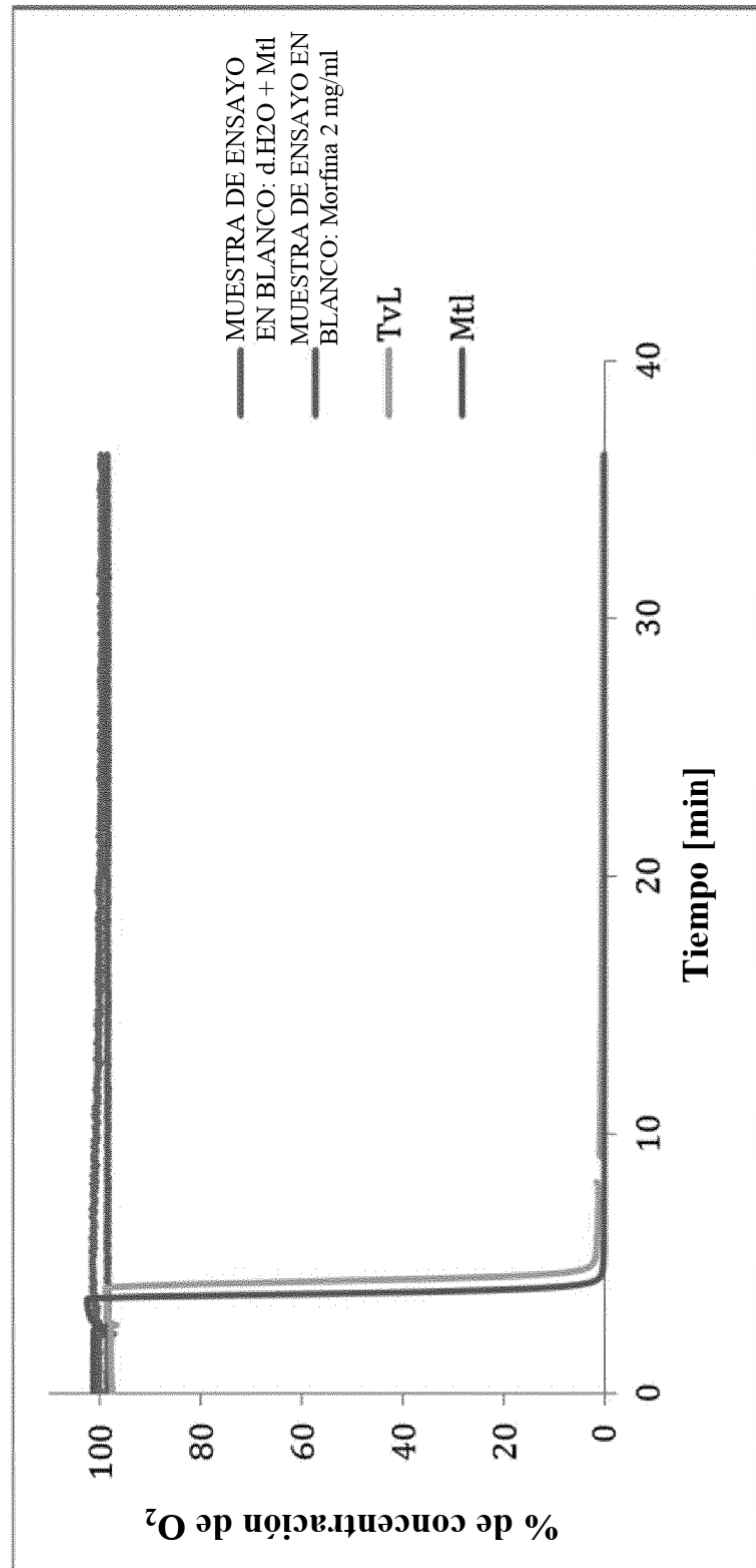


Fig. 3

Fig. 4

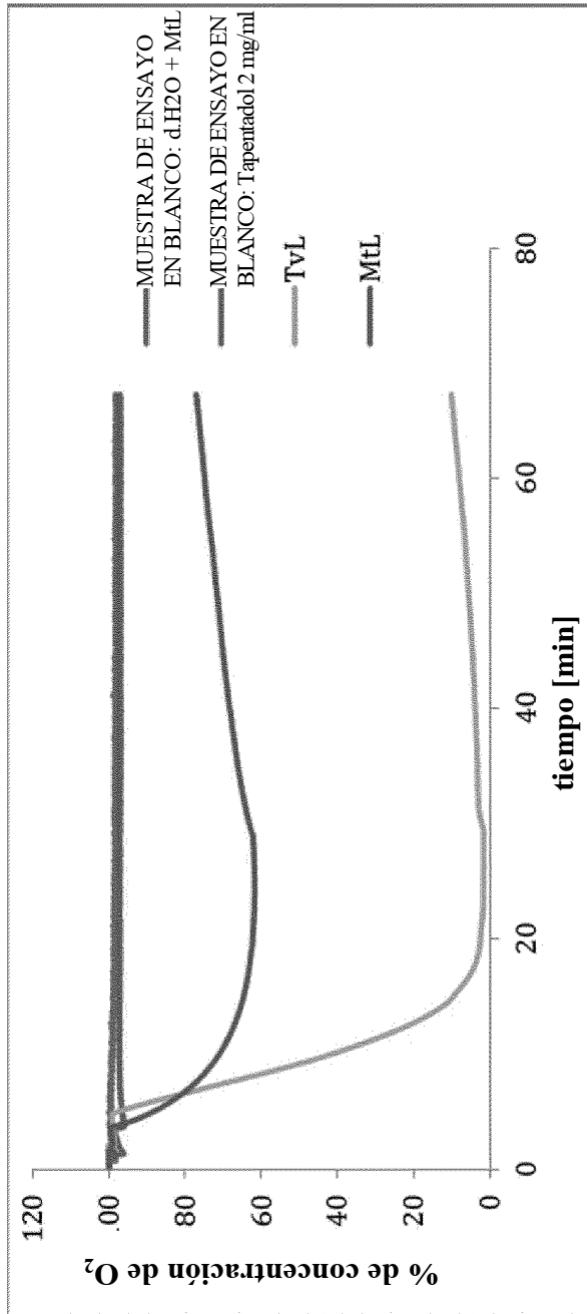
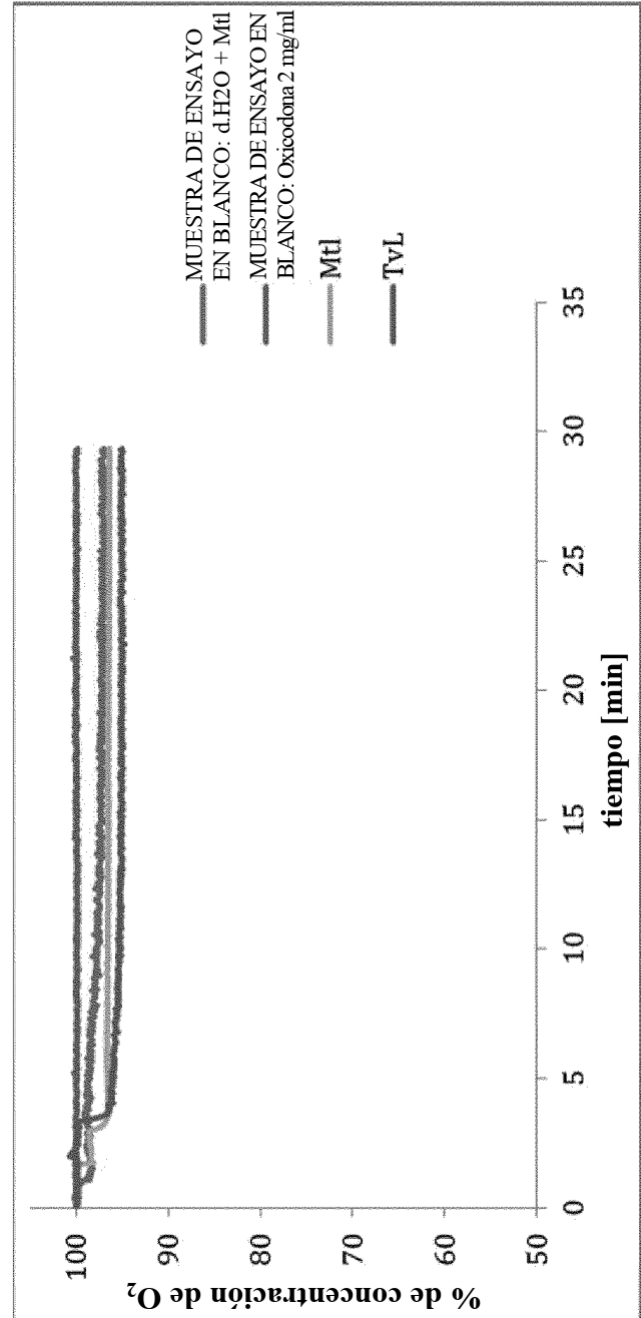


Fig. 5



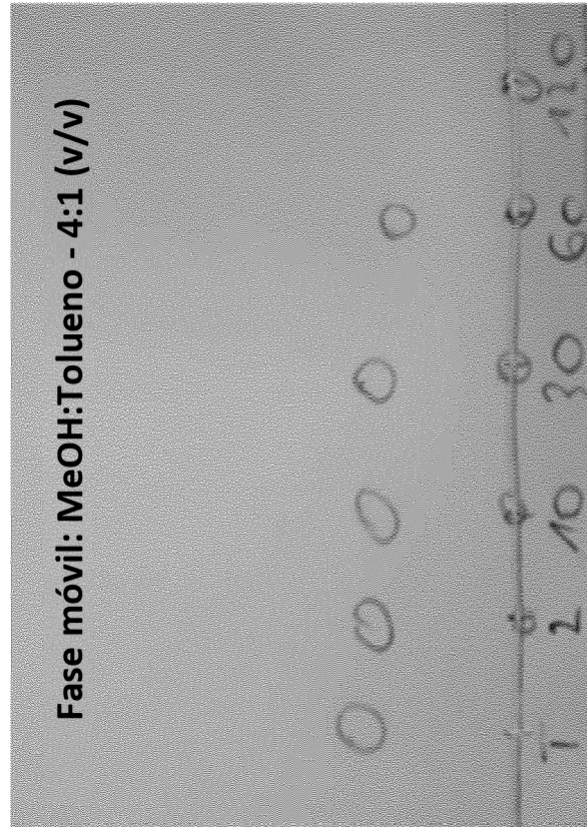


Fig. 7

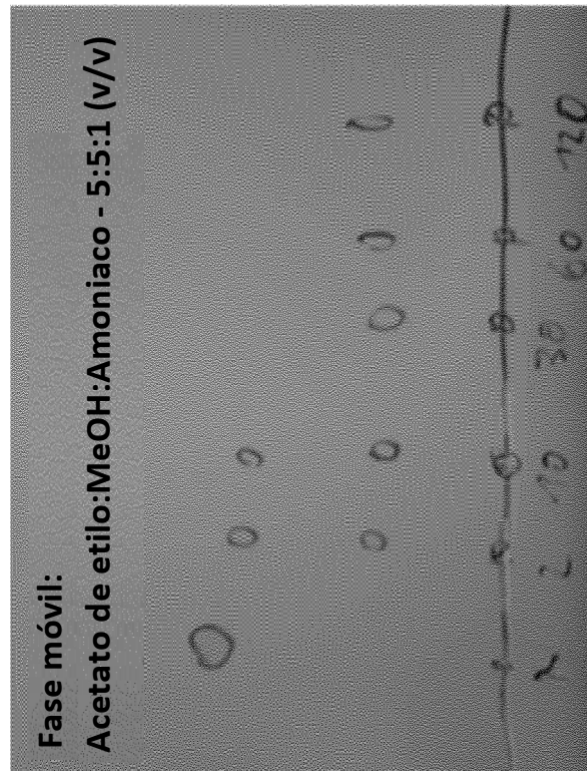
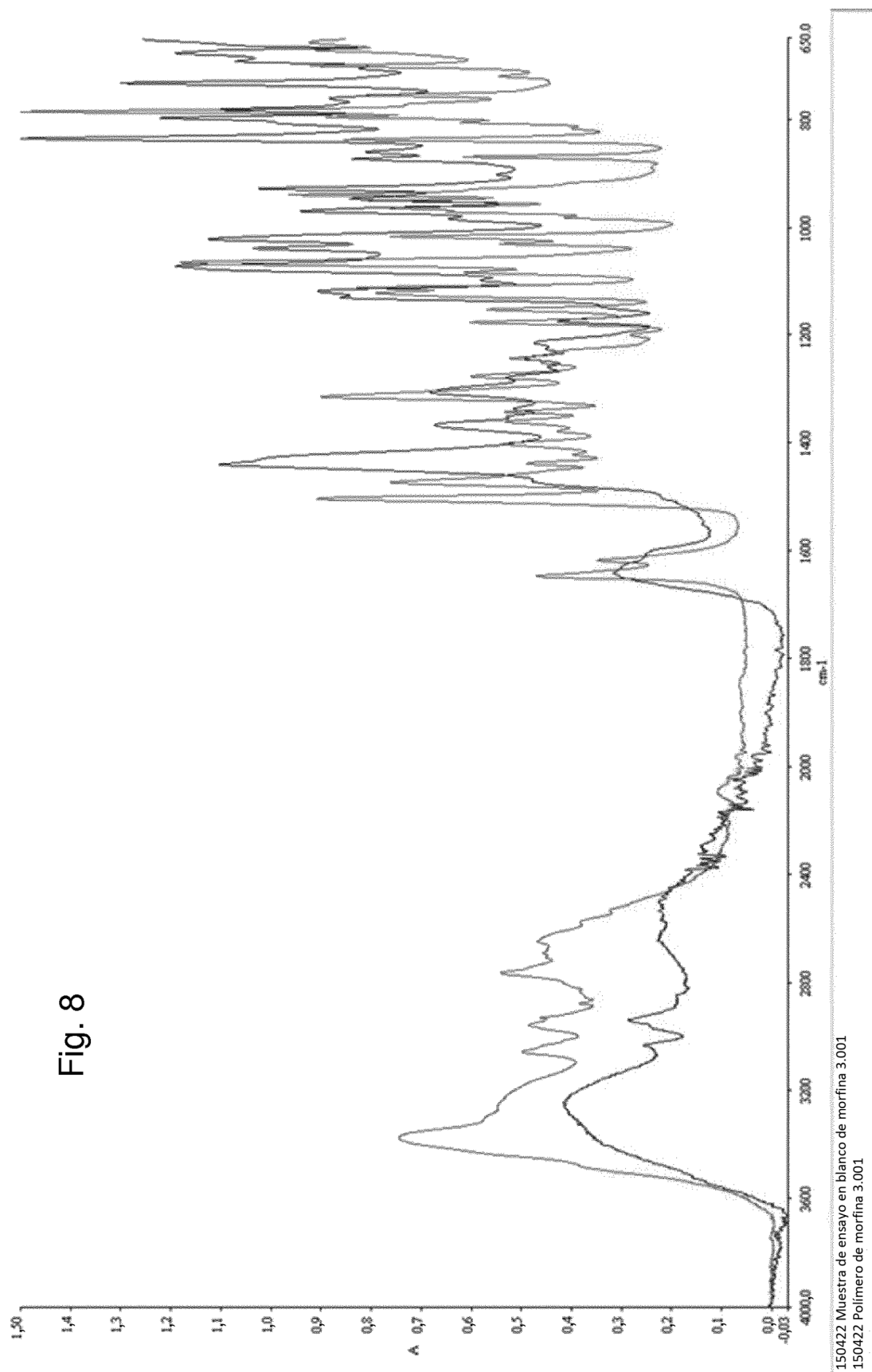


Fig. 6



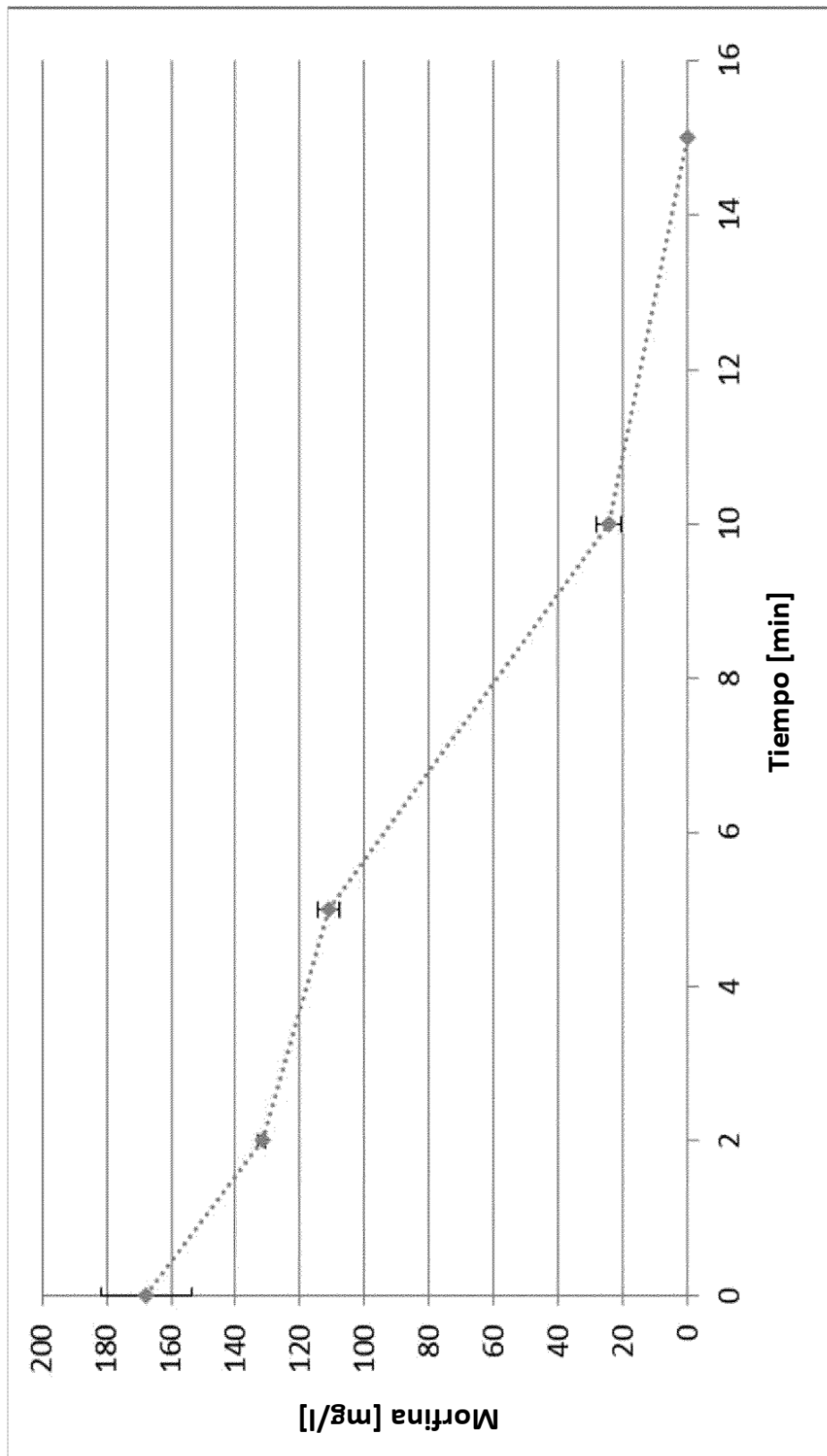
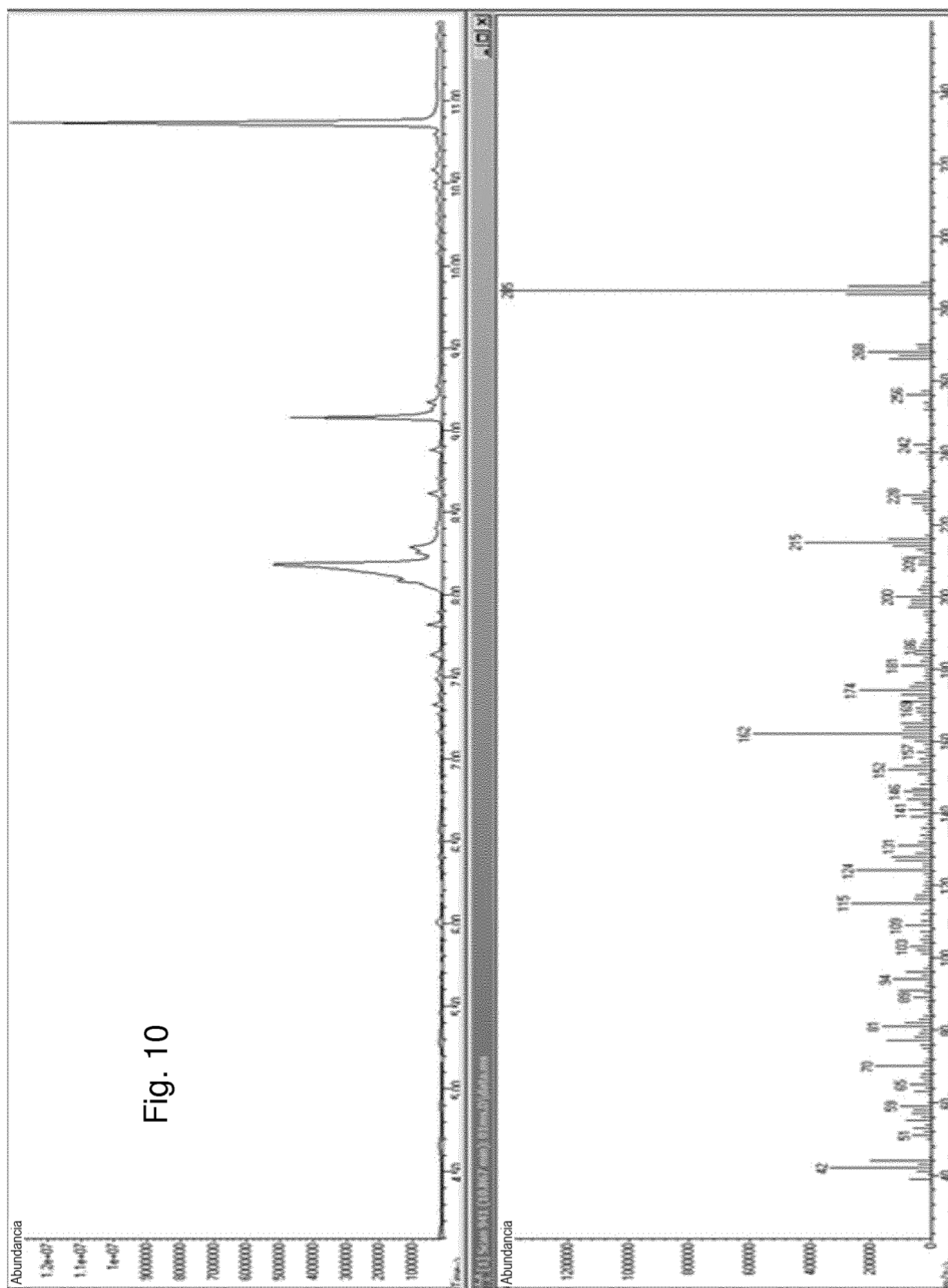


Fig. 9



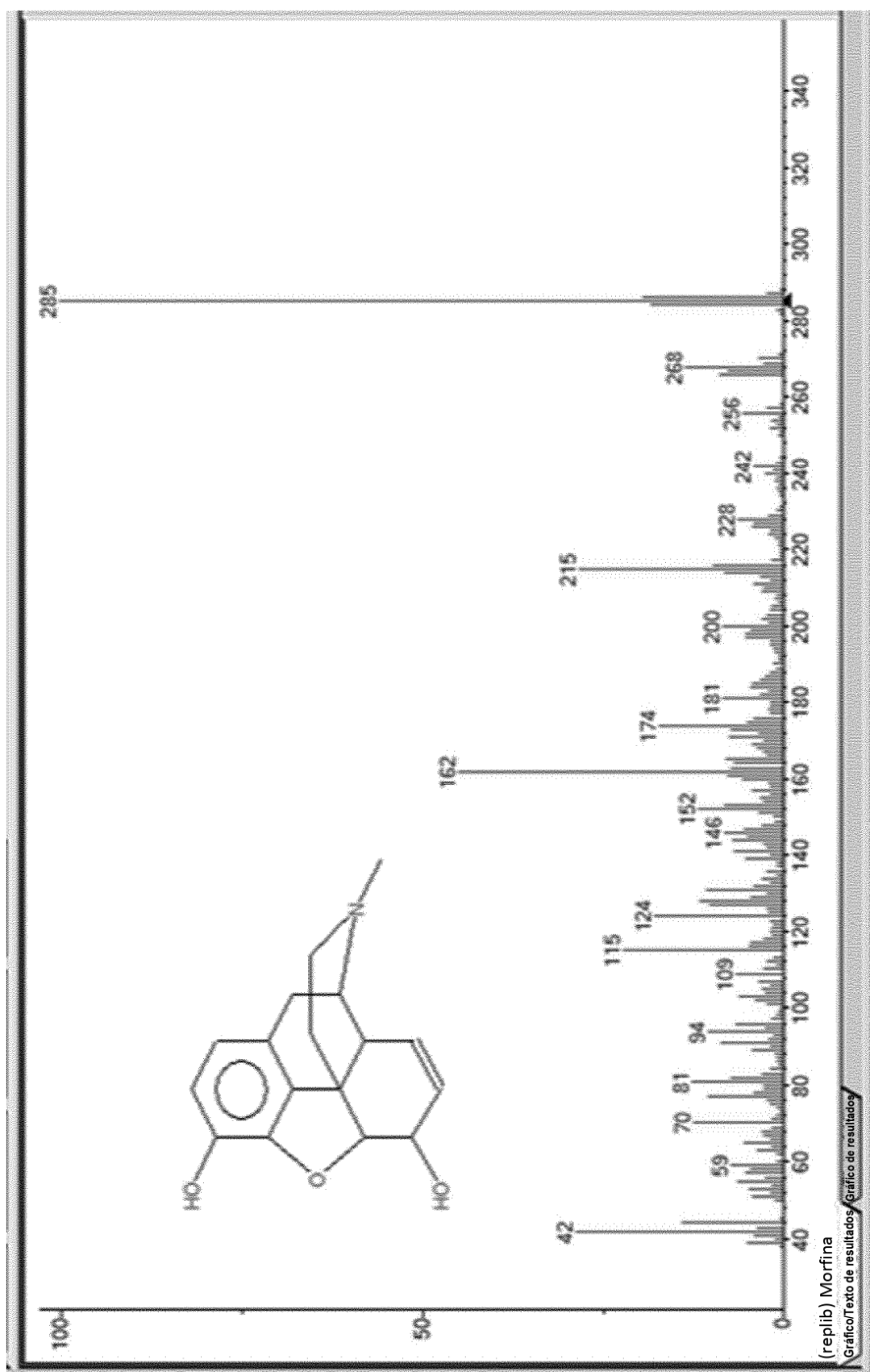


Fig. 11

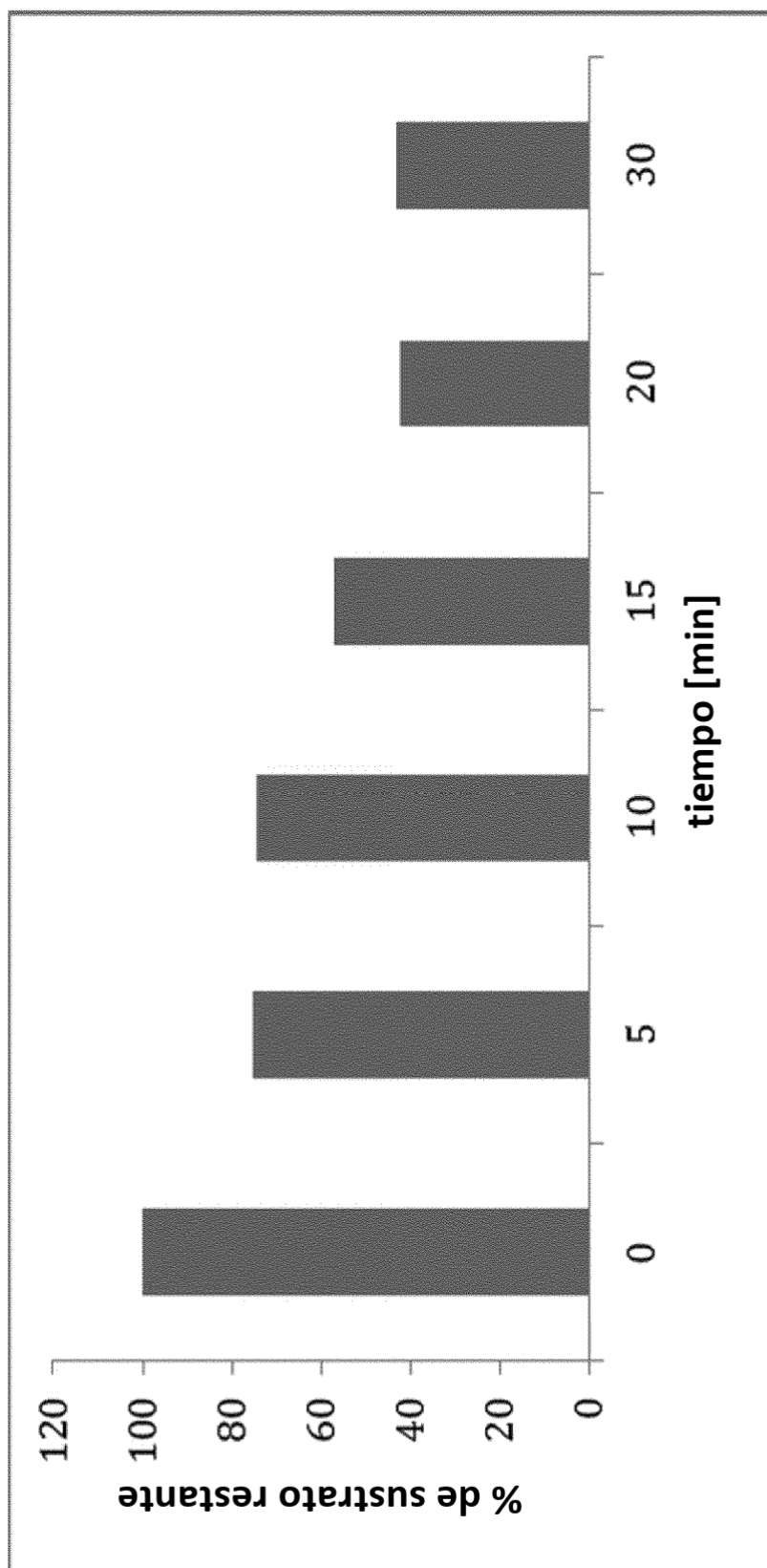


Fig. 12



Fig. 13

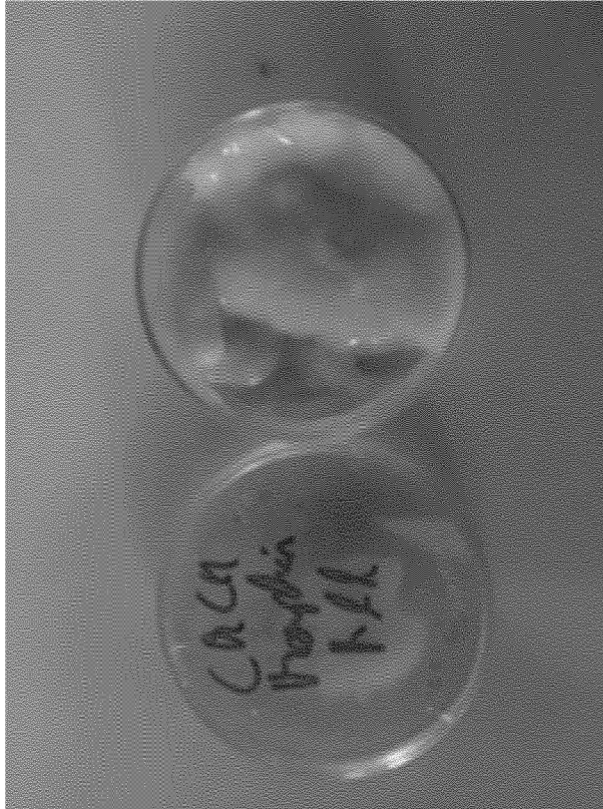


Fig. 14

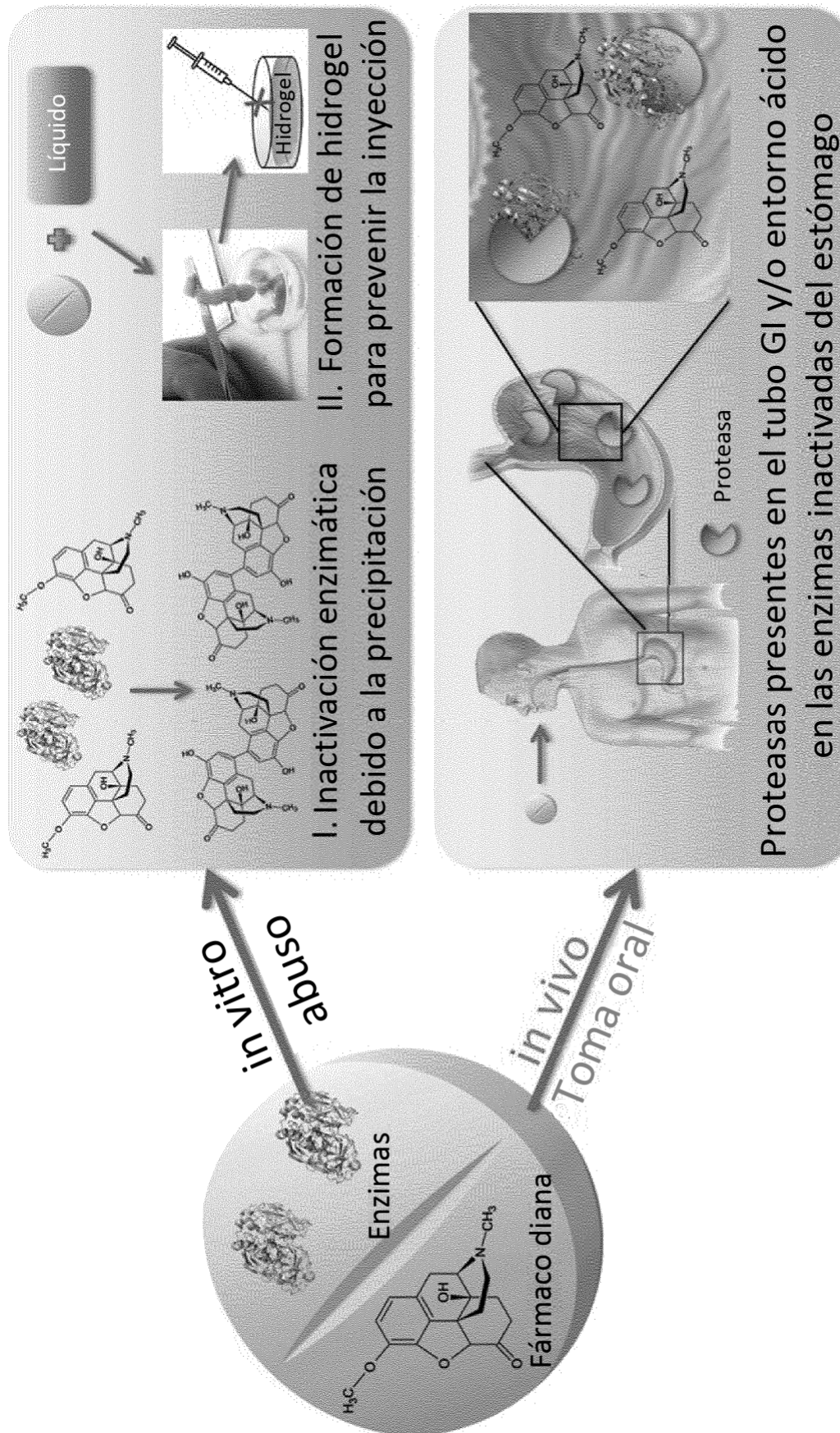


Fig. 15

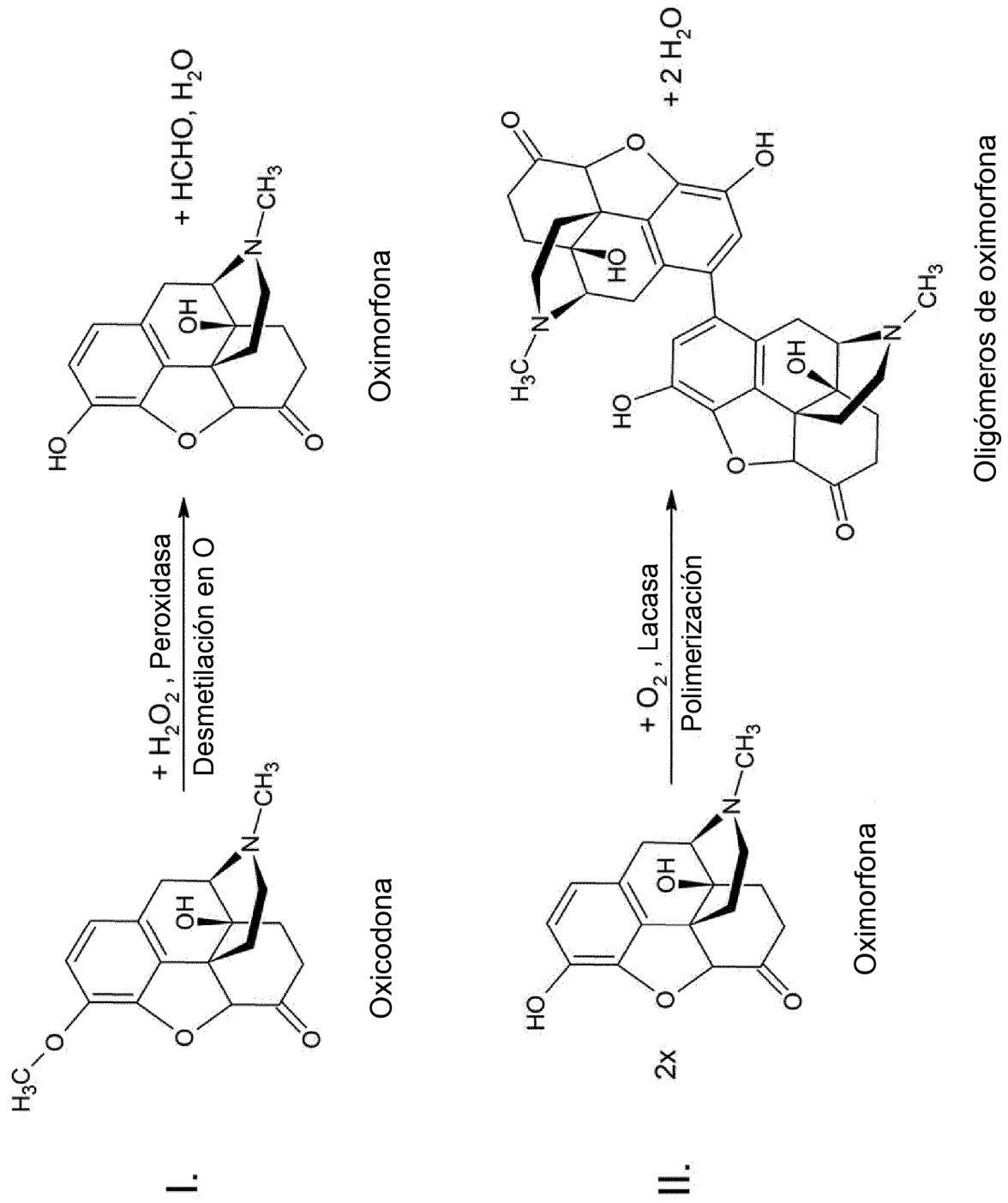


Fig. 16

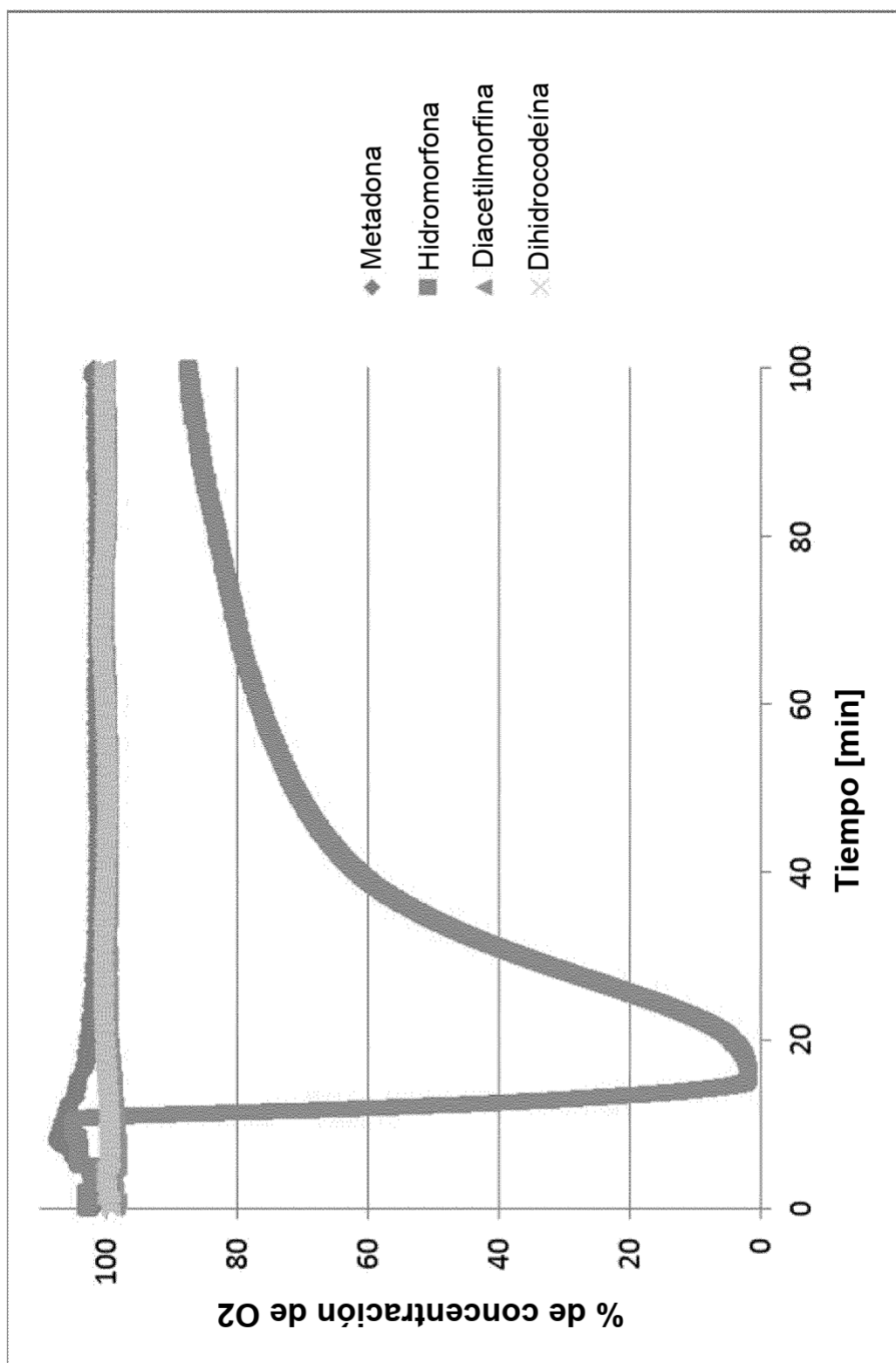


Fig. 17

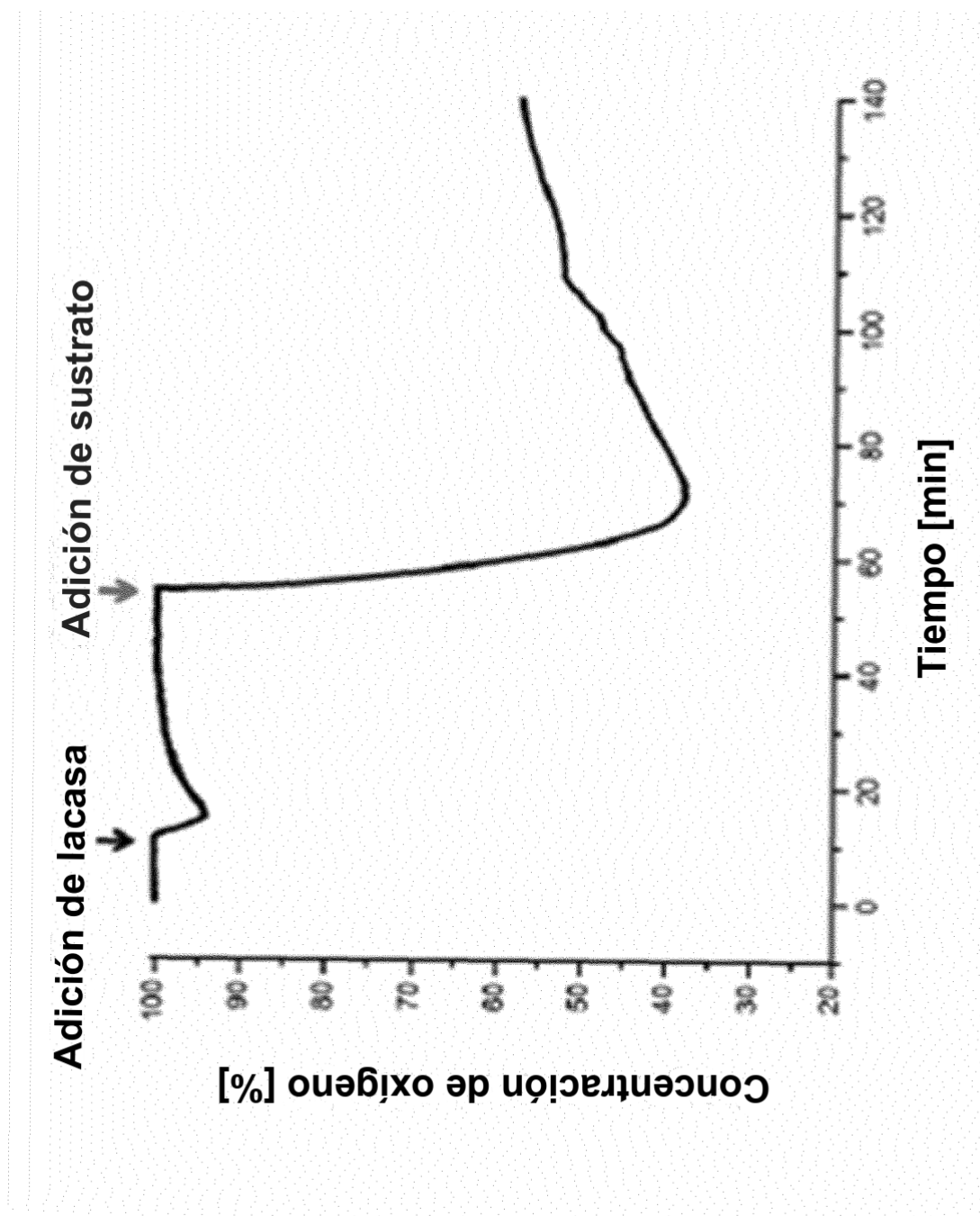


Fig. 18

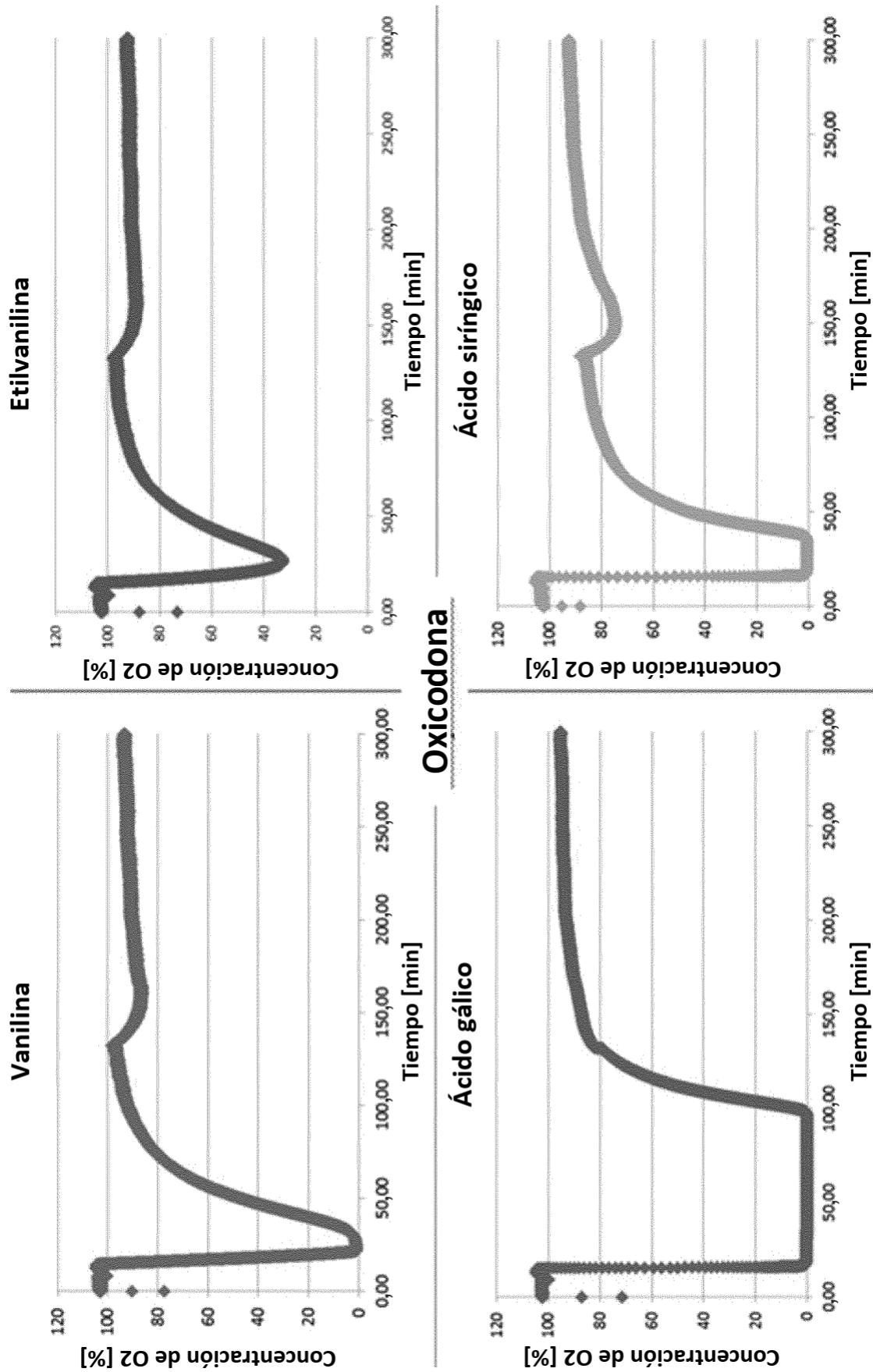


Fig. 19

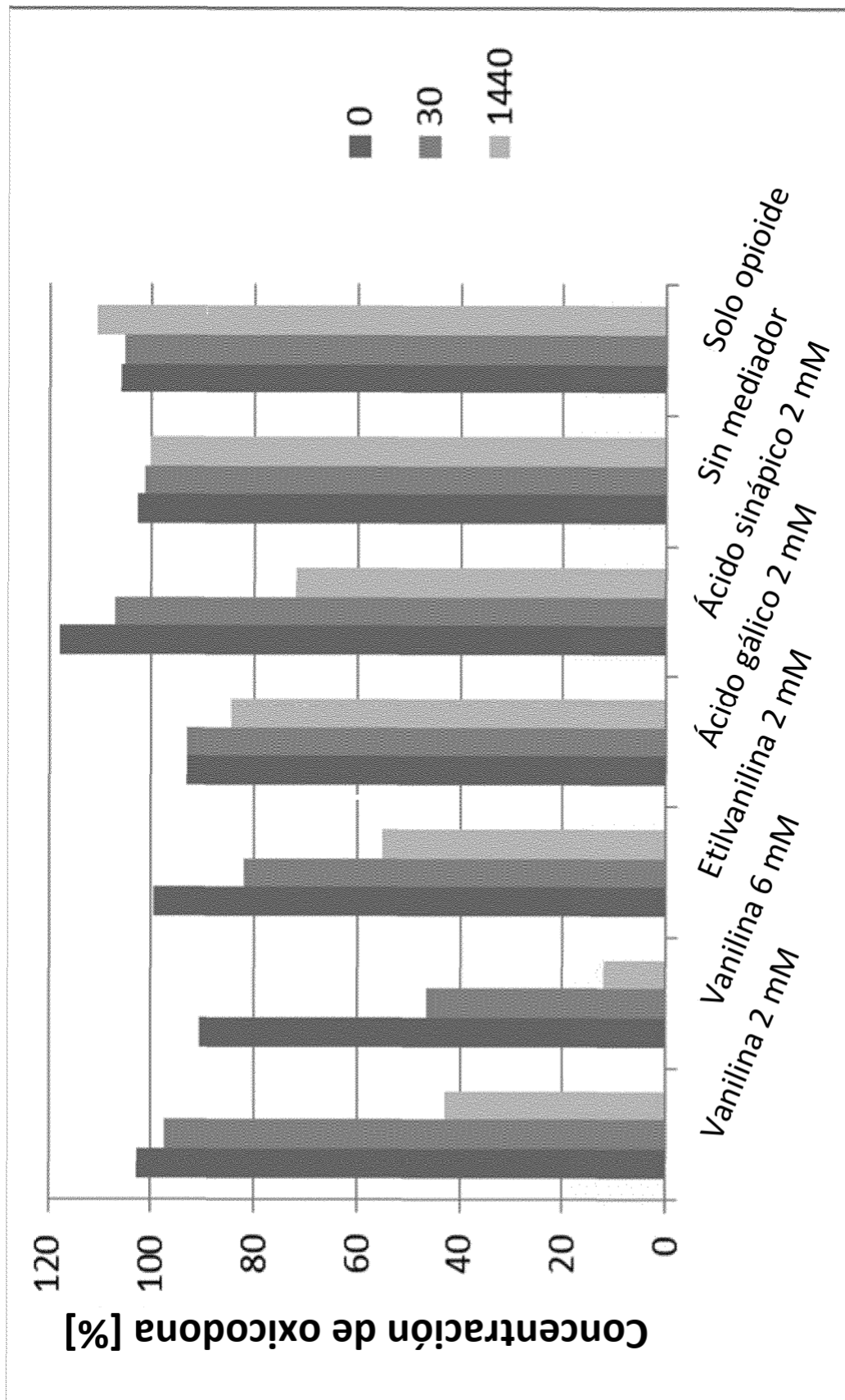


Fig. 20

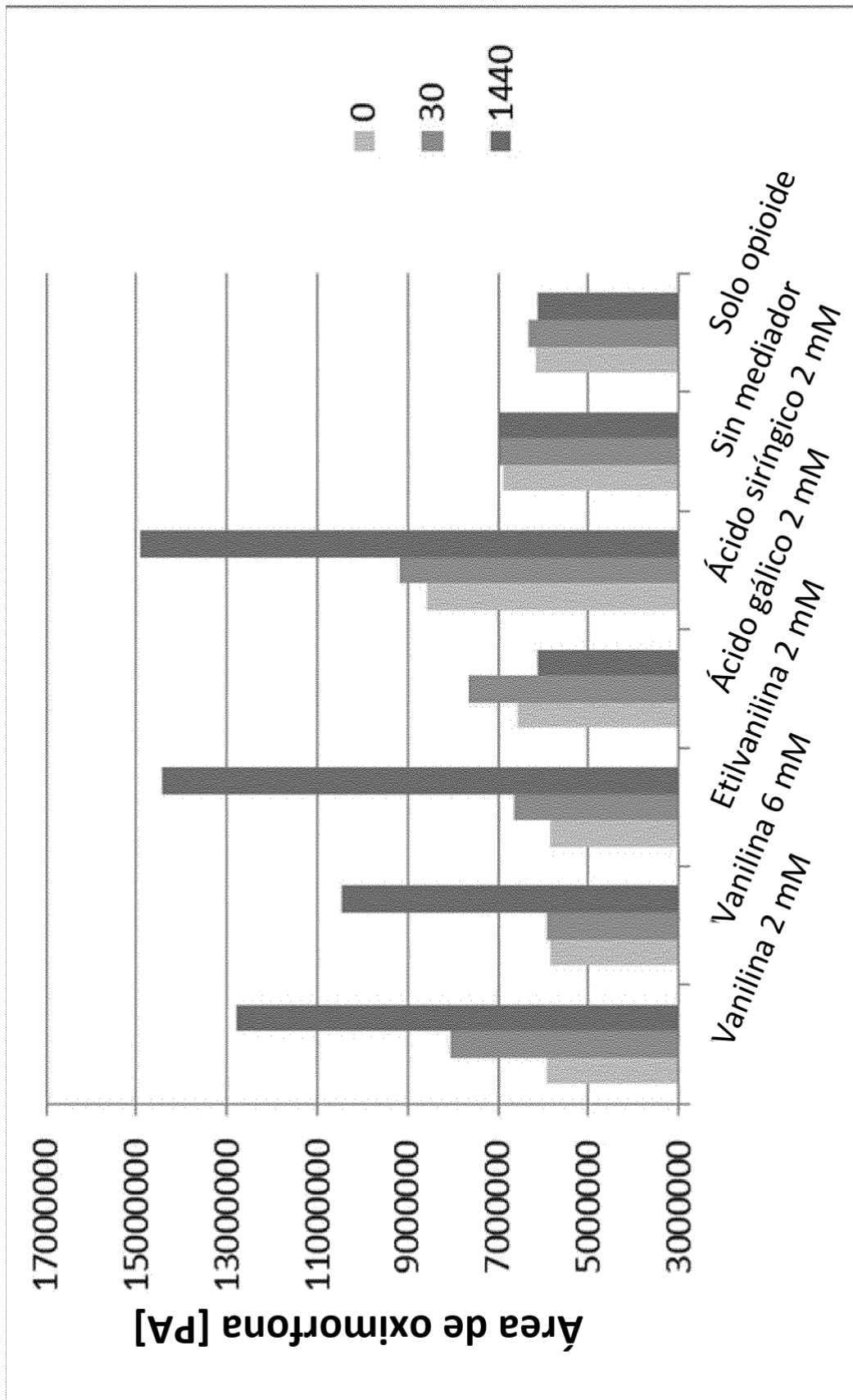


Fig. 21

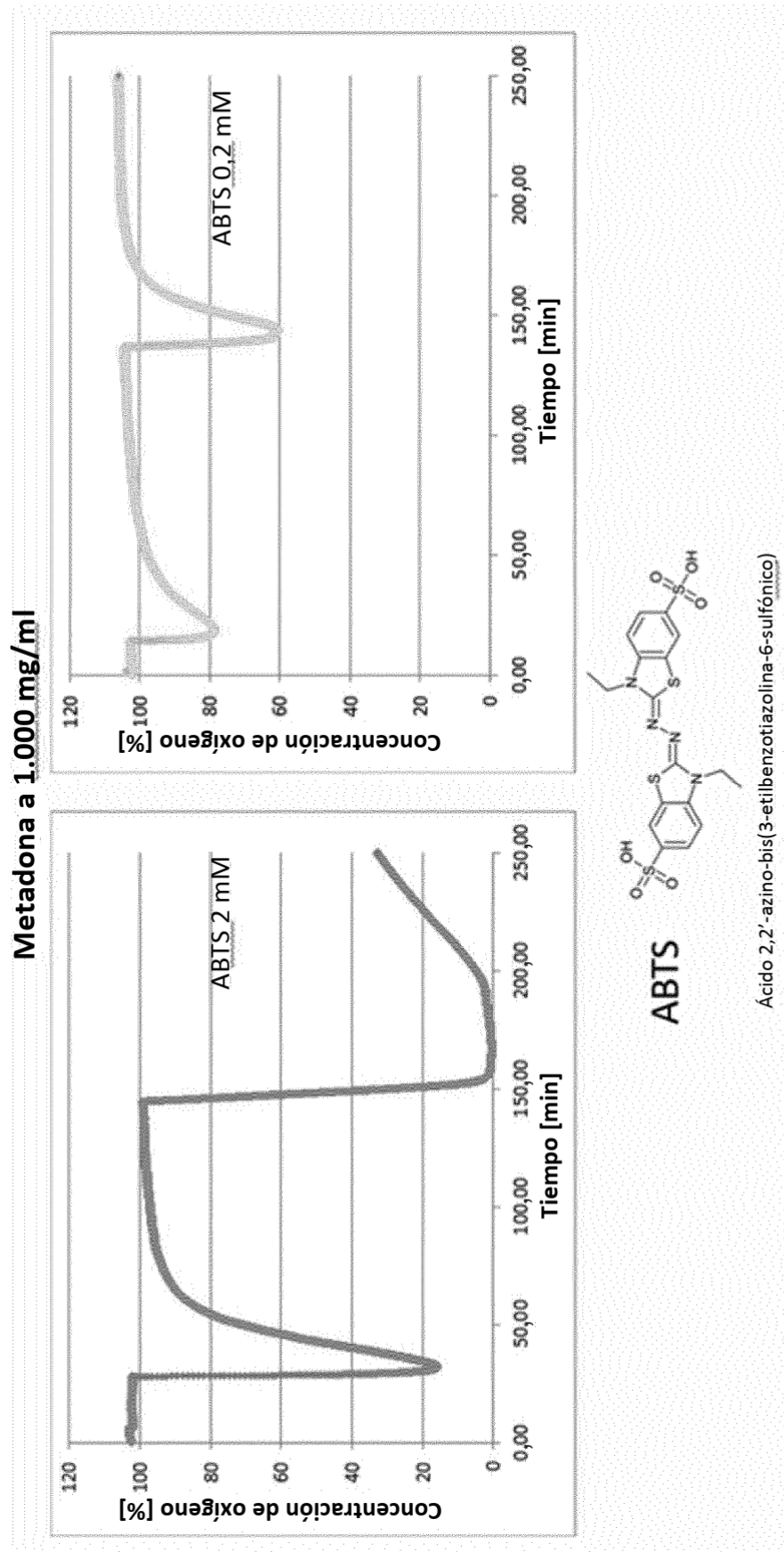


Fig. 22

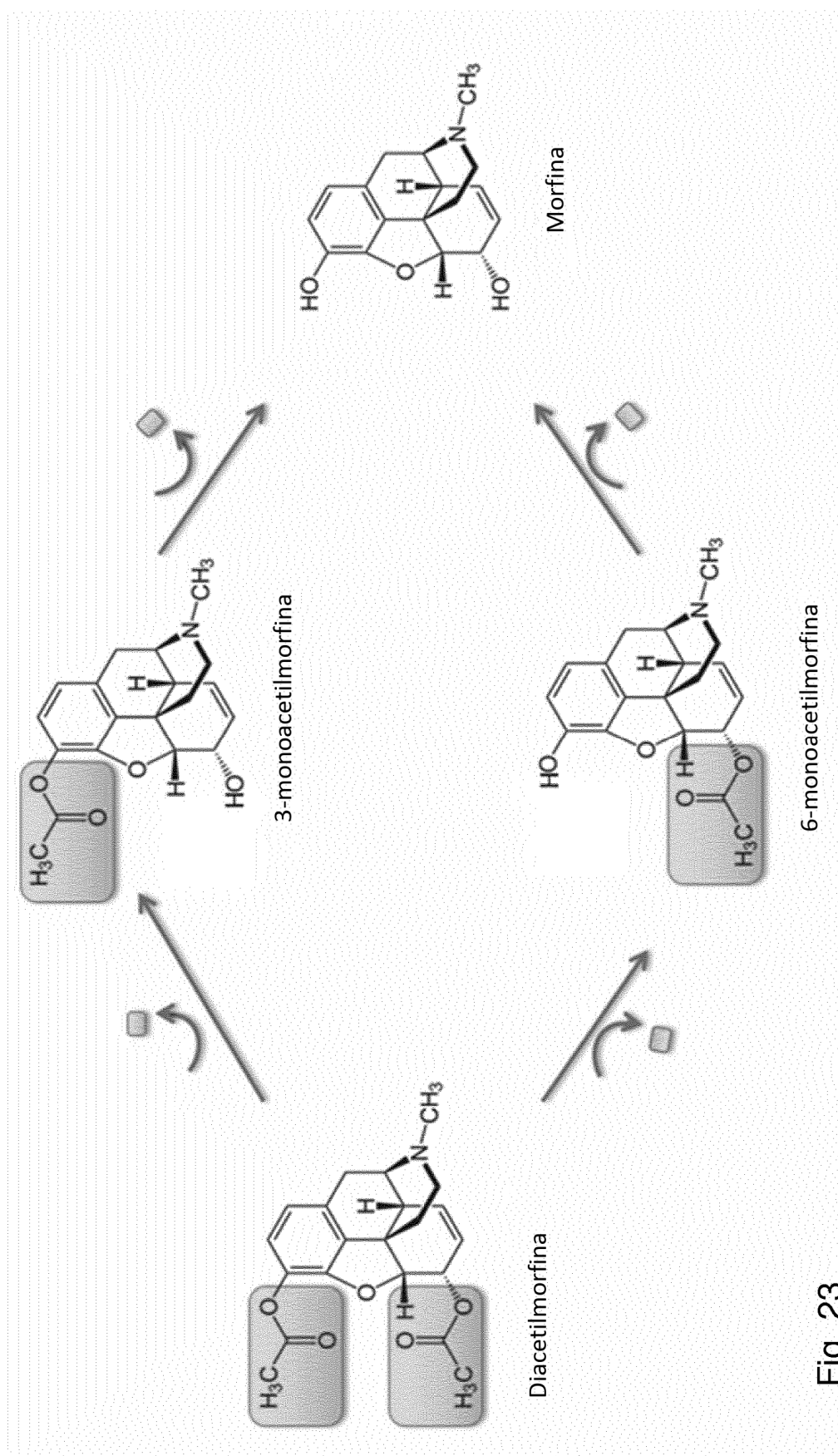


Fig. 23

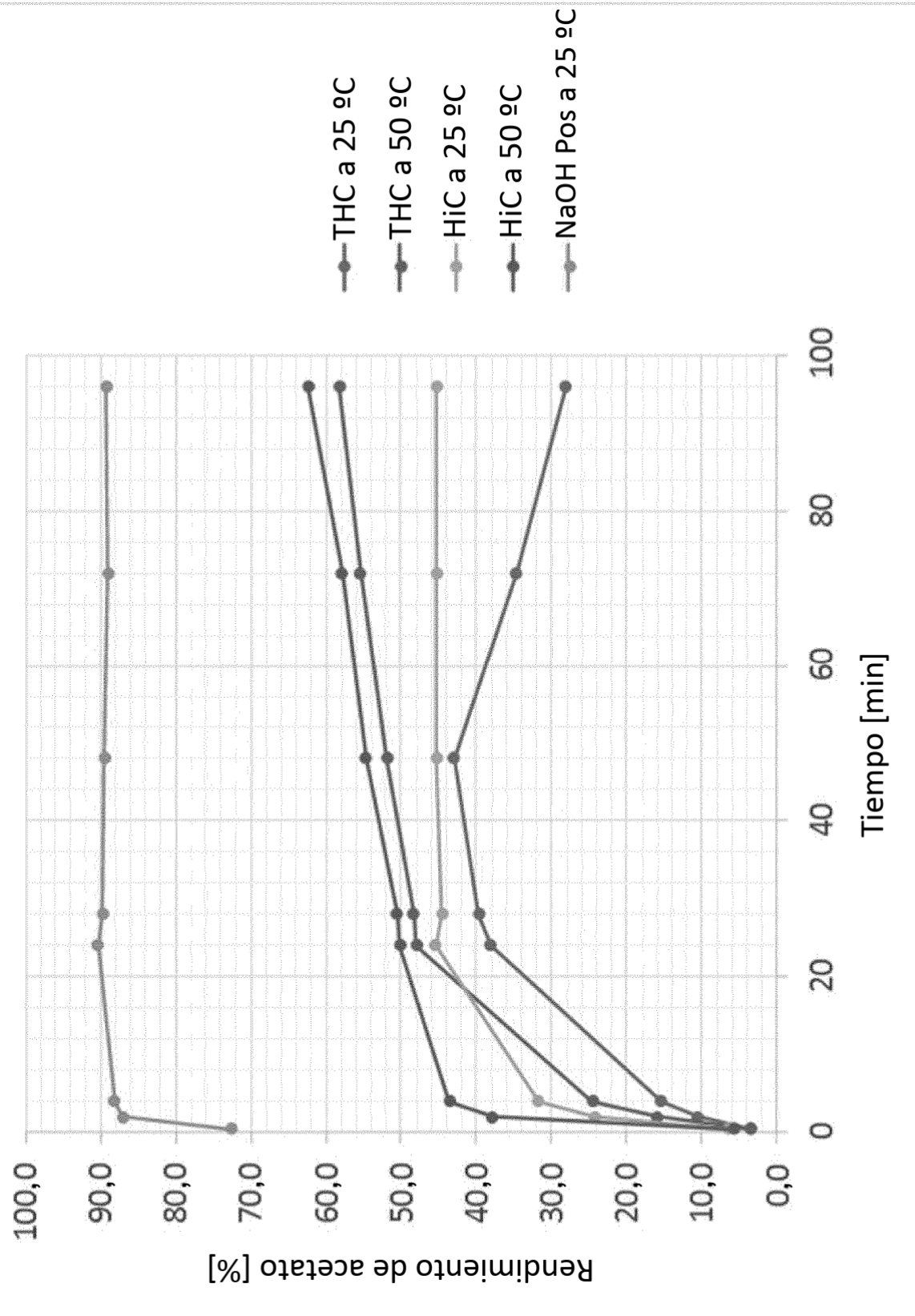


Fig. 24

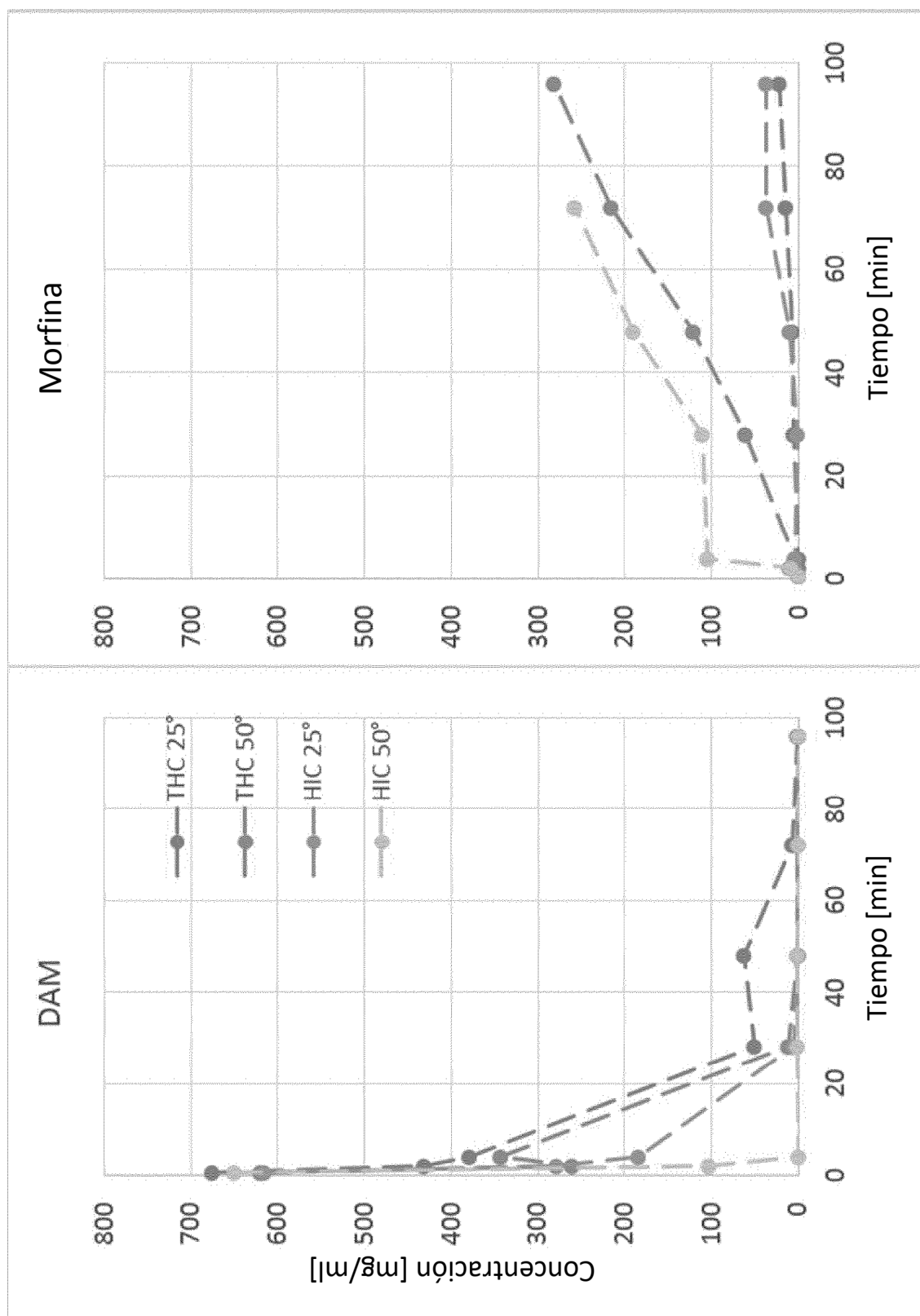


Fig. 25

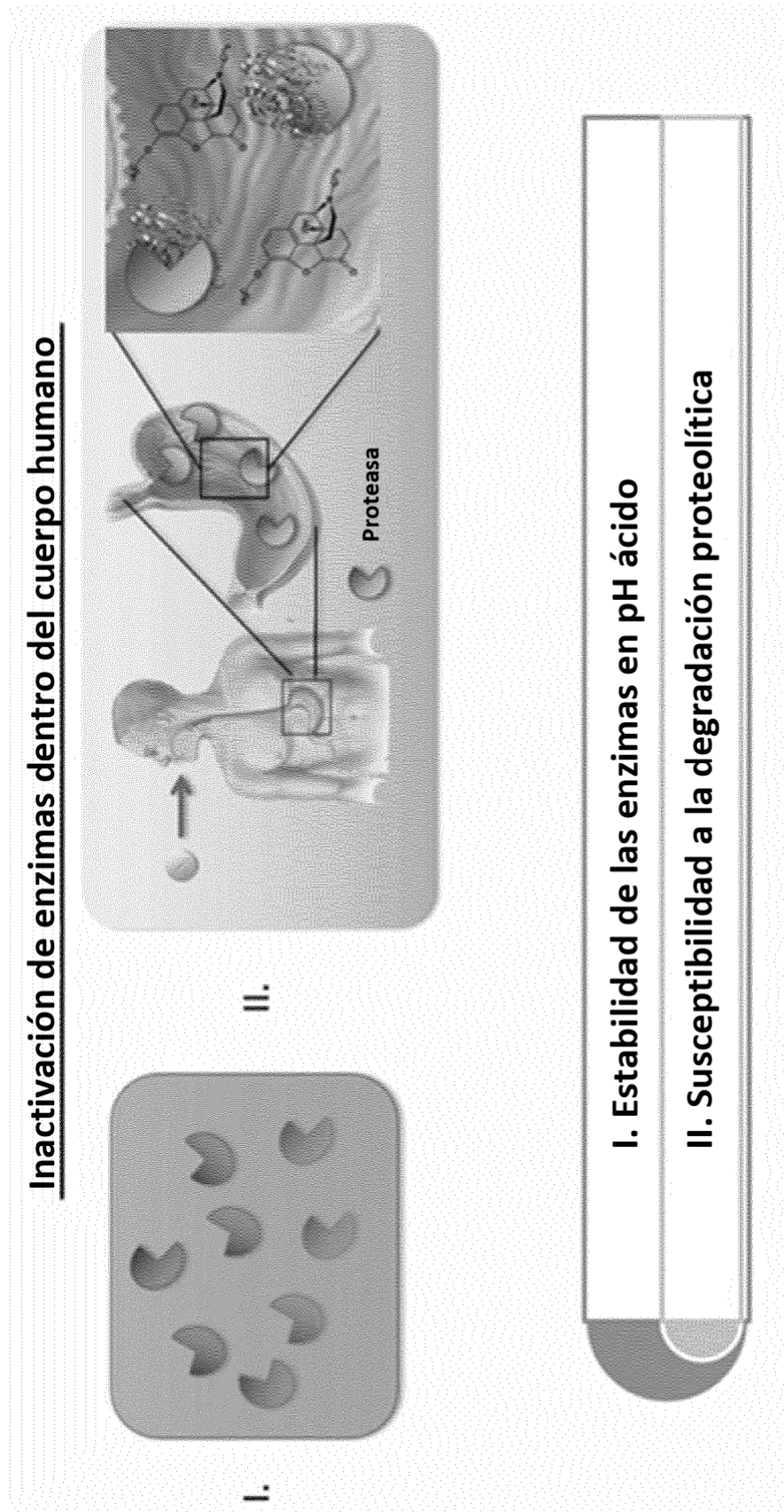


Fig. 26

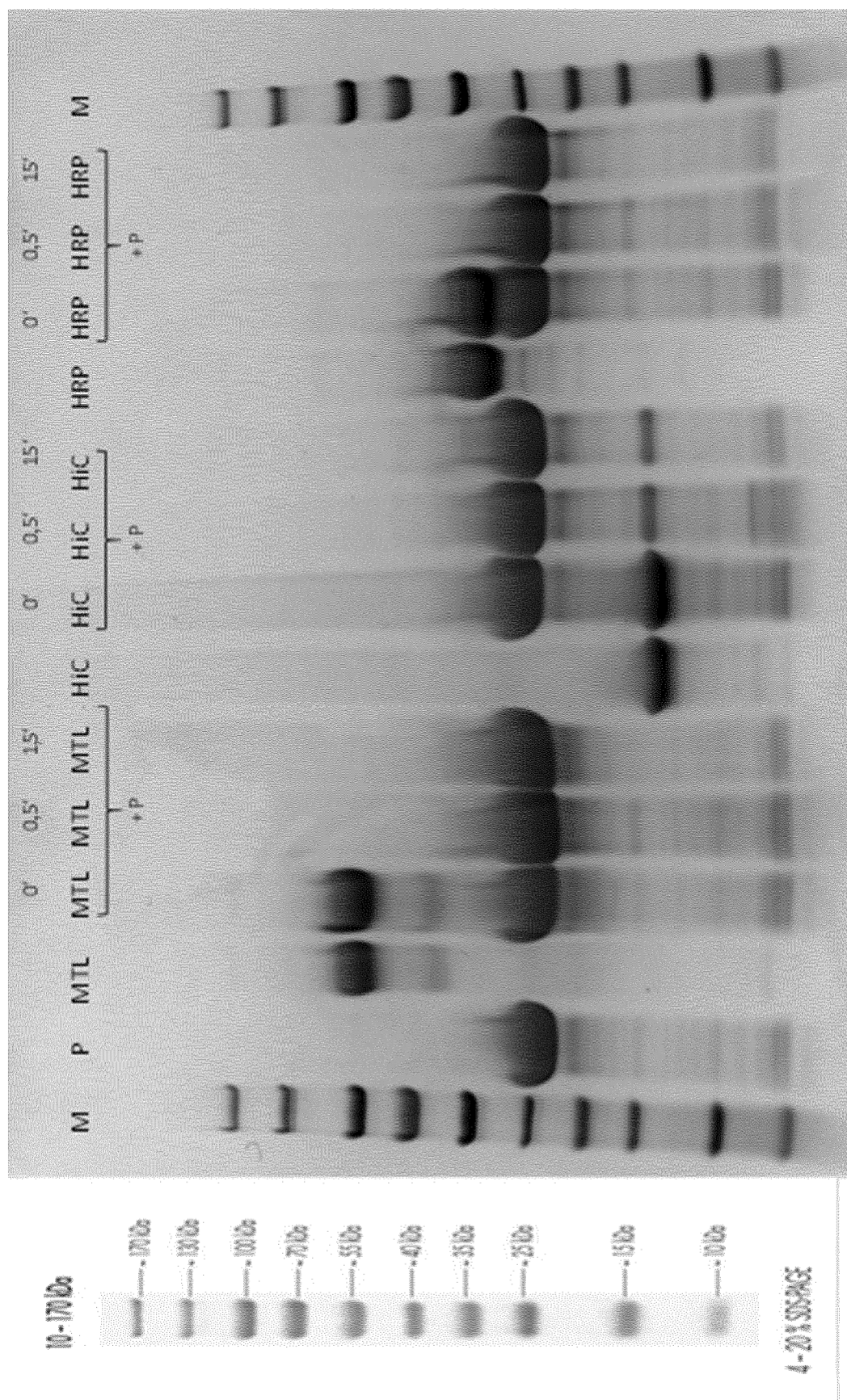


Fig. 27

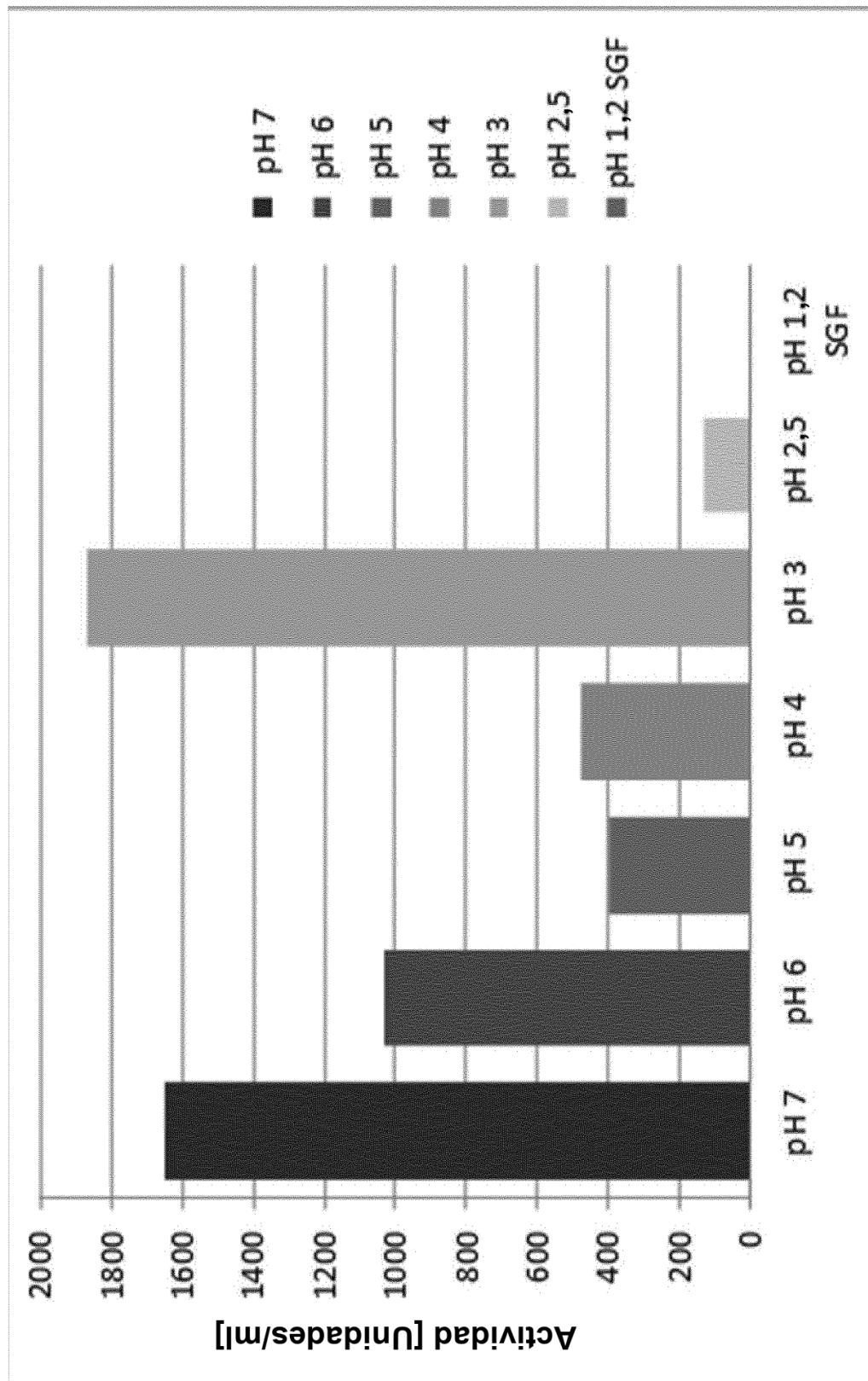


Fig. 28

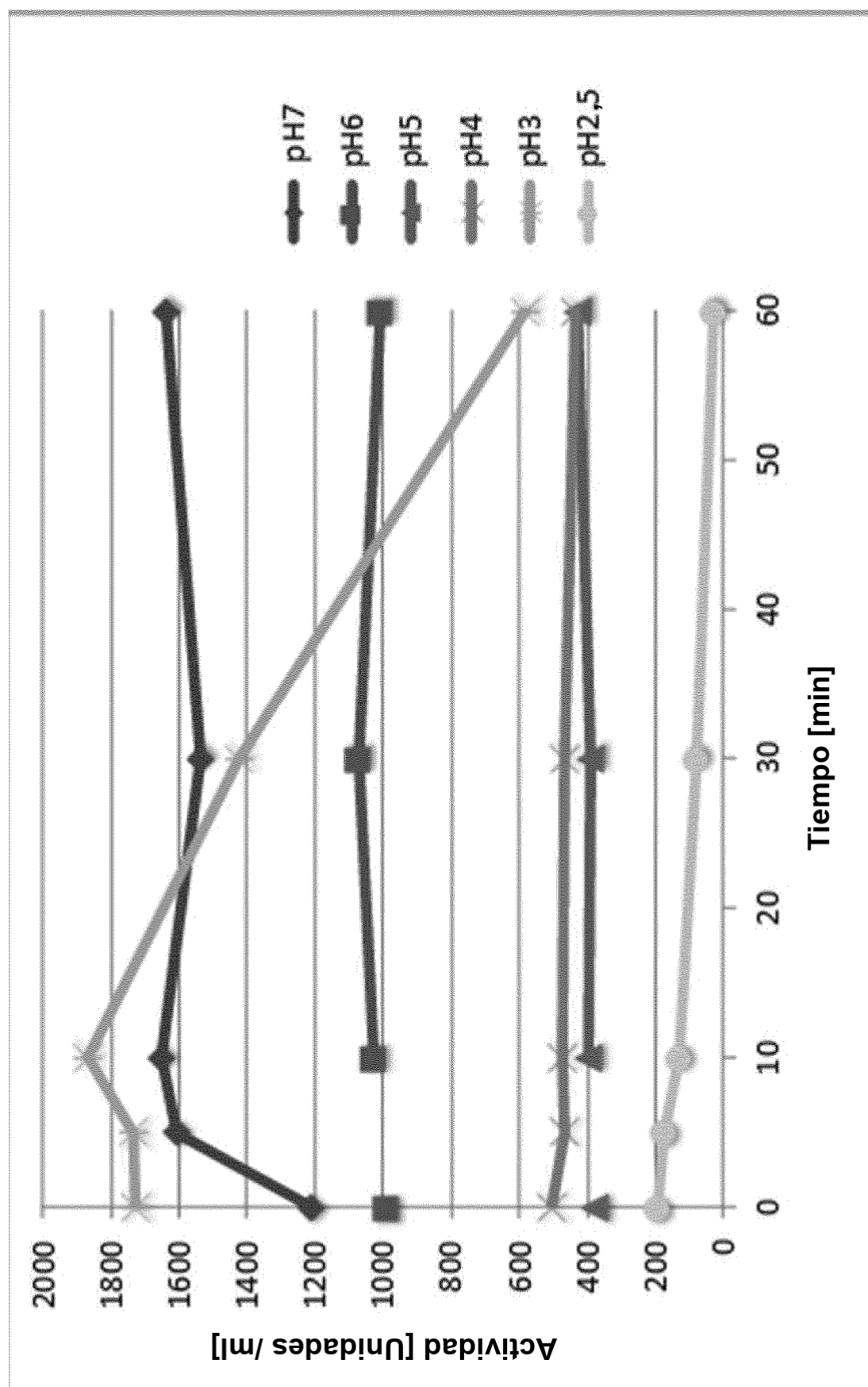


Fig. 29

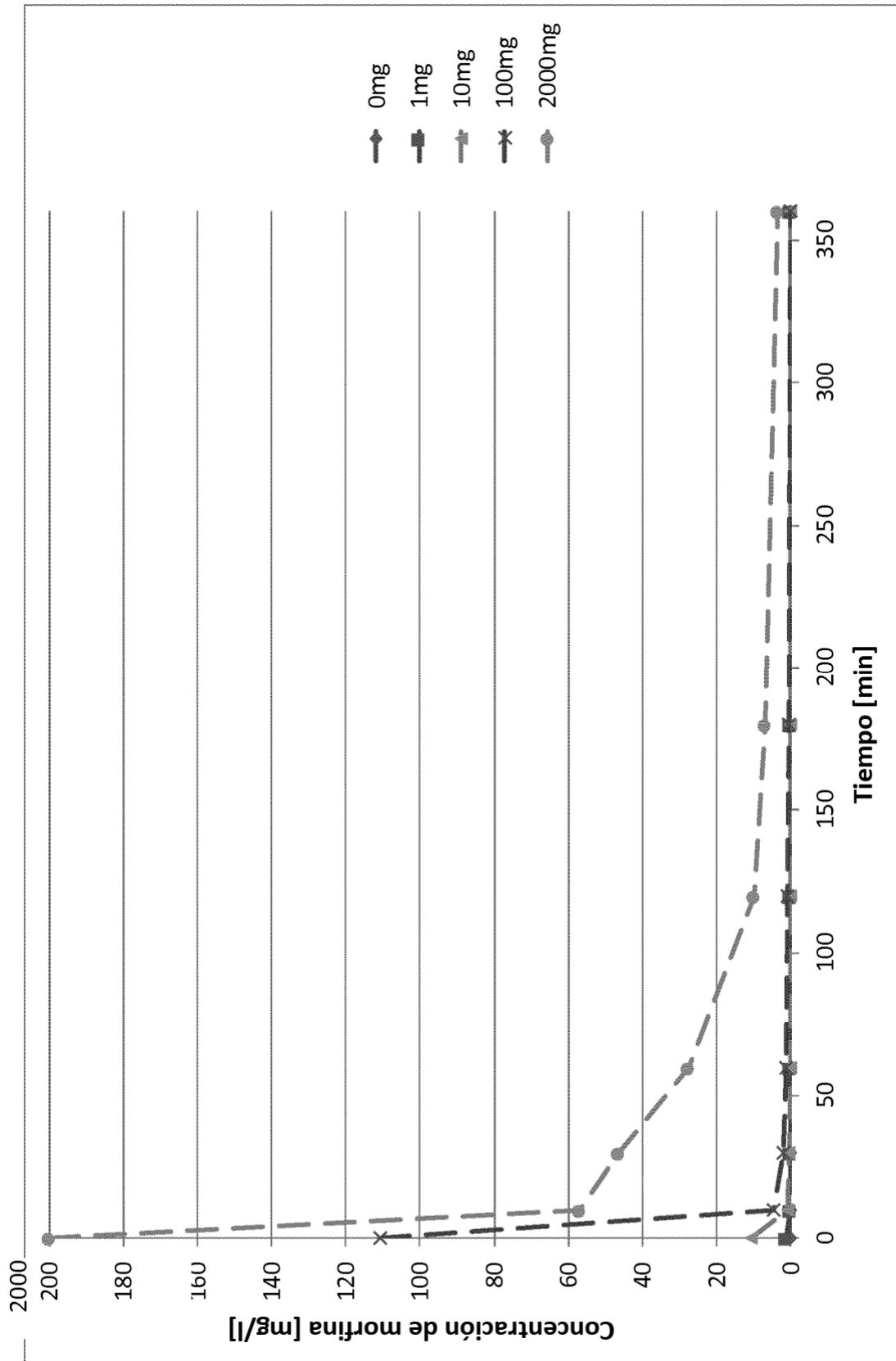


Fig. 30: Eliminación de diversas concentraciones de morfina con 10 U/ml de lacasa

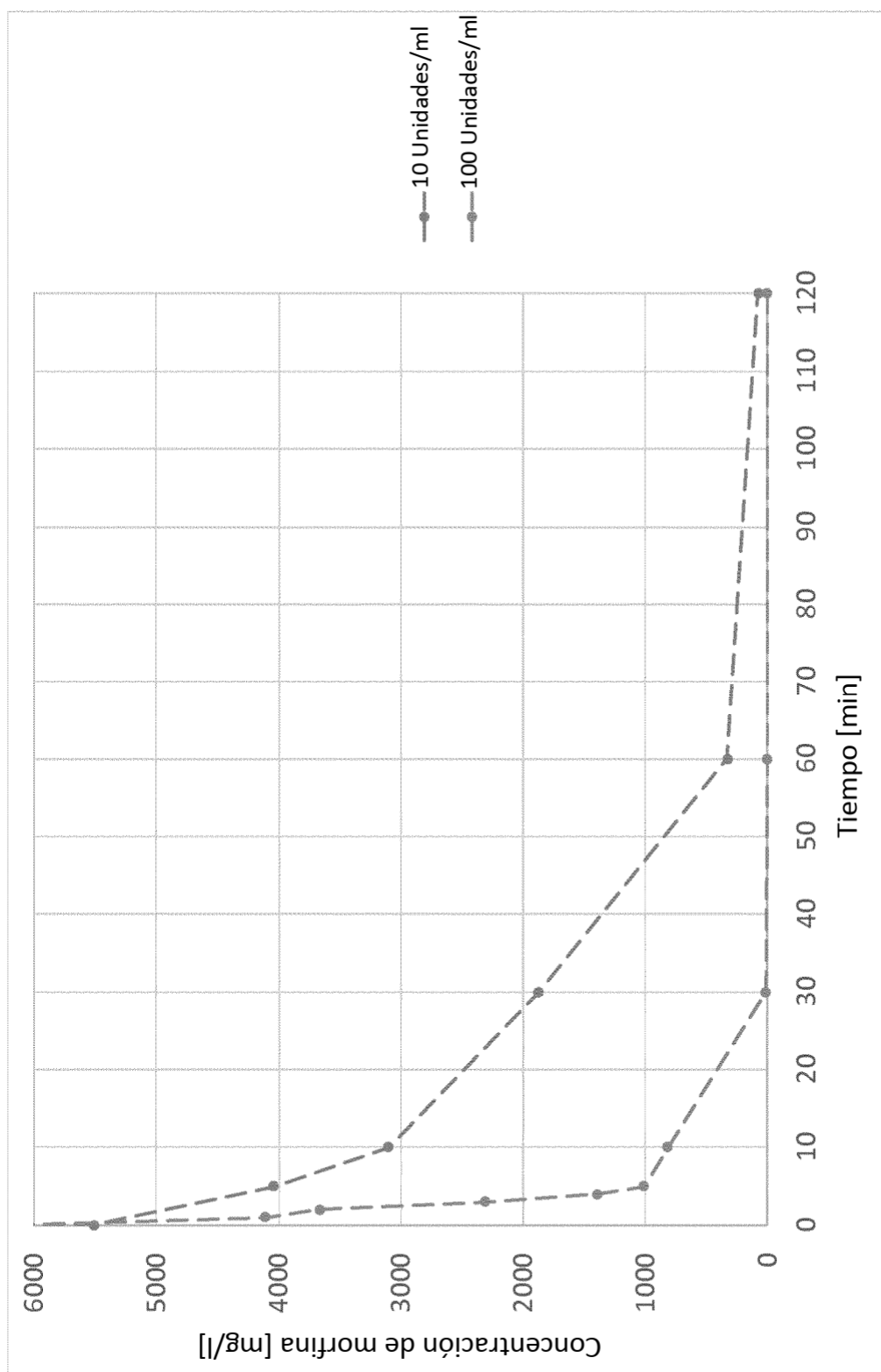


Fig. 31

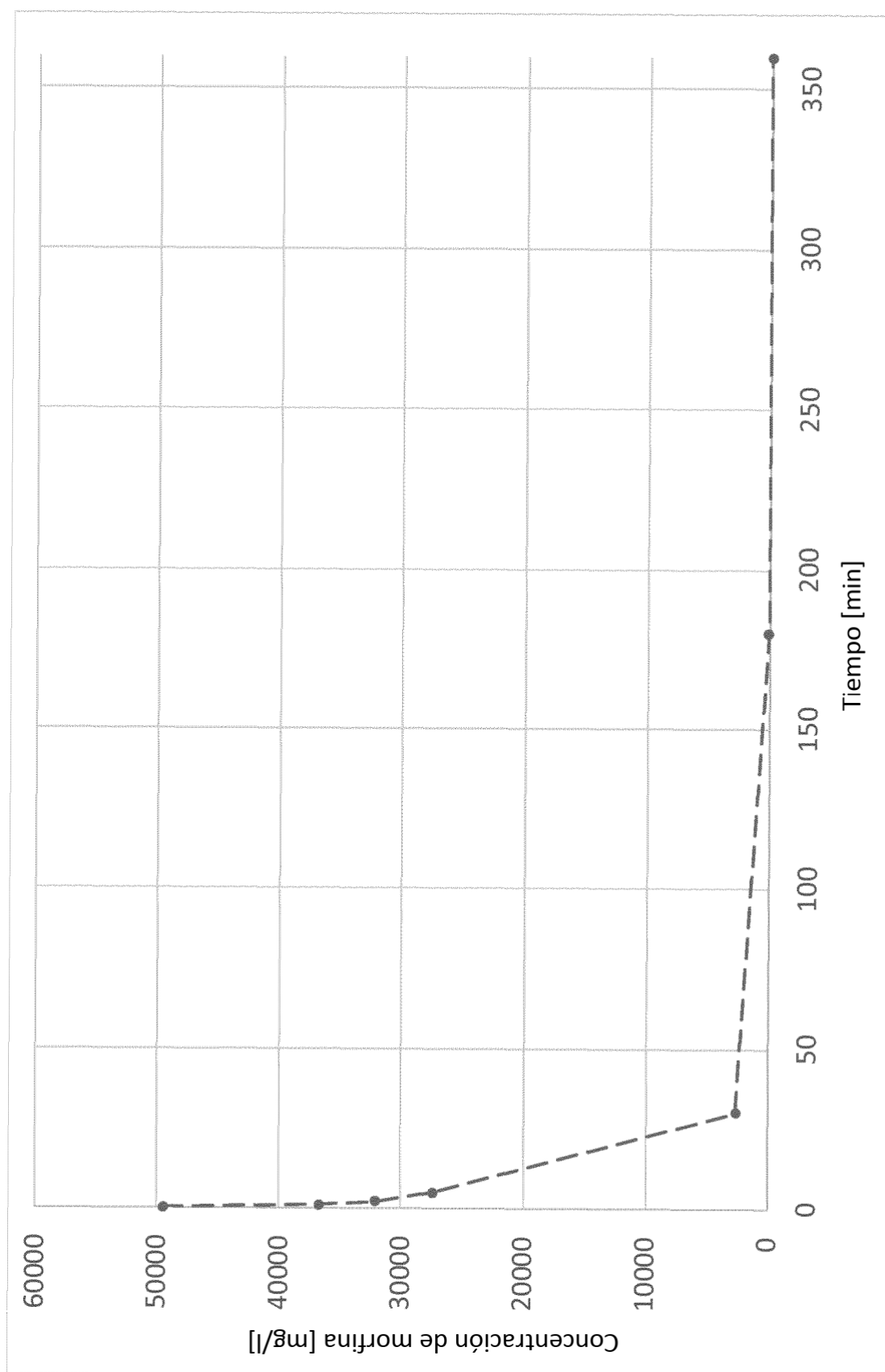


Fig. 32