

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 433**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 47/50 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/IB2015/057694**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16055961**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15798554 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3250181**

54 Título: **Formulación farmacéutica basada en minoxidil para uso tópico y kit de la misma**

30 Prioridad:

09.10.2014 IT MI20141770

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2021

73 Titular/es:

**FARMALABOR S.R.L. (100.0%)
Oberdan, 52
76012 Canosa Di Puglia (bt), IT**

72 Inventor/es:

**FONTANA, SERGIO;
LA FORGIA, FLAVIA;
LOPEDOTA, ANGELA ASSUNTA;
DENORA, NUNZIO;
CUTRIGNELLI, ANNALISA;
FRANCO, MASSIMO y
LAQUINTANA, VALENTINO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 813 433 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

Formulación farmacéutica basada en minoxidil para uso tópico y kit de la misma

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica basada en minoxidil para uso tópico (gel o disolución viscosa), al uso relativo para el tratamiento de la alopecia y a un kit para la preparación de la misma. El minoxidil (MXD) es un vasodilatador potente que se prescribe para uso tópico en el tratamiento de la alopecia de diferentes orígenes.

Este ingrediente activo se usa de manera generalizada, tanto en hombres como en mujeres, ya que es capaz de invertir la miniaturización progresiva del folículo piloso asociada a la alopecia androgénica actuando directamente sobre la proliferación y la apoptosis de las papilas dérmicas. En particular, es capaz de actuar sobre los vasos sanguíneos del cuero cabelludo favoreciendo una mayor oxigenación y suministro de nutrientes al folículo piloso (véanse los documentos US 4.596.812; US 4.139.619).

Durante alrededor de veinte años, los dermatólogos han prescrito minoxidil para esta indicación terapéutica en forma de una preparación industrial o, con frecuencia, galénica.

Sin embargo, el minoxidil tiene múltiples mecanismos de acción responsables de los efectos terapéuticos tópicos y de los efectos secundarios tópicos/sistémicos. De hecho, el principal objetivo de esta molécula son los canales de K⁺ dependientes de ATP de los vasos sanguíneos cardiacos y musculares constituidos por las subunidades SUR2A/B y Kir6.2. La activación de estos canales induce una vasodilatación local de la microcirculación cutánea, con efectos sobre el tropismo capilar y la proliferación celular.

Una vasodilatación intensa mediada por minoxidil puede provocar cefalea aguda observada durante el uso sistémico y el uso tópico en el tratamiento prolongado con una duración >20 días o en caso de sobredosis.

Las formulaciones basadas en minoxidil disponibles en disolución hidroalcohólica para uso tópico se caracterizan por una mala manipulación con problemas en la aplicación, y los efectos irritantes y proinflamatorios de los excipientes.

Las formulaciones tópicas basadas en minoxidil ilustradas en la Farmacopea (Brusa P. et al., Prontuario pratico di galenica) o disponibles comercialmente (Rogaine®/Regaine®) son generalmente disoluciones que requieren el uso de concentraciones de ingrediente activo que oscilan entre un 0,5% y 5% p/p. Sin embargo, el minoxidil tiene una solubilidad baja en agua (alrededor de 2,5 mg/ml), y por lo tanto las formulaciones existentes en el mercado, normalmente, contienen un porcentaje elevado de codisolventes tales como etanol y propilen glicol.

Por ejemplo, para conseguir la solubilización de un 5% p/p de minoxidil, la disolución o loción Rogaine® extra-fuerte para el cuero cabelludo (Brusa P. et al.) debería contener entre un 30 y 48% de etanol y entre un 35 y 50% de propilen glicol. Sin embargo, tales disolventes pueden provocar diferentes efectos secundarios, tales como irritación, ardor, picor, rubor y dermatitis alérgica de contacto (Messenger AG et al., 2004; Tata S. et al., 1994; Tata S. et al., 1995; Edward S. et al., 2002). Además, al evaporarse fácilmente el etanol tras la aplicación puede quedar un residuo oleoso en el cuero cabelludo debido a la presencia de propilen glicol, y puede provocar la precipitación de cristales de minoxidil, lo que impide que se absorban en la piel, por lo que se reduce su biodisponibilidad (Balakrishnan P. et al., 2002).

La solicitud de patente internacional WO95/25500 describe formulaciones que contienen minoxidil y ciclodextrinas en presencia de alcohol (etanol), que es la estrategia fundamental (cosolvenencia) para la solubilización del ingrediente activo. Sin embargo, el etanol provoca sequedad en el área tratada, y debido a su evaporación rápida da como resultado una precipitación de minoxidil en el cuero cabelludo, que ya no está en disolución y por tanto no está disponible para la absorción en la capa córnea para alcanzar el folículo piloso, donde actuaría.

En la solicitud de patente US 2011/0112125 se mejoró la solubilidad de minoxidil gracias al uso de polímeros hidrófilos tales como carbómero, poli(alcohol vinílico), poli(ácidos acrílicos), ciclodextrinas naturales, etc., pero la preparación de la formulación implica el uso de H₂SO₄ 5 M. La solubilización de minoxidil alcanzada en las formulaciones según el documento US 2011/0112125 se debe a la transformación de minoxidil en su forma de sal (sulfato) que es más soluble que su base correspondiente, y no a la presencia de los polímeros hidrófilos añadidos a la preparación. Cuando se usan estos polímeros, que incluyen β-CD, en porcentajes bajos posibilitan una solubilización limitada del principio activo (véase el Ejemplo 10 más adelante).

Por lo tanto, los intentos de incrementar la solubilidad acuosa de minoxidil sin la ayuda de codisolventes, evitando así la formación de precipitados, y de mejorar la biodisponibilidad de minoxidil, se convierte en un desafío importante en el campo dermatológico-farmacéutico. También es de gran importancia identificar nuevas formulaciones basadas en minoxidil para reducir los efectos secundarios y para mejorar la manipulación y la conformidad del producto.

Para mejorar la penetración del fármaco en la piel, se han propuesto varias soluciones en los últimos años como alternativa a las formulaciones tradicionales anteriormente informadas, tales como las formulaciones innovadoras constituidas por micropartículas, etosomas, niosomas, liposomas, etc. Sin embargo, tales formulaciones farmacéuticas son difíciles de preparar, especialmente por lo que respecta a la preparación galénica, y no siempre permiten una

solubilización del fármaco en cantidades elevadas (Mura S. et al. 2009; Mura S. et al. 2011; Zhao Y. et al. 2010; Mura S. et al. 2007; documento EP 0177223).

En las patentes US 5.030.442 y US 4.828.837 se consiguió el aumento de la solubilidad de minoxidil mediante la inclusión de excipientes anfipáticos con un pKa menor de 5. El uso de tales agentes, tales como cocoil taurato de N-metilo, sulfosuccinato de laurilo, ácido lisofosfatídico, éster de monoalquil fosfato, fosfonato de monoalquilo, sulfonato de monoalquilo, y oleamido-PEG-2-sulfosuccinato, puede provocar problemas de alergia.

De manera alternativa, también se han propuesto agentes solubilizantes tales como ciclodextrinas.

Se sabe que tales oligosacáridos cíclicos pueden formar complejos de inclusión con muchos fármacos hidrófobos, por lo que se incrementa su solubilidad en agua (Stella V.J. et al., 1997). Tales excipientes tienen una toxicidad limitada, y en general se consideran seguros.

Existen varios estudios en la bibliografía sobre los complejos entre minoxidil y las ciclodextrinas (Calderini A. et al., 2008; Kim J. et al. 2003; Teak Kwan Kwon et al., 2010; Lopodota et al., 2014).

En el estudio de Calderini A. et al., 2008, se ha ensayado la solubilidad de minoxidil por medio del uso de β -CD, que da como resultado la formación de un complejo de inclusión. Sin embargo, tal incremento no fue tan elevado como se esperaba en vista de la constante de inclusión (K_c 150 M^{-1}).

Otro límite de la β -CD es su baja solubilidad en agua (1,8% p/v) en comparación con sus derivados hidroxipropil-beta ciclodextrina (HP- β -CD), sulfobutil éter beta-ciclodextrina (SBE- β -CD), metil-beta ciclodextrina (Me- β -CD), cuyas solubilidades en agua también pueden superar el 50% p/v. Por tanto, se puede usar β -CD a dosis muy limitadas, no siempre suficientes para mejorar la solubilidad de las sustancias que tienen una baja solubilidad en agua.

En el trabajo de Kim J. et al. (2003) se demuestra que una disolución de minoxidil y HP- β -CD tiene una absorción reducida en comparación con las disoluciones correspondientes que contienen vesículas catiónicas que incorporan minoxidil.

Al contrario, Lopodota A. et al., 2014 describe una disolución de Me- β -CD/minoxidil como alternativa a HP- β -CD, e informa unos valores de solubilidad en agua de minoxidil y capacidades complejantes similares a la disolución con HP- β -CD. Sin embargo, las metil ciclodextrinas actúan extrayendo colesterol y triglicéridos, lo que reduce la función de barrera de la piel y favorece la absorción incrementada del fármaco (Irie T. y Uekama K., 1997). Si por una parte esto puede parecer una ventaja debido a que tales sustancias pueden comportarse como potenciadores de la absorción, al mismo tiempo la reducción de la función de barrera de la piel mediante la extracción de colesterol y triglicéridos puede provocar efectos irritativos a medio y largo plazo.

Los autores de la presente invención han preparado formulaciones farmacéuticas en forma de una disolución viscosa o gel que comprende minoxidil e hidroxipropil β -ciclodextrinas como agentes solubilizantes para el tratamiento tópico de la alopecia, que muestran efectos irritativos reducidos (debido a una especificidad limitada de las hidroxipropil β -ciclodextrinas hacia el colesterol y los triglicéridos), en donde el minoxidil se solubiliza de manera más eficaz (véase el Ejemplo 10).

Tales formulaciones conjugan los efectos solubilizantes de HP- β -CD hacia minoxidil, con la capacidad de una mejor adherencia y persistencia de las formulaciones de gel o las disoluciones viscosas sobre el cuero cabelludo. La presencia de hidroxipropil β -ciclodextrina en las cantidades y con el grado de sustitución adecuado permite la solubilización del fármaco también con dosis del 6% p/p.

El principio de solubilización de minoxidil adoptado en las formulaciones según la invención se basa en una estrategia diferente con respecto a la cosolvenencia empleada en el estado de la técnica, que es la complejación. Esto se consigue mediante el uso de una ciclodextrina particular (HP- β -CD), preferiblemente con un grado de sustitución que permite producir un complejo de inclusión con minoxidil, que solubiliza hasta un 6% p/p de este último. Esta nueva aproximación consigue una formulación completamente acuosa que permite superar las desventajas anteriormente mencionadas relacionadas con el uso de propilen glicol y etanol (solicitud de patente internacional WO95/25500).

Las formulaciones de gel o las disoluciones viscosas según la invención contienen agua como vehículo, y no contienen excipientes como etanol y propilen glicol, responsables de las irritaciones del cuero cabelludo.

La Figura 3 muestra la comparación entre los componentes de dos preparaciones disponibles comercialmente (formulaciones tópicas basadas en MXD ilustradas en la Farmacopea - Brusa P. et al. Prontuario pratico di galenica, y Rogaine®) y una de las formulaciones ejemplificadas en la presente memoria (Formulación A, Ejemplo 1), que muestran claramente la ausencia de los codisolventes de etanol/propilen glicol responsables de varios efectos secundarios en el cuero cabelludo.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es una formulación de gel o disolución viscosa para el tratamiento tópico de la alopecia, que comprende:

- minoxidil como principio activo a una concentración comprendida entre un 0,5% y 6% p/p;

- hidroxipropil β -ciclodextrina como agente solubilizante a una concentración comprendida entre un 5% y 45% p/p, en donde el grado de sustitución de la hidroxipropil β -ciclodextrina es 4,5;
 - al menos un polímero hidrófilo seleccionado de alginato, carbómero, poliacrilato, derivado de celulosa, gelatina y pectina a una concentración comprendida entre un 0,2% y 3% p/p;
- 5 - agua entre un 42% y 85% p/p;

opcionalmente junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, caracterizada por la ausencia de codisolventes de etanol y propilen glicol.

Las formulaciones según la invención, dependiendo del polímero hidrófilo seleccionado (alginato, carbómero, poliacrilato, derivado de celulosa, gelatina y pectina), se obtienen fácilmente mediante hidratación del polímero en agua (es decir, alginato, gelatina, pectina, derivado de celulosa) o mediante la adición de un agente gelificante, tal como bases inorgánicas y orgánicas (es decir, carbómero, poliacrilato) o cloruros que contienen iones bivalentes (es decir, alginato).

Por tanto, según una realización alternativa, la formulación o la disolución viscosa según la invención comprende además al menos un agente gelificante seleccionado de bases fuertes inorgánicas y orgánicas (tales como, por ejemplo, NaOH, KOH, BaOH₂, CaOH₂, trietanolamina) o cloruros que contienen iones bivalentes (tales como, por ejemplo, CaCl₂, BaCl₂, MgCl₂), a una concentración comprendida entre un 2,6% y 4 % p/p.

Preferiblemente, los polímeros hidrófilos están presentes en un porcentaje comprendido entre un 0,2 y 2%. En particular, los geles de alginato (es decir, alginato sódico o cálcico) fueron especialmente ventajosos, ya que muestran efectos beneficiosos adicionales sobre el cuero cabelludo lesionado por algunas formas de alopecia. La hidroxipropil β -ciclodextrina tiene un grado de sustitución de 4,5. De hecho, los autores de la invención identificaron que HP- β -CD con un grado de sustitución de 4,5 tiene una mayor actividad solubilizante que la misma HP- β -CD con un grado de sustitución de 6,1 (véase el Ejemplo 4, Figura 2).

Según una realización alternativa de la presente invención, la formulación de gel o la disolución viscosa puede contener hidroxipropil β -ciclodextrina en combinación con otro derivado de β -ciclodextrina seleccionado de sulfobutil éter beta-ciclodextrina (SBE- β -CD) y metil β -ciclodextrina (Me- β -CD) con un grado de sustitución variable, en un porcentaje comprendido entre un 5% y 45% p/p.

Los excipientes adicionales opcionalmente presentes en las formulaciones según la invención que pueden mejorar el efecto solubilizante de la hidroxipropil β -ciclodextrina se seleccionan del grupo que consiste en excipientes hidrófilos tales como, por ejemplo, polioxietilenglicol (PEG entre 400 y 6000), poli(alcohol vinílico), polivinil pirrolidona, sorbitol, glicerina, lactosa, sacarosa, manitol, y están presentes a concentraciones comprendidas entre un 0,2% y 5%. A esta mezcla es posible añadirle polímeros que pueden mejorar el efecto solubilizante de la hidroxipropil β -ciclodextrina y/o potenciadores de la absorción. Las formulaciones según la invención pueden contener además agentes conservantes tales como agentes antimicrobianos y antifúngicos.

La presente invención se describirá a continuación con fines ilustrativos y no limitantes, basándose en las figuras adjuntas, en las que:

- La Figura 1 muestra el efecto sobre la capacidad solubilizante de HP- β -CD con un grado de sustitución de 4,5 sobre cuatro porcentajes de MXD (1,7, 3,03, 4,13 y 4,76% p/p);
- La Figura 2 muestra la comparación entre la capacidad solubilizante de dos tipos de HP- β -CD con un grado de sustitución diferente de 4,5 y 6,1;
- La Figura 3 muestra la comparación entre los componentes de dos preparaciones disponibles comercialmente (FB y Rogaine®) y una de las formulaciones según la invención (Formulación B), resaltando la ausencia de los codisolventes de etanol/propilen glicol responsables de diferentes efectos secundarios sobre el cuero cabelludo;
- La Figura 4 ilustra los resultados del examen histológico con piel de oreja de cerdo: A) control; B) piel tratada con una disolución acuosa del 33% p/p de HP- β -CD, y minoxidil al 5% p/p durante 24 hrs a 37 °C; C) piel tratada con la disolución preparada siguiendo las indicaciones de la FB (48% de etanol, 35% de propilen glicol, 12% de agua y 5% de minoxidil) durante 24 hrs a 37 °C.
- La Figura 5 muestra las fotografías de los tres grupos experimentales de depilación en el día 0 de tratamiento.
- La Figura 6 muestra los tres grupos experimentales en la primera semana de tratamiento: grupo I CTRL, grupo II disolución comercial, grupo III formulación A.
- La Figura 7 muestra los tres grupos experimentales en la segunda semana de tratamiento: grupo I CTRL, grupo II disolución comercial, grupo III formulación A.
- La Figura 8 muestra los tres grupos experimentales en la tercera semana de tratamiento: grupo I CTRL, grupo II

disolución comercial, grupo III formulación A.

- La Figura 9 muestra los portaobjetos de pelo de rata de los tres grupos experimentales: grupo I CTRL, grupo II disolución comercial, grupo III formulación A.
- La Figura 10 muestra un gráfico que informa de la tendencia de crecimiento del pelo en las ratas en tratamiento.
- 5 - La Figura 11 muestra dos gráficos que ilustran la tendencia de crecimiento de longitud/diámetro del pelo en las ratas en tratamiento.
- La Figura 12 muestra la expresión génica del marcador de autofagia Bnip3 (panel A) y del marcador de atrofia Atroquina-1 (panel B) tanto en la piel como en el corazón.
- La Figura 13 muestra la expresión génica del marcador caspasa 3 (panel A) y del marcador Mapk3 (panel B).
- 10 - La Figura 14 muestra la expresión génica de los marcadores Nfkb1 y TNF α (paneles A y B).
- La Figura 15 muestra el gráfico de solubilidad de fases de MXD/HP β CD a 25 °C.

EJEMPLO 1: Ejemplificación de las formulaciones de gel de la invención

Formulación A

- Mezcla A:

✓ HP- β -CD (grado de sustitución 4,5) 23,16 p/p

✓ alginato sódico 0,5 p/p

- Minoxidil 3,51 p/p

- Disolución B:

✓ disolución de cloruro cálcico dihidrato 0,1 M

2,63 p/p

✓ agua con conservantes 70,2 p/p

Preparación:

- 15 La mezcla en polvo hecha de HP- β -CD y alginato sódico se solubilizó en agua, seguido de la adición de la base de minoxidil, que se solubilizó con agitación magnética continua. El producto requirió alrededor de 1 hora para la solubilización completa. Se recomienda ajustar la velocidad del imán al mínimo para evitar la incorporación de burbujas de aire. El producto solubilizado fue claro, incoloro y viscoso. Una vez que se completó la solubilización, se añadió una disolución de CaCl₂ 0,1 M gota a gota con agitación magnética continua. El gel requirió de 8 a 12 hrs para completar su gelificación.
- 20

Formulación B

- HP- β -CD (grado de sustitución 4,5) 23,24 p/p

- Alginato Sódico 1,41 p/p

- Minoxidil 3,52 p/p

- Agua con conservantes 71,83 p/p

Preparación:

A la mezcla en polvo hecha de HP- β -CD y alginato sódico se le añadió polvo de base de minoxidil.

- 25 Dicha mezcla se transfirió a un vaso de precipitados, en donde se añadió lentamente agua purificada. Los polvos se dejaron solubilizar con agitación magnética continua. El producto requirió alrededor de 1 hr para la solubilización completa. Se recomienda ajustar la velocidad del imán al mínimo para evitar la incorporación de burbujas de aire. Después de 5 hrs el producto parece un gel.

Formulación C

- HP-β-CD (grado de sustitución 4,5)	23,75 p/p
- Carbómero 934	0,36 p/p
- Disolución de NaOH (0,1 M)	0,36 p/p
- Minoxidil	3,59 p/p
- Agua con conservantes	71,83 p/p

Preparación:

- 5 A la mezcla en polvo hecha de HP-β-CD y carbómero se le añadió minoxidil. Dicha mezcla se transfirió a un vaso de precipitados, en donde se añadió lentamente agua purificada. Los polvos se dejaron solubilizar con agitación magnética continua. El producto requirió alrededor de 3 hrs para la solubilización completa. Se recomienda ajustar la velocidad del imán al mínimo para evitar la incorporación de burbujas de aire. Se añadió gota a gota una disolución de NaOH 0,1 M a la disolución viscosa hasta obtener un gel.

Formulación D

- HP-β-CD (grado de sustitución 4,5)	24,0 p/p
- Hidroxietilcelulosa (HEC)	1,0 p/p
- Minoxidil	3,52 p/p
- Agua con conservantes	71,48 p/p

- 10 A la mezcla en polvo hecha de HP-β-CD e hidroxietilcelulosa se le añadió minoxidil. Dicha mezcla se transfirió a un vaso de precipitados, en donde se añadió lentamente agua purificada. Los polvos se dejaron solubilizar con agitación magnética continua. El producto requirió alrededor de 1 hr para la solubilización completa. Se recomienda ajustar la velocidad del imán al mínimo para evitar la incorporación de burbujas de aire. Después de 5 hrs el producto parece un gel.

Formulación E

- Mezcla A:		
✓	HP-β-CD (grado de sustitución 4,5 o 6,1)	18 p/p
✓	alginato sódico	0,5 p/p
-	Minoxidil	2,0 p/p
- Disolución B:		
✓	disolución de cloruro cálcico dihidrato	0,1 M
		2,7 p/p
✓	agua con conservantes	76,8 p/p

Preparación:

- 15 La mezcla en polvo hecha de HP-β-CD y alginato sódico se solubilizó en agua, seguido de la adición de la base de minoxidil, que se solubilizó con agitación magnética continua. El producto requirió alrededor de 1 hora para la solubilización completa. Se recomienda ajustar la velocidad del imán al mínimo para evitar la incorporación de burbujas de aire. El producto solubilizado fue claro, incoloro y viscoso. Una vez que se completó la solubilización, se añadió una disolución de CaCl₂ 0,1 M gota a gota con agitación magnética continua. El gel requirió de 8 a 12 hrs para completar su gelificación.
- 20

Formulación F

- Mezcla A:		
✓	HP-β-CD (grado de sustitución 4,5)	40,0 p/p
✓	alginato sódico	0,5 p/p
- Minoxidil		
		6,0 p/p
- Mezcla B:		
✓	disolución de cloruro cálcico dihidrato	0,1 M
		3,0 p/p
✓	agua con conservantes	45,5 p/p

Preparación:

- 5 La mezcla en polvo hecha de HP-β-CD y alginato sódico se solubilizó en agua, seguido de la adición de minoxidil. Los componentes se solubilizaron después de alrededor de 1 hora a temperatura ambiente y con agitación magnética continua. Se recomienda ajustar la velocidad del imán al mínimo para evitar la incorporación de burbujas de aire. El producto solubilizado fue claro, incoloro y viscoso. Una vez que se completó la solubilización, se añadió una disolución de CaCl₂ 0,1 M gota a gota con agitación magnética continua. El gel requirió de 8 a 12 hrs para completar su gelificación.

Formulación G

- Mezcla A:		
✓	HP-β-CD (grado de sustitución 4,5)	24 p/p
✓	alginato sódico	0,5 p/p
- Minoxidil		
		3,51 p/p
- Disolución B:		
✓	capril-caproil macrogol 8-glicérido	2 p/p
✓	agua con conservantes	67,29 p/p
- Disolución C:		
- disolución de cloruro cálcico dihidrato		
		0,1 M
		2,7 p/p

10 Preparación:

- 15 La mezcla en polvo hecha de HP-β-CD y alginato sódico se solubilizó en la disolución B, seguido de la adición de la base de minoxidil, que se solubilizó con agitación magnética continua. El producto requirió alrededor de 1 hora para la solubilización completa. Se recomienda ajustar la velocidad del imán al mínimo para evitar la incorporación de burbujas de aire. El producto solubilizado fue claro, incoloro y viscoso. Una vez que se completó la solubilización, se añadió la disolución C gota a gota con agitación magnética continua. El gel requirió de 8 a 12 hrs para completar su gelificación.

Formulación H

- Mezcla A:

✓ HP-β-CD (grado de sustitución 4,5 o 6,1)	24 p/p
✓ alginato sódico	0,5 p/p
✓ PEG 6000	1,0 p/p

- Minoxidil

4,0 p/p

- Disolución B

✓ capril-caproil macrogol 8-glicérido	2 p/p
✓ agua con conservantes	65,8 p/p

- Disolución C:

✓ disolución de cloruro cálcico dihidrato	0,1 M
	2,7 p/p

Preparación:

- 5 La mezcla en polvo hecha de HP-β-CD y alginato sódico y PEG 6000 se solubilizó en la disolución B, seguido de la adición de minoxidil. Después de 3 hrs a temperatura ambiente y con agitación magnética continua, la preparación es clara, incolora y viscosa. Después se añadió una disolución de CaCl₂ 0,1 M gota a gota con agitación magnética continua. El gel requirió de 8 a 12 hrs para completar su gelificación.

EJEMPLO 2: *Análisis de las características organolépticas de las formulaciones A-D según la invención*

Se analizaron las características organolépticas de algunas de las formulaciones de geles de la invención (Formulaciones A-D, Ejemplo 1).

- 10 Se determinó la homogeneidad (presencia de agregados) mediante inspección visual después de insertar la formulación en viales adecuados; se detectó la presencia de partículas sólidas mediante un microscopio óptico (Leica Galen III equipado con una cámara Panasonic y el programa informático Leica Qwin 2.4).

Se midió el pH mediante un pH-metro (Inolab pH LEVEL 1 WTW, Weilheim, Alemania).

- 15 Se disolvieron 50 mg del gel específico en 50 ml de agua destilada durante 2 hrs a temperatura ambiente. Se midió el pH de esta disolución.

La Tabla 1 siguiente ilustra los resultados conseguidos.

Tabla 1: Características organolépticas de algunas de las formulaciones de geles de la invención (Formulaciones A-D)

Gel	Formulación	Homogeneidad	Granularidad	pH
Alginato cálcico	A	+++	-	6,52±0,5
Alginato sódico	B	+++	-	6,50±0,2
Carbopol 934	C	++	-	6,53±0,8
HEC	D	+++	-	6,50±0,5
Excelente +++, Buena ++, Satisfactoria +, Sin granularidad –				

EJEMPLO 3: *Estudio sobre el efecto de la capacidad solubilizante de la HP-β-CD con un grado de sustitución de 4,5*

- 20 Se llevaron a cabo estudios preliminares para establecer: a) qué grado de sustitución de HP-β-CD es mejor para el uso en las formulaciones y b) el intervalo cuantitativo necesario para solubilizar minoxidil en la cantidad fijada en el intervalo del 0,5%-6% p/p.

Materiales y métodos

Se ensayaron preparaciones que contenían HP- β -CD con un grado de sustitución de 4,5 a diferentes concentraciones (15, 27, 39 y 60 g en c.s. para 100 ml de agua) y minoxidil a diferentes concentraciones (2, 4, 6 y 8 % p/v).

- 5 En detalle, se establecieron cuatro disoluciones que contuvieron: 15 g, 27 g, 39 g y 60 g de HP- β -CD en 100 g de agua. Se añadieron 2 gramos de minoxidil a la primera disolución, 4 g a la segunda; 6 g a la tercera; y 8 g a la cuarta.

Las preparaciones se dejaron con agitación magnética durante una hora y después se determinó la solubilización del principio activo mediante inspección visual (claridad de la preparación).

Se recogieron datos de solubilidad tres veces para cada formulación.

Formulaciones ensayadas

- 10 1) Primera formulación que contiene 15 g de ciclodextrina y 2 g de minoxidil en 100 g de preparación;
2) Segunda formulación que contiene 27 g de ciclodextrina y 4 g de minoxidil en 100 g de preparación;
3) Tercera formulación que contiene 39 g de ciclodextrina y 4 g de minoxidil en 100 g de preparación;
4) Cuarta formulación que contiene 60 g de ciclodextrina y 8 g de minoxidil en 100 g de preparación;

Resultados

- 15 La Figura 1 ilustra los valores de HP- β -ciclodextrina expresados en p/p respecto de la primera a cuarta preparaciones, que son del 12,8%, 20,6%, 26,0% y 35,7% p/p respectivamente, y los valores correspondientes de minoxidil solubilizado que son del 1,7%, 3,03%, 4,13% y 4,76% p/p.

- 20 A la concentración de HP- β -CD del 12,8% p/p, solamente se puede solubilizar un 1,7% p/p de minoxidil; a la concentración de HP- β -CD del 20,6% p/p, se solubiliza un 1,7% p/p y 3,03% p/p de minoxidil; a la concentración de HP- β -CD del 26% p/p, se solubiliza un 1,7%, 3,03% y 4,13 % p/p de minoxidil, finalmente a la concentración del 35,7% p/p es posible solubilizar hasta un 4,76% p/p de minoxidil.

La Figura 1 ilustra gráficamente los resultados obtenidos sobre la diferente capacidad solubilizante de HP- β -CD con un grado de sustitución de 4,5.

EJEMPLO 4: *Estudio comparativo sobre la capacidad solubilizante de la HP- β -CD con diferentes grados de sustitución*

25 Materiales y métodos

Se prepararon dos disoluciones de HP- β -CD al 24,8% p/p con dos ciclodextrinas diferentes, cada una con un grado de sustitución de 4,5 y 6,1.

En particular, se solubilizaron 33 gramos de cada ciclodextrina en 100 ml de agua (o 24,8 g de CD y agua, c.s. para 100 g).

- 30 Dicha disolución se distribuyó en viales en alícuotas de un volumen de 5 ml. A cada vial se le añadió una cantidad de minoxidil del 1% p/v (50 mg); si el principio activo se disolvió (inspección visual), se añadieron otros 50 mg para obtener una concentración de minoxidil del 2% p/v hasta que se obtuvo visualmente una disolución turbia con un producto suspendido.

Formulaciones ensayadas

- 35 100 g de formulación que contiene 24,8 g de HP- β -CD con un grado de sustitución de 4,5 y 100 g de formulación que contiene 24,8 g de HP- β -CD con un grado de sustitución de 6,1.

Resultados

Se ensayó una capacidad solubilizante de minoxidil de hasta un 5% p/v en formulaciones que comprendían HP- β -CD a una concentración del 24,8% p/p (con un grado de sustitución de 4,5 y 6,1).

- 40 La formulación que comprendió HP- β -CD con un grado de sustitución de 4,5 permite una solubilización de minoxidil adecuada de hasta un 5%, mientras la formulación que comprendió HP- β -CD con un grado de sustitución de 6,1 no es capaz de solubilizar tal cantidad, y se paró al 4%.

La Figura 2 muestra gráficamente los resultados obtenidos sobre la diferente capacidad solubilizante de HP- β -CD con un grado de sustitución de 4,5 y 6,1, respectivamente.

- 45 EJEMPLO 5: *Comparación del contenido de agua, etanol y propilen glicol entre una formulación según la invención y*

dos formulaciones disponibles comercialmente

Materiales y métodos

Las cantidades de disolventes y codisolventes (agua, propilen glicol y etanol) empleadas para solubilizar 5 g de minoxidil se identificaron a partir de la bibliografía (Brusa P. et al. y documento US 2011/0112125 A1).

- 5 Los datos se refieren a 100 g de producto final que contiene 5 g de minoxidil.

Tales valores se compararon con una preparación según la invención, que tuvo la misma cantidad de minoxidil.

Formulaciones

Se compararon las siguientes formulaciones, que contienen un 5% de minoxidil:

- 10 A) Rogaine extra-fuerte: formulación que contiene un 30% de etanol, 50% de propilen glicol y 15% de agua
- B) Formulación informada en la Farmacopea Británica (FB) que contiene un 48% de etanol, 35% de propilen glicol y 12% de agua
- C) Formulación en agua que contiene un 33% p/p de HP- β -CD, 62% de agua

Resultados

- 15 A partir de dicha comparación, es evidente la ausencia de codisolventes en la formulación C y el hecho de que esta preparación muestra la misma capacidad solubilizante de minoxidil de las formulaciones A y B (véase la Figura 3).

EJEMPLO 6: *Estudio sobre el efecto histológico de la presencia de etanol y propilen glicol*

Materiales y métodos

En una celda de Franz que tenía un área superficial de 2,009 cm² y un volumen de recepción de 12,3 ml, se fijó piel de oreja de cerdo (grosor completo) conseguida de cerdos sacrificados en un matadero.

- 20 Las orejas se lavaron con agua corriente, se depilaron y la piel se retiró con un bisturí eliminando las porciones musculares y grasas. Una parte del tejido como tal (control) se trató de manera adecuada para los análisis histológicos.

Otras dos porciones se montaron en una celda de Franz.

- 25 En el compartimento receptor se obtuvo 1 ml de la disolución de minoxidil y ciclodextrina solubilizando 5 g del principio activo en presencia de 33 g de HP- β -CD en agua, c.s. para 100 g. En el compartimento receptor de otra celda de Franz, se añadió 1 ml de la formulación preparada según las instrucciones de la FB (Brusa P. et al.).

En detalle, se solubilizaron 5 g de minoxidil con agitación en la mezcla hecha con propilen glicol (35 g) y etanol 96° (48 g), después se añade agua con agitación, c.s. para 100 g (12 g)

Las dos celdas de Franz se termostataron a 37 °C para alcanzar una temperatura de 32 °C durante 24 horas en la superficie de la piel. Al final de este periodo las muestras de piel se trataron para el análisis histológico.

- 30 En particular, las muestras se fijaron en formalina durante 24 horas, se deshidrataron con concentraciones crecientes de ácido etílico, se incrustaron en parafina y después se disecaron en un microtomo en cortes de 2-5 micrómetros. Se eliminó la parafina de dichos cortes, se hidrataron con una concentración decreciente de disoluciones alcohólicas, y finalmente se tiñeron con hemalumbre y eosina. Los portaobjetos teñidos se observaron en un microscopio óptico.

Formulaciones comparativas

- 35 Formulación que contenía 33 g de HP- β -CD y 5 g de minoxidil en 100 ml de agua.

Formulación preparada según la receta informada en la FB: Minoxidil 5 g; propilen glicol 35 g; etanol 96°, agua 48 g, c.s. para 100 g.

Resultados

- 40 La Figura 4 muestra los resultados del examen histológico llevado a cabo con la piel de oreja de cerdo tratada durante 24 horas a 37 °C, respectivamente con:

- control: estructura de la piel sin tratamiento (panel A),
- formulación con ciclodextrina B según la invención (panel B)
- disolución preparada según las instrucciones de la FB (Prontuario pratico di galenica, de Brusa P.) (panel C).

El examen histológico informado en el panel B no revela ninguna alteración particular de la capa córnea; mientras el informado en el panel C muestra una desorganización sustancial de la capa córnea.

EJEMPLO 7: Estudio sobre la eficacia *in vivo* de la formulación A según la invención

La eficacia de una de las formulaciones según la presente solicitud de patente (formulación A; ejemplo 1) se determinó *in vivo* en un grupo de ratas macho.

Materiales y métodos

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* en ratas macho para ensayar la eficacia de la nueva formulación que contiene un 3,5% p/p de minoxidil. Los resultados de tales estudios se compararon con la disolución de minoxidil disponible comercialmente (disolución hidroalcohólica del 3,5% p/p) y con el control (ratas sin tratar). El estudio se divide en dos fases experimentales:

Primera fase piloto

En una primera fase se llevó a cabo un ensayo para determinar la eficacia de la formulación en desarrollo (formulación A) en comparación con el producto disponible comercialmente. Este estudio se ha llevado a cabo en seis ratas macho de 8 meses (edad adulta), de un peso medio de 550 g. Antes y durante el periodo de tratamiento, las ratas se alimentaron normalmente; se les afeitó el lomo mediante una máquina de afeitar eléctrica el día antes del inicio del tratamiento para obtener un área afeitada de 10 cm². Se consiguió la depilación completa del área aplicando una crema depilatoria durante un periodo de 3 min. La crema se eliminó y la piel se trató con una disolución hidroalcohólica de etanol al 70%. Las ratas se seleccionaron de manera aleatoria y se dividieron en tres grupos, y cada uno incluyó dos ratas. La Figura 5 muestra las fotografías de los tres grupos experimentales de depilación en el día 0 de tratamiento.

Grupos en estudio:

Grupo I: grupo de control sin tratar (CTRL) observado durante un periodo de 23 días;

Grupo II: grupo tratado con 1 ml de la disolución de minoxidil disponible comercialmente (3,5% p/p) aplicada de manera tópica una vez al día en la parte afeitada durante un periodo de 23 días;

Grupo III: grupo tratado con hidrogel que contiene 1 g de Minoxidil (3,5% p/p) aplicado de la misma manera que en el Grupo II.

Las ratas de los tres grupos se observaron y se fotografiaron en días diferentes. En días fijos se llevó a cabo la retirada de pelo para el estudio macro- y microscópico del diámetro, la longitud y el aspecto, así como del tamaño de los bulbos.

Análisis fotográfico

El área de crecimiento de pelo se fotografió semanalmente en cada rata mediante un Iphone 5S y las imágenes se analizaron mediante el programa Microsoft Office Picture Manager.

Toma de muestras y análisis tricológico

Todos los análisis siguientes se llevaron a cabo en condiciones de enmascaramiento. La retirada de pelo se llevó a cabo periódicamente, y todas las muestras se analizaron mediante un microscopio óptico (Leica Gallen III, aumento 50x, 100x, 400x, equipado con una cámara Panasonic con el programa informático Leica Qwin, versión 2.4), para estudiar la estructura del pelo y el tamaño de los bulbos. Además, se midió la longitud del pelo en un número estadísticamente significativo de muestras diferentes, por medio de un calibre con precisión milimétrica.

Resultados de la primera fase piloto

Durante el tratamiento de 23 días se observaron y se fotografiaron periódicamente las ratas que pertenecían a los tres grupos.

A partir de las observaciones diarias y las fotografías tomadas periódicamente se observa que los dos grupos tratados con el grupo II (disolución disponible comercialmente) y el grupo III (formulación A; ejemplo 1) mostraron un crecimiento comparable del pelo, con una cobertura del área afeitada del 20% en el grupo II y del 30% en el grupo III desde el comienzo del tratamiento (primera semana). Al contrario, el grupo I (control, CTRL) muestra un crecimiento de pelo muy lento con una superficie cubierta del 10% (Figura 6). La Figura 6 muestra los tres grupos experimentales en la primera semana de tratamiento: grupo I CTRL, grupo II disolución disponible comercialmente, grupo III formulación A.

Ajustando el umbral de tratamiento al 20% de la superficie corporal cubierta en la primera semana de tratamiento, se puede concluir que dos ratas de los grupos II y III respondieron al tratamiento (respondedores): la rata 1 del grupo II y la rata 1 del grupo III.

En la segunda semana, ambas ratas del grupo III mostraron un crecimiento de pelo, respectivamente, del 60% y 55%, mientras en el grupo II fue del 30% y 18%, y no se observaron respondedores en el grupo de control I (porcentaje de crecimiento de pelo del 15% y 10%) (Figura 7).

5 Es posible identificar: dos ratas respondedoras en el grupo III, 1 rata respondedora en el grupo II, ninguna rata respondedora en el grupo I.

En la tercera semana de tratamiento el grupo III mostró una cobertura completa del área afeitada igual al 100% frente al grupo I. Además, el grupo II muestra una cobertura del 100%, pero con un pelo más escaso (Figura 8). El grupo I mostró una cobertura del área de piel afeitada no mayor del 60%.

Calidad y longitud del pelo

10 Se examinó la calidad del pelo en todos los grupos experimentales. En detalle, las muestras del grupo III resultaron ser más gruesas y largas que en el grupo II, y tal diferencia es significativamente más notable en comparación con el grupo I (Figura 9).

La Figura 10 muestra un gráfico que ilustra la tendencia de crecimiento del pelo en un periodo de observación de 4 semanas en las ratas en tratamiento.

15 Segunda fase

En vista de los resultados del primer estudio, se llevó a cabo un programa a fondo de experimentos *in vivo* para confirmar las observaciones hechas en el primer estudio, y para estudiar contextualmente los efectos secundarios e irritantes de la formulación analizada.

20 En esta fase, el estudio se llevó a cabo con nueve ratas macho de 10-12 meses (edad adulta) y que pesaban 750 g de media, alimentadas normalmente. Los animales se afeitaron y se depilaron como se describió anteriormente. Las ratas se seleccionaron de manera aleatoria y se dividieron en tres grupos.

Grupo de estudio:

Grupo I: grupo de control sin tratar (CTRL) observado durante el periodo completo;

25 Grupo II: grupo tratado con 1 ml de la disolución de minoxidil disponible comercialmente (3,5% p/p) aplicada de manera tópica una vez al día en la parte afeitada durante un periodo de 25 días.

Para el periodo tras el 25º día, la dosis se aplicó dos veces al día (mañana y noche) hasta el 40º día de tratamiento.

Grupo III: grupo tratado con 1 g de formulación A (3,5% p/p) aplicada de la misma manera que en el Grupo II.

30 Las ratas de los tres grupos se observaron y se fotografiaron en días diferentes. En días fijos se llevó a cabo la retirada de pelo para el estudio macro- y microscópico del diámetro, la longitud y el aspecto, así como del tamaño de los bulbos.

En el día de tratamiento 40, cada animal se pesó, se anestesió con uretano administrado por vía intraperitoneal a una concentración de 1,2 g/kg, y se depiló en el lomo tratado y se sometió a:

- toma de muestra de sangre del ventrículo izquierdo del corazón;
- retirada de una biopsia de la piel dorsal para llevar a cabo estudios de expresión génica de marcadores de inflamación, mediante una técnica de RT-PCR con extractos tisulares de mRNA total;
- retirada de una biopsia del área tratada de piel dorsal para un análisis histológico que estudia:
 - a. el número y el diámetro de los bulbos capilares;
 - b. el estado inflamatorio y búsqueda de un área de posible necrosis;
- explante de corazón para el análisis de la expresión génica de marcadores de inflamación mediante una técnica de RT-PCR con extractos tisulares de mRNA total;
- retirada de biopsia de la piel ventral para un cultivo primario de fibroblastos.

Todos los animales completaron el protocolo de tratamiento de 40 días sin ningún efecto de intolerancia clínica o reacciones cutáneas evidentes, excepto los que pertenecieron al grupo II.

45 En este grupo, una rata murió en el día de tratamiento 25 probablemente por un choque hipotensivo (no se llevó a cabo una necropsia).

Resultados

Tasa de crecimiento y examen tricológico

La monitorización y las observaciones diarias de los tres grupos confirmaron los resultados de la primera fase con respecto a la tasa de crecimiento del pelo y la cobertura de pelo del área tratada.

- 5 De hecho, además este grupo de estudio III (Gel) mostró un crecimiento más rápido en comparación con los grupos II (disolución) y I (Ctrl), especialmente después de la primera semana, con una mejor calidad del pelo desde el punto de vista del diámetro y la longitud.

El grupo I mostró un crecimiento definitivamente inferior, con una calidad de pelo fino y frágil.

- 10 El análisis microscópico del pelo periódicamente retirado mostró una mayor longitud y diámetro del grupo III frente al grupo II y grupo I (véanse los gráficos de la Figura 11).

Datos histológicos

El análisis histológico preliminar de cortes de pelos en formaldehído mostró una mejora significativa del número de bulbos por área histológica en el grupo III frente al grupo II y grupo I, de acuerdo con el incremento de la densidad de pelo observada en los estudios de tasa de crecimiento y examen tricológico.

- 15 *Expresión génica e inflamación cardíaca y cutánea dorsal*

El análisis de la expresión génica llevado a cabo mediante una técnica de RT-PCR de muestras tisulares de piel y corazón explantadas de las ratas tratadas mostró:

- 20 - ningún aumento significativo de la expresión génica del marcador de autofagia Bnip3 y un aumento significativo del marcador génico de atrofia Atrofia-1, tanto en la piel como en el corazón: grupo II > grupo III > grupo I (Figura 12, paneles A y B).

Estos resultados señalan un mayor efecto autofágico y atrofico de la disolución comercial basada en minoxidil frente a la formulación A basada en minoxidil, tanto en la piel como en el corazón.

El gen de caspasa 3, que es un marcador de apoptosis en diferentes tejidos, se expresa significativamente en el corazón de animales que pertenecen al grupo II y grupo III:

- 25 Disolución comercial basada en minoxidil $\geq$ formulación A de gel basada en minoxidil > control, lo que sugiere por tanto un efecto pro-apoptótico similar del tratamiento para ambas formulaciones (Figura 13, panel A).

Por lo que respecta a la expresión génica del marcador Mapk3, que es una enzima implicada en la hipertrofia tisular, se observó un aumento de su expresión en el corazón tanto con la formulación A (gel) como con la disolución comercial (Figura 13, panel B).

- 30 La expresión génica de los marcadores Nfkb1 y TNF α no parece ser relevante en estos grupos experimentales, lo que sugiere por tanto que la ruta de citocinas no está implicada en los procesos inflamatorios (véase la Figura 14, paneles A y B).

Medidas de presión y ECG en telemetría inalámbrica en ratas tratadas de manera tópica con GEL basado en Minoxidil en GLP

- 35 Las medidas telemétricas longitudinales preliminares (ADInstruments, R.U.; Millar, Nueva Zelanda) tomadas en tres ratas mostraron que a la dosis eficaz el tratamiento induce una reducción ligera de la tensión arterial aórtica en la rata tratada con la formulación A (gel), y una reducción moderada en la rata tratada con la disolución comercial. Tales resultados sugieren que el tratamiento a largo plazo (40 días) puede inducir una hipotensión en los dos grupos de tratamiento, que es mayor en el grupo tratado con la disolución comercial basada en Minoxidil.

- 40 El estudio farmacológico preliminar anteriormente informado llevado a cabo en ratas macho de edad adulta mostró la superioridad de la nueva formulación de gel basada en minoxidil desde el punto de vista de la eficacia, manipulación, toxicidad local y sistémica reducida.

EJEMPLO 8: Estudio de solubilidad de fases: determinación de la constante de complejación entre Minoxidil y HP- β -CD

- 45 La complejación entre Minoxidil y las ciclodextrinas la estudiaron diferentes investigadores, y en particular Kim J. et al. (2003) y Kwon T. K. et al. (2010) llevaron a cabo estudios sobre la solubilidad de fases, por medio de espectrofotometría entre Minoxidil y HP- β -CD en el intervalo de concentración comprendido entre 0 y 0,32 M. Sin embargo, en tales trabajos el grado de sustitución de la HP- β -CD es igual a 0,8 (Kim et al. 2003), o no se describió (Kwon et al. 2010).

El grado de sustitución de HP- β -CD es un parámetro clave a considerar, ya que podría ser un factor discriminante para

determinar el aumento de la solubilidad de minoxidil, como se muestra en los Ejemplos 3-4 precedentes.

Basándose en las consideraciones informadas anteriormente, se estudió la constante de solubilidad entre Minoxidil y HP-β-CD con un grado de sustitución de 0,64 (sugerida como la realización más preferida de la presente invención).

- 5 Entre las posibles aproximaciones usadas para calcular la constante de solubilidad, en el presente estudio se adoptó el método de solubilidad introducido por Higuchi y Connors (1965).

Materiales y métodos

Para el estudio de solubilidad de fases se añadió una cantidad de Minoxidil que superaba su solubilidad a 5 disoluciones acuosas sin tamponar que tenían una concentración creciente de HP-β-CD (intervalo 0-0,128 M) en viales sellados de 5 ml, para evitar cualquier cambio provocado por la evaporación.

- 10 Las suspensiones así obtenidas se agitaron en vórtex durante alrededor de 5 minutos, y posteriormente se transfirieron a un agitador orbital en la oscuridad durante 2 días a $25 \pm 0,2$ °C a 100 oscilaciones por minuto (Thermo Scientific).

Una vez que se alcanza el equilibrio, se transfiere una alícuota de la fase acuosa de cada muestra a una jeringa de vidrio de 5 ml, y se filtra por medio de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0,22 μm (Millipore®, Milán, Italia).

- 15 El filtrado se almacenó en la oscuridad a una temperatura de $25 \pm 0,2$ °C hasta el siguiente análisis, que se llevó a cabo mediante HPLC tras la dilución oportuna de la muestra. Todas las medidas se repitieron al menos por triplicado.

Resultados

Se determinó la solubilidad en agua (S₀) de Minoxidil de la misma manera, y resultó ser coherente con los datos de la bibliografía (2,5 mg/ml).

- 20 Los datos recuperados del análisis cuantitativo de Minoxidil por medio de HPLC se usaron para determinar la constante del complejo de inclusión MXD/HP-β-CD, según la ecuación de Higuchi-Connors, informada a continuación:

$$K_{(1:1)} = \text{Pendiente} / (S_0 (1 - \text{Pendiente}))$$

A partir de los resultados del estudio, es posible afirmar que, en el intervalo de concentración previsto, el complejo HP-β-CD/minoxidil se forma a una proporción molar 1:1 de CD:MXD (véase la Figura 15).

- 25 La constante de complejación calculada resulta ser igual a 1500 M^{-1} , y dicho valor es definitivamente mayor que el indicado por Kim et al. Tal diferencia revelada puede estar asociada al método analítico empleado en el estudio (HPLC frente a UV), y sobre todo al grado de sustitución diferente de la ciclodextrina seleccionada para estos dos estudios, lo que confirma por tanto la importancia de la selección del grado de sustitución de la HP-β-CD.

EJEMPLO 9: Estudios de estabilidad de las formulaciones según la invención

- 30 La estabilidad de la formulación es fundamental para establecer su fecha de caducidad. Es necesario analizar la preparación según diversos aspectos para determinar la estabilidad: aspectos químicos, físicos y microbiológicos. Las formulaciones magistrales basadas en minoxidil informadas en la Farmacopea, que tienen un porcentaje de alcohol mayor del 25% p/p, resultaron ser estables desde un punto de vista microbiológico, y es posible indicar una fecha de caducidad de 6 meses a partir de la fecha de preparación. Sin embargo, es conveniente el almacenamiento en botellas de vidrio oscuro por el problema de la escasa fotoestabilidad del Minoxidil.

Para establecer una posible fecha de caducidad del objeto de la formulación de la invención, se llevaron a cabo tres estudios de estabilidad fisicoquímica de la formulación y del principio activo durante un periodo de tiempo máximo de tres meses.

- 40 El primer estudio se llevó a cabo en condiciones de almacenamiento reales, durante tres meses y un total de 35 días. En el segundo estudio, se sometió a tensión a la misma formulación con un ciclo de frío-calor en una habitación climatizada durante un ciclo de 60 horas totales. En el tercer estudio, la formulación de gel preparada mediante el uso de agua con conservantes se colocó en la habitación climatizada durante 3 meses a $25 \pm 0,2$ °C y una H.R. del 60%

Métodos

- 45 En el primer estudio, se preparó una formulación A según la presente invención. En detalle, se colocaron 10 gramos de gel de minoxidil del 3,5% p/p en recipientes transparentes cubiertos con parafilm o se dejaron en una estantería a temperatura ambiente protegidos o no de la luz. Cada semana se tomó una alícuota del gel del recipiente y se diluyó con una cantidad adecuada de agua/metanol. Una parte de la disolución restante se filtró y se inyectó en una HPLC (20 μl) para determinar la cantidad presente de Minoxidil.

- 50 El área integrada respecto del pico cromatográfico de Minoxidil se transformó en la concentración de minoxidil (mg/ml) basándose en una curva de calibración previamente preparada (R² 0,998). El valor obtenido se transformó en un valor

en porcentaje con respecto al valor esperado (0,035 mg/ml), que representó la cantidad de Minoxidil correspondiente al 100% de dicho compuesto activo en el gel.

En el segundo estudio, se analizó la estabilidad química y física de Minoxidil en la misma formulación en una habitación climatizada (Climacell, MMM Medcenter, Múnich, Alemania) durante 60 horas adoptando los siguientes programas:

- 5 - primer programa en la oscuridad y 5 secciones; 10 gramos de gel de minoxidil del 3,5% p/p (formulación A) en un recipiente de vidrio transparente durante 12 horas a 4 °C; 12 horas a 25 °C y 60% de H.R.; 12 horas a 40 °C y 60% de H.R.; 12 horas a 25 °C y 60% de H.R. y finalmente 12 horas a 4 °C
- 10 - segundo programa bajo luz UV/Vis y 5 secciones; 10 gramos de gel de MXD del 3,5% p/p (ejemplo A) en un recipiente de vidrio transparente durante 12 horas a 4 °C; 12 horas a 25 °C y 60% de H.R.; 12 horas a 40 °C y 60% de H.R.; 12 horas a 25 °C y 60% de H.R. y finalmente 12 horas a 4 °C. Se tomaron alícuotas de la muestra cada 24 horas y se trataron como en el primer estudio.

Finalmente, en el tercer estudio se prepararon 100 g de la formulación de gel de MXD del 3,5% p/p (formulación A) en presencia de agua con conservantes (nipagina, 75 mg y nipasol 25 mg en 100 ml de agua), y se transfirieron 50 g de la formulación inicial a un recipiente de polipropileno y la cantidad restante a un recipiente de vidrio, ambos equipados con un tapón. Los dos recipientes se insertaron en la habitación climatizada durante tres meses a 25 °C a un 60% de H.R. sin luz. Se tomaron fracciones de muestra cada 15 días y se analizaron tal como se indicó en el primer estudio.

Resultados

Los resultados obtenidos en el primer estudio se informan en las tablas 2 y 3.

20 Como se puede deducir a partir de las tablas, el Minoxidil es estable en el gel durante 5 semanas tanto en presencia como en ausencia de luz.

25 Probablemente, la formación del complejo entre Minoxidil y ciclodextrina permite incrementar la solubilidad del principio activo y reducir su inestabilidad a la luz. Además, el ligero incremento de la concentración de minoxidil que se da en ambos estudios en la semana 4-5 se puede asociar a una pérdida de agua dependiente del tiempo por evaporación de la formulación, que requiere el uso de un recipiente con un tapón sellado, especialmente si el producto se almacena durante más de un mes. Se detecta una ligera coloración ámbar en las formulaciones examinadas en la semana 5.

Tabla 2. Estabilidad química de Minoxidil (MXD) en condiciones reales sin protección de la luz

Tiempo (semana)	Concentración (mg/ml)	%MXD
0	0,036	100
1	0,037	102
2	0,038	106
3	0,037	104
4	0,037	104
5	0,042	116

Tabla 3. Estabilidad química de Minoxidil (MXD) en condiciones reales protegido de la luz

Tiempo (semana)	Concentración (mg/ml)	%MXD
0	0,036	100
1	0,036	100
2	0,035	98,6
3	0,035	98
4	0,040	111
5	0,041	114

- 5 Los resultados del segundo estudio mostraron la estabilidad química de Minoxidil en el gel, también tras un choque frío-calor en una habitación climatizada. Bajo tal tensión, tampoco se vio comprometida la solubilidad de Minoxidil en el gel, de hecho la temperatura baja alcanzada en la habitación climatizada (4 °C) no da como resultado la formación de precipitados en el gel. Finalmente, este estudio confirmó las buenas propiedades de estabilidad física del gel (sin variación organoléptica), aparte de una ligera coloración ámbar detectada al final del estudio.

Por último, también se obtuvo la confirmación de la estabilidad química de Minoxidil a partir del tercer estudio, como se muestra con fines ilustrativos en la Tabla 4.

- 10 Tabla 4. Estabilidad química de Minoxidil (MXD) en el gel en un recipiente de polipropileno durante el estudio en la habitación climatizada durante 3 meses a 25 °C y un 60% de H.R.

Tiempo (semana)	Concentración (mg/ml)	%MXD
0	0,035	100
2	0,036	103
4	0,034	97
6	0,036	103
8	0,037	106
10	0,035	100
12	0,036	103

Con respecto a la estabilidad física de la formulación, es posible detectar solamente una coloración ámbar ligera del producto tras tres meses.

- 15 **EJEMPLO 10:** *Comparación con las formulaciones basadas en minoxidil que emplean polímeros hidrófilos para solubilizar el principio activo*

Para demostrar el efecto de solubilización de minoxidil conseguido adoptando la estrategia de complejación, en vez del uso de polímeros hidrófilos (como en el documento US 2011/0112125) se establecieron los siguientes ensayos experimentales.

- 20 Se prepararon formulaciones de minoxidil en una cantidad total de 20 g cada una, que comprendieron los siguientes ingredientes (véase el Ejemplo 4 del documento US 2011/0112125):

- Minoxidil 0,8 g (4 partes en peso)
- Polivinilpirrolidona (K90) 0,6 g (3 partes en peso)
- Agua 18 g (90 partes en peso)
- 25 - H₂SO₄ 5 M para ajustar el pH a 3,0

Método de preparación

Se dispersaron 0,8 g de minoxidil en agua con agitación continua durante 10 minutos. Posteriormente, H₂SO₄ 5 M para disolver el minoxidil; el valor del pH es 3,1.

Se dispersaron 0,6 g de polivinilpirrolidona en la disolución, y se mezcló durante otros 10 minutos hasta obtener una solubilización completa del polímero.

- 5 Finalmente, se añadió NaOH 5 M para restablecer el valor del pH entre 4-4,5. En este medio se observó un precipitado blanco abundante.

Paralelamente, se prepararon formulaciones de minoxidil que contenían β -CD como polímero hidrófilo, minoxidil y agua según el Ejemplo 3 del documento US 2011/0112125, lo que condujo a resultados análogos.

- 10 Basándose en estos ensayos experimentales, se puede deducir que la estrategia de solubilización adoptada en la solicitud de patente US 2011/0112125 es la salificación del minoxidil inducida por el medio ácido creado por la adición de H₂SO₄, al ser el pKa de minoxidil igual a 4,6.

Sin embargo, cuando se restablece el pH a valores de pH mayores de 3 añadiendo NaOH, la forma sin protonar de minoxidil reaparece, lo que conduce a la precipitación del producto.

- 15 De hecho, para demostrar que el producto precipitado era minoxidil, el precipitado recuperado de los ensayos se analizó mediante RMN, cromatografía de gases-espectroscopía de masas y FT-IR. Los resultados del análisis confirmaron que el producto recuperado fue minoxidil.

Finalmente, para confirmar que la estrategia subyacente en las formulaciones según la invención es la complejación, y que el cambio del pH no afecta a la solubilización del principio activo, se repitió el mismo ensayo precedente pero con la siguiente formulación:

- 20 - Minoxidil 0,5 g (3,7 partes en peso)
 - HP- β -CD (0,64) 3,3 g (24,5 partes en peso)
 - Agua 9 g (67 partes en peso)
 - H₂SO₄ 5 M c.s. para ajustar el pH a 3,0

(volumen total 0,650 ml)

- 25 Se solubilizó HP- β -CD en 9 g de agua con agitación continua durante 30 minutos; se añadieron 0,5 g de minoxidil a la disolución y se solubilizaron, con agitación magnética, durante 15 minutos. El valor del pH de esta disolución es igual a 7,7.

Posteriormente, se añadió H₂SO₄ 5 M hasta que se alcanzó un valor de pH de 2,3.

Finalmente, se añadió NaOH 5 M para restablecer el valor del pH entre 4 y 4,5.

- 30 Sorprendentemente, tales variaciones de pH no dieron como resultado la formación de precipitados.

Bibliografía

- Documento US 4.596.812
 - Documento US 4.139.619
 - Brusa P. y Antonio Germano. Prontuario pratico di galenica. Editor Ambrosiana. Septiembre de 2011.
 35 - Messenger AG, Rundegren J. Br. J Dermatol. 2004; 150:186-194.
 - Tata S, Weiner N, Flynn G. J. Pharm Sci 1994; 19 Ott; 83(10):1508-10.
 - Tata S, Flynn GL, Weiner ND. J Pharm Sci. Jun. de 1995; 84(6):688-691.
 - Edward S, Friedman BS, Friedman PM, Cohen DE Washenic K. J. Am. Acad. Dermatol. 2002; 46:309-312.
 - Balakrishnan P, Shanmugam S, Lee WS, Lee WM, Kim JO Oh DH Kim JS Yoo BK, Choi HG, Woo JS, Yong CS.
 40 Int. J. Pharm. 2009; 377:1-8.
 - Documento WO95/25500
 - Documento US 2011/0112125
 - Mura S, Manconi M, Sinico C, Valenti D, Fadda AM. Int. J. Pharm 2009; 380:72-79.

- Mura S, Manconi M, Valenti D, Sinico C, Amparo OV, Fadda AM. J.D. Targ. 2011; 19(3): 189-196.
- Zhao Y, Brown MB, Jones SA. Int J Pharm 2010; 383:277-284.
- Mura S, Pirot F, Manconi M, Falson F, Fadda AM. J. Drug Target 2007; 15:101-108.
- Documento EP 0177223
- 5 - Documento US 5.030.442
- Documento US 4.828.837
- Stella VJ, Rajewski RA. Pharm Res 1997; 14:556-567.
- Calderini A Pessine FBT. J Incl Phenom Macrocycl Chem 2008; 60: 369-377.
- Kim J, Lee M, Rang MJ. Drug Deliv. 2003; 10(2): 119-123.
- 10 - Teak Kwan Kwon, Jin Chul Kim International Journal of Pharmaceutics 2010; 392: 268-273.
- Lopedota A, Cutrignelli A, Denora N, Laquintana V, Lopalco A, Selva S, Ragni L, Tongiani S, Franco M. Drug Development and Industrial Pharmacy. Marzo de 2014.
- Irie T e Uekama K. Journal of Pharmaceutical Sciences 1997, vol. 86, nº 2, febrero; páginas 147-162.
- Duchene D., Wouessidjewe D., Poelman M.-C. En New Trends in Cyclodextrins and Derivatives; Duchene, D., Ed.; Editions de Sant, Paris, 1991; páginas 447-481.
- 15 - Higuchi T, Connors KA. (1965). Phase solubility techniques. Adv Anal Chem Instrum 4:117-212.

REIVINDICACIONES

1. Una disolución viscosa o formulación de gel para el tratamiento tópico de la alopecia androgenética, que comprende:
 - minoxidil como principio activo a una concentración comprendida entre un 0,5% y 6% p/p;
 - hidroxipropil β -ciclodextrina como agente solubilizante a una concentración comprendida entre un 5% y 45% p/p, en donde el grado de sustitución de la hidroxipropil β -ciclodextrina es 4,5;
 - al menos un polímero hidrófilo seleccionado de alginato, carbómero, poliacrilato, derivado de celulosa, gelatina y pectina a una concentración comprendida entre un 0,2% y 3% p/p;
 - agua entre un 42% y 85% p/p;
- 5 10 opcionalmente junto con uno o más excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables, caracterizada por la ausencia de codisolventes de etanol y propilenglicol.
2. Formulación según la reivindicación 1, que comprende además al menos un agente gelificante seleccionado de bases fuertes inorgánicas y orgánicas o cloruros que contienen iones bivalentes a una concentración comprendida entre un 2,6% p/p y 4% p/p.
- 15 3. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho polímero hidrófilo está presente en un porcentaje comprendido entre un 0,2% y 2%.
4. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una β -ciclodextrina adicional seleccionada de sulfobutil éter β -ciclodextrina y metil β -ciclodextrina con un grado de sustitución variable en combinación con hidroxipropil β -ciclodextrina, en un porcentaje comprendido entre un 5% y 45% p/p.
- 20 5. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde los excipientes opcionales son excipientes hidrófilos seleccionados del grupo que consiste en polioxietilenglicol, poli(alcohol vinílico), polivinil pirrolidona, sorbitol, glicerina, lactosa, sacarosa, manitol, a una concentración comprendida entre un 0,2% y 5%.
6. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además agentes conservantes tales como agentes antimicrobianos y/o antifúngicos.
- 25 7. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho al menos un polímero hidrófilo se selecciona de alginato sódico, carbómero y poliacrilato.

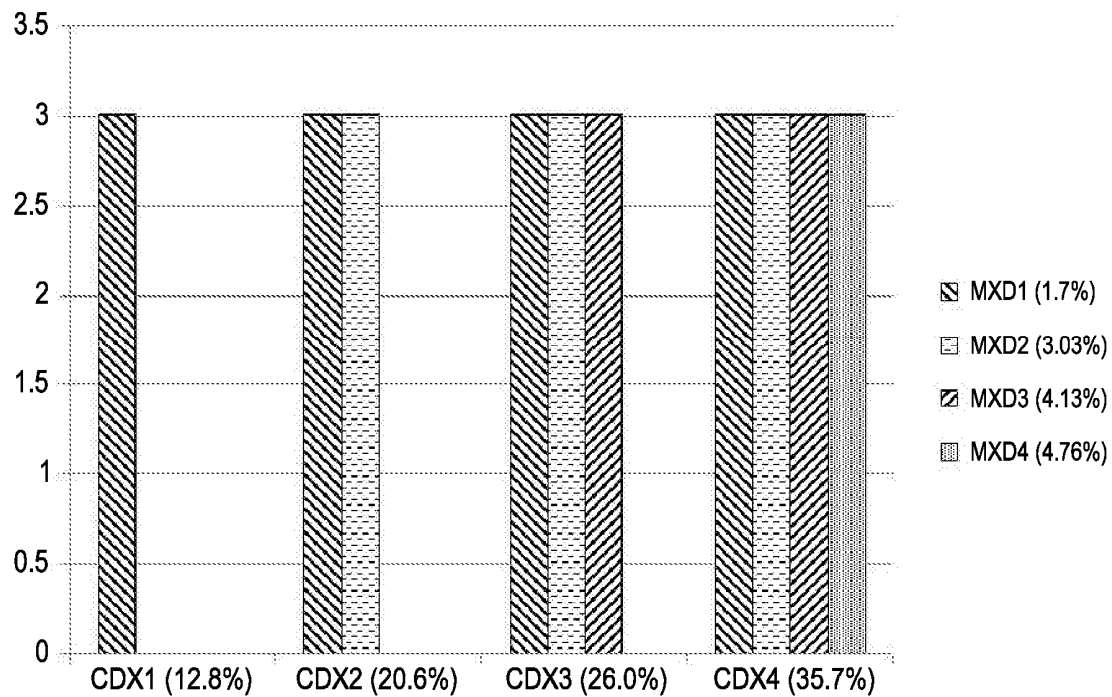


FIG.1

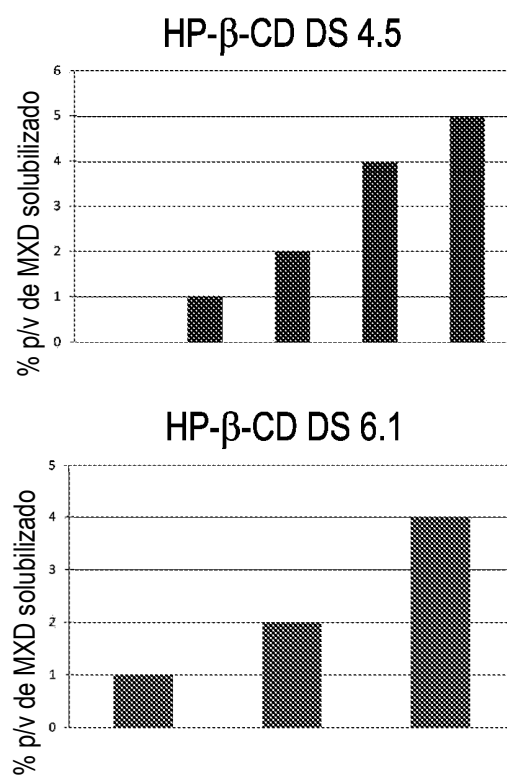


FIG.2

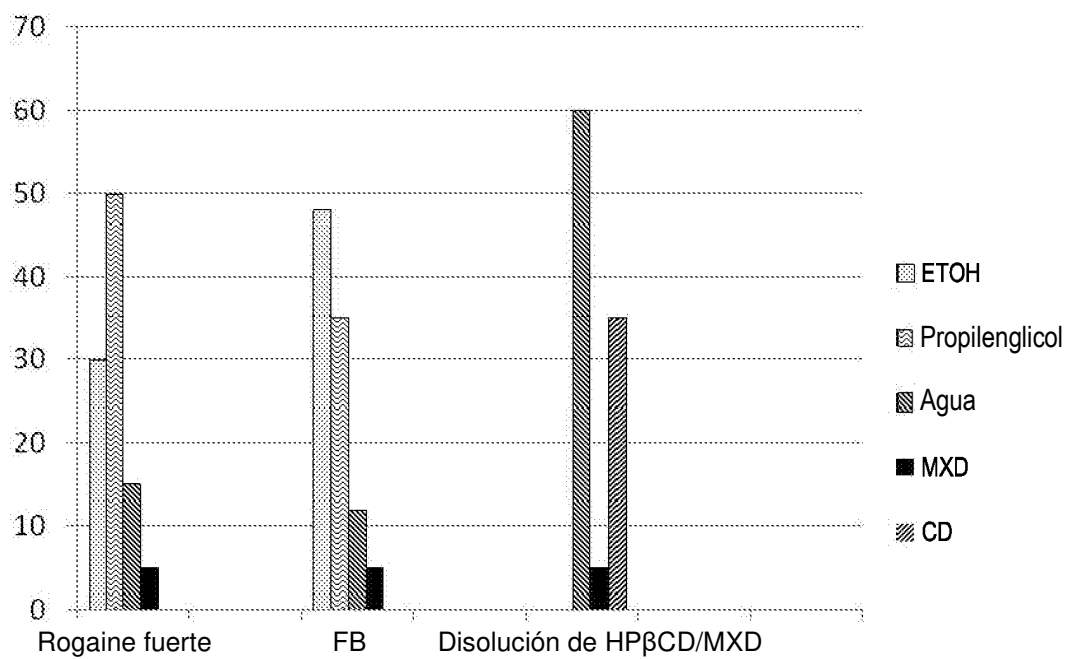


FIG.3

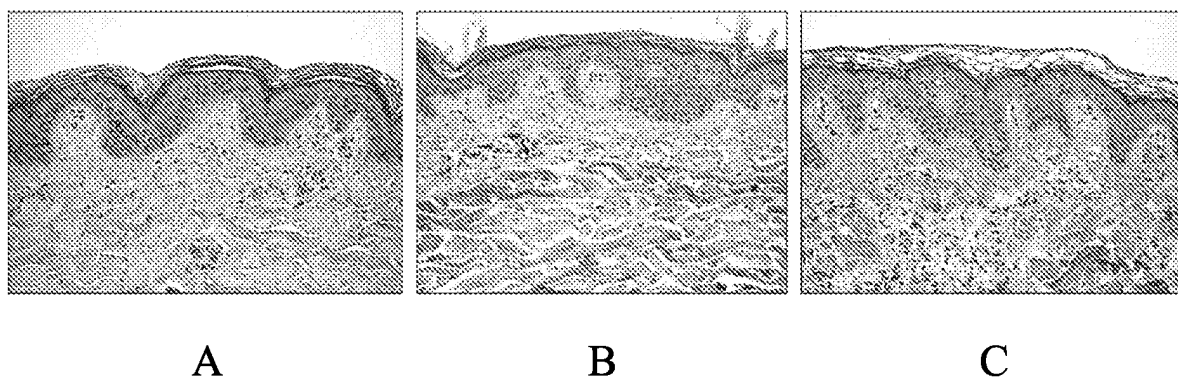


FIG.4

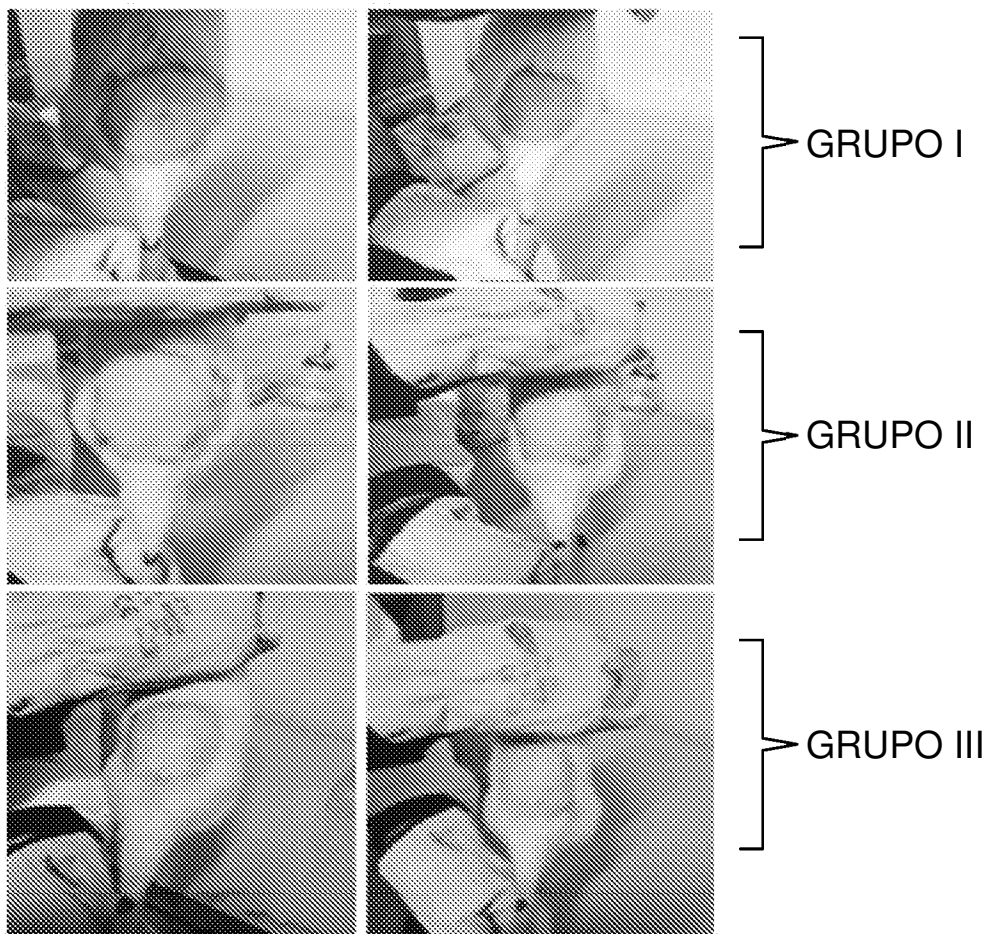


FIG.5

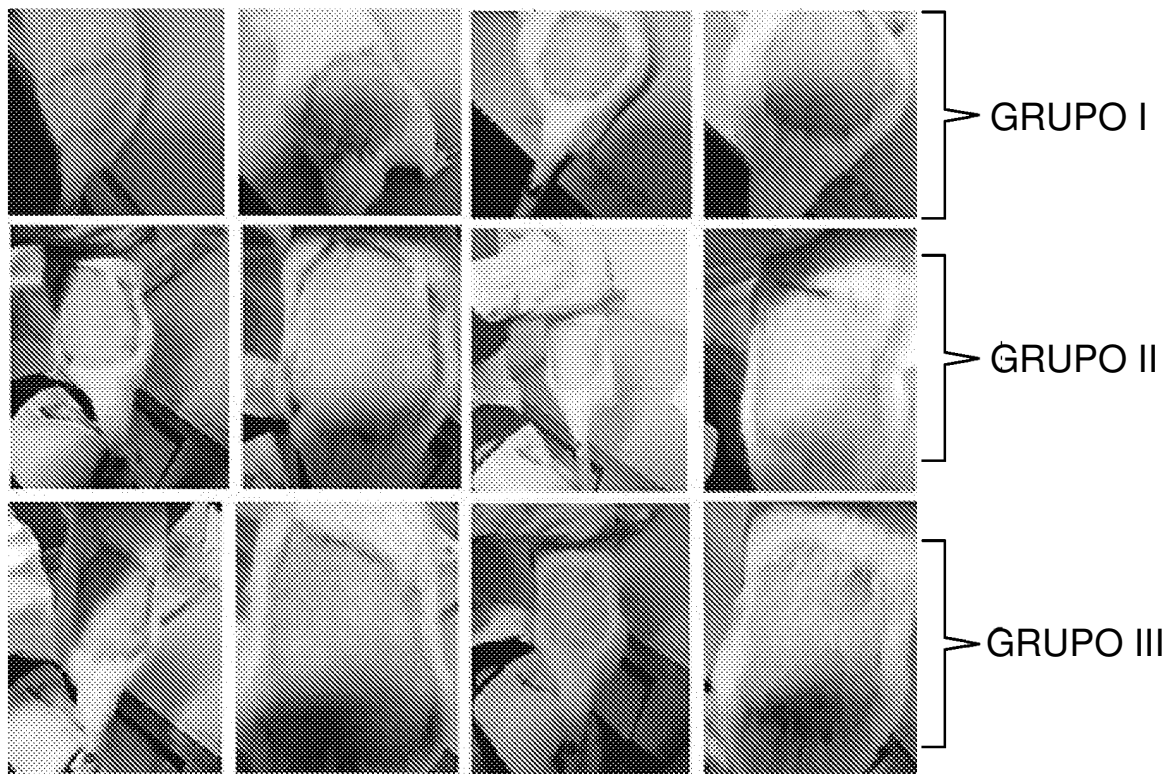


FIG.6

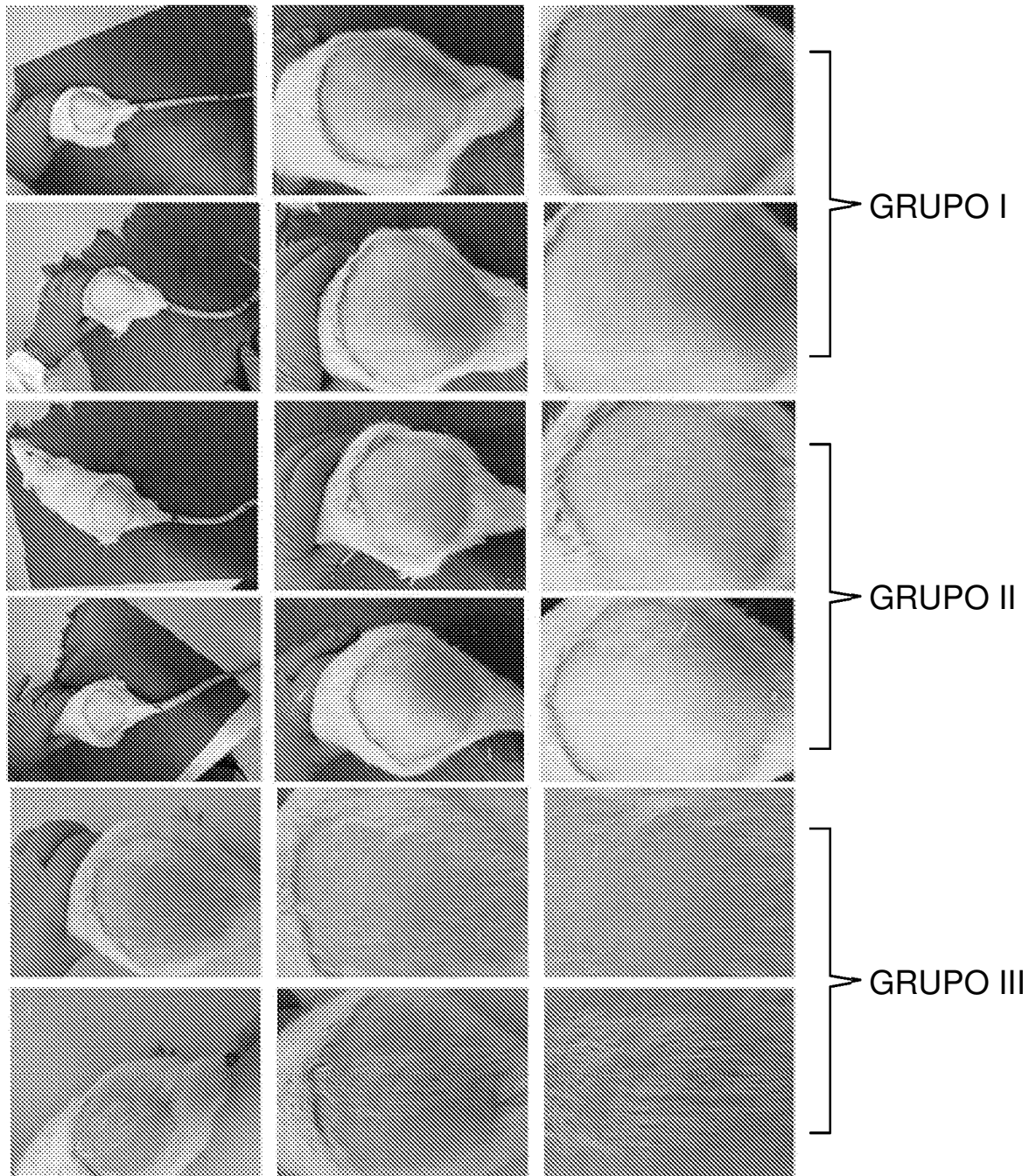


FIG.7

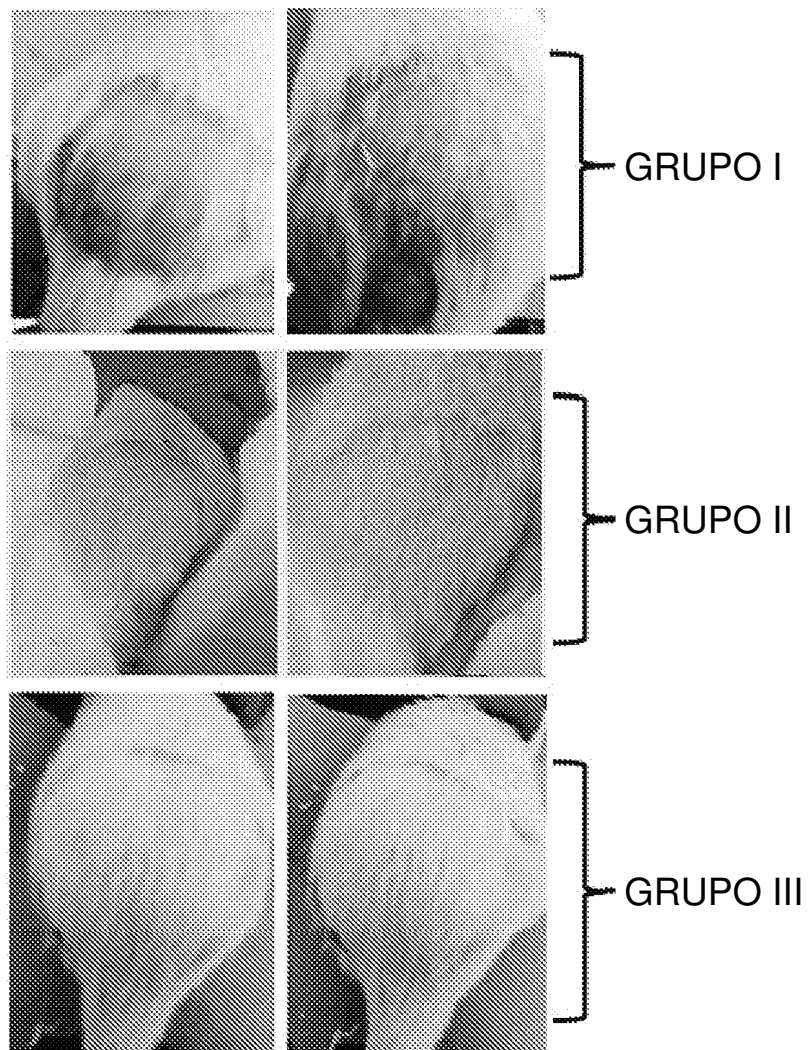


FIG.8

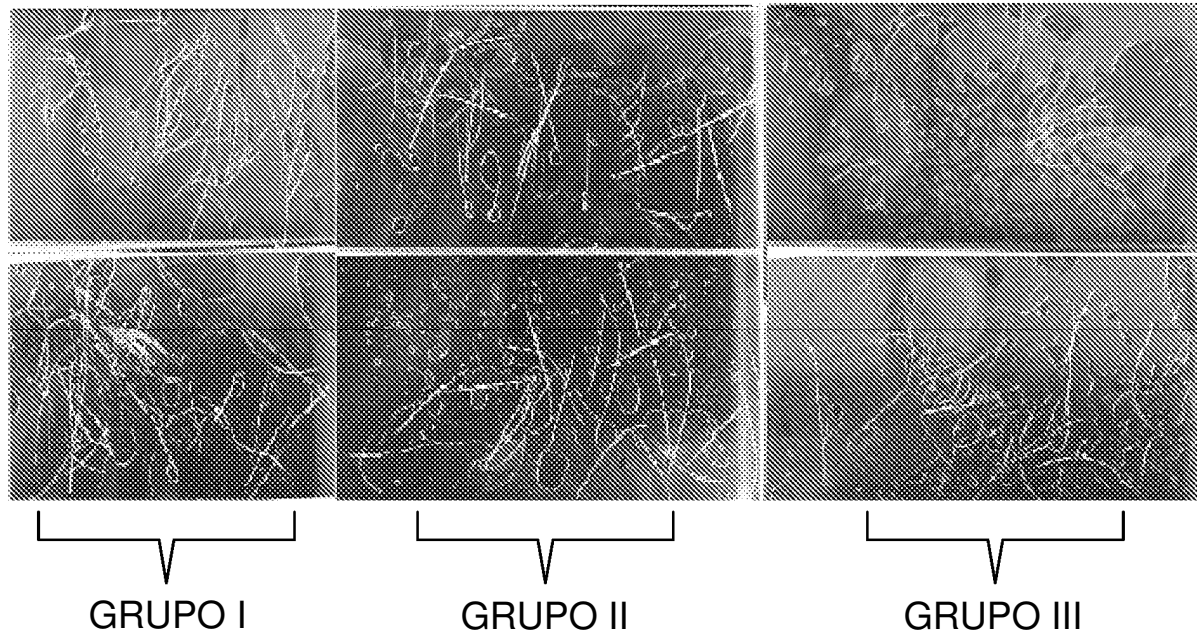


FIG.9

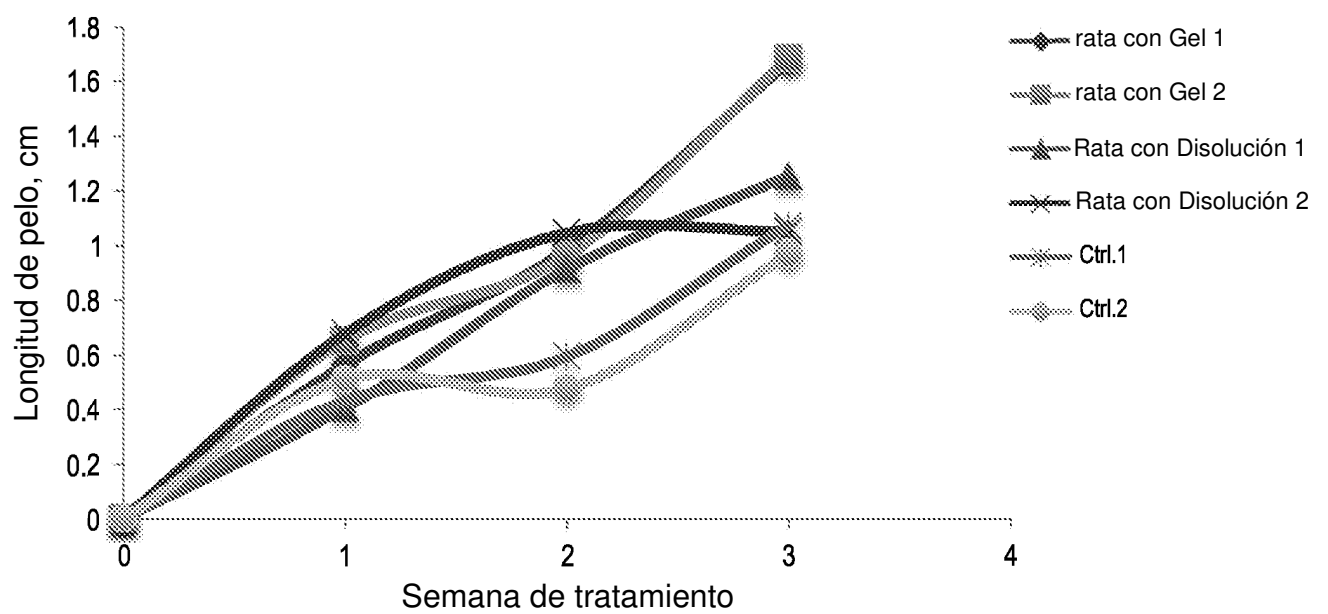
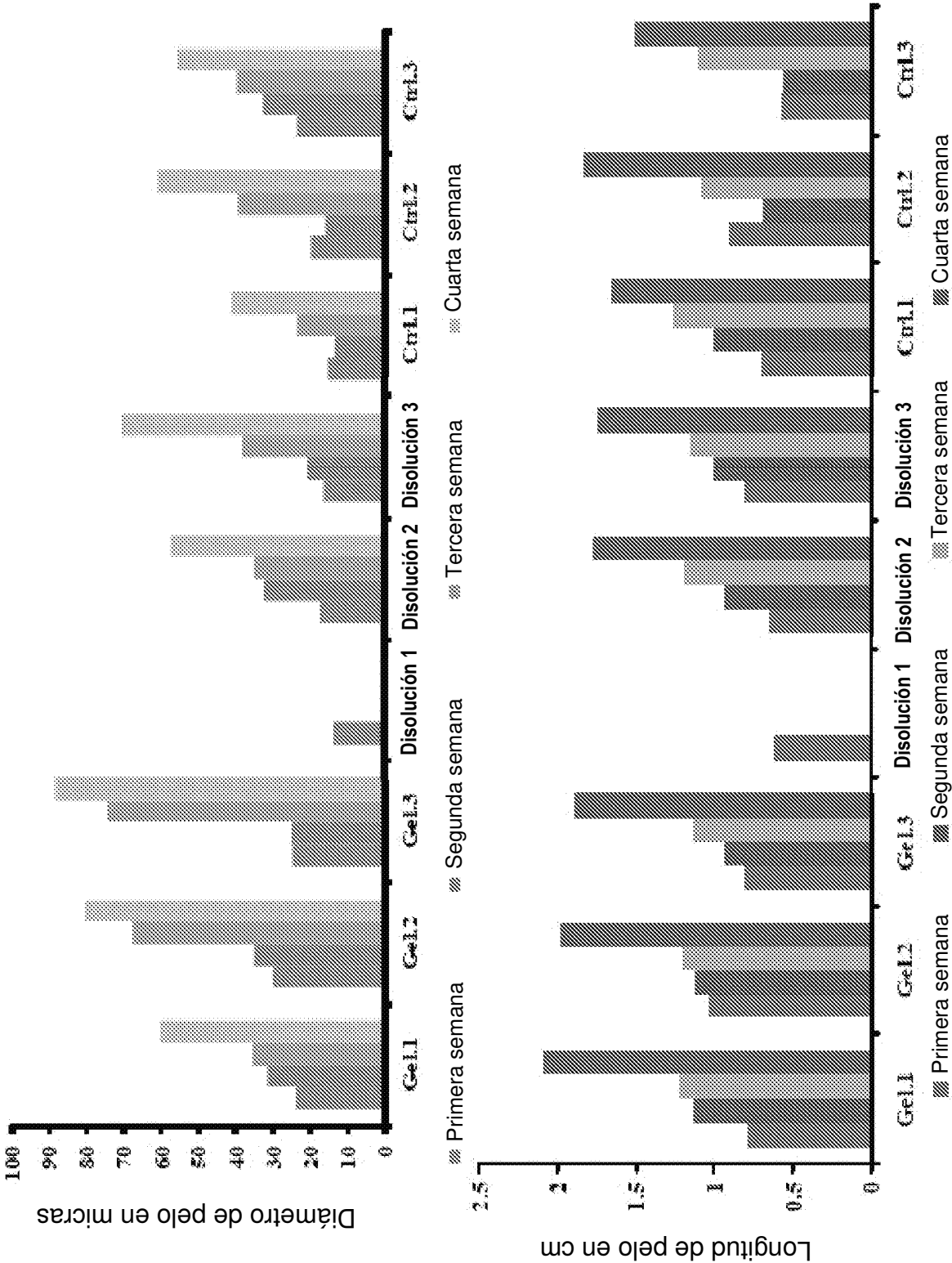
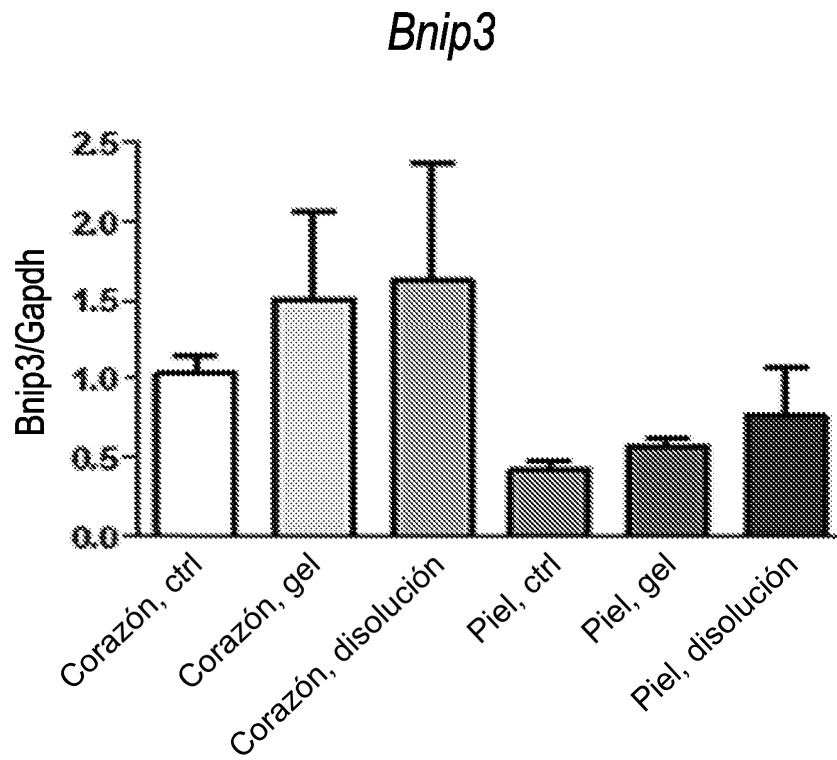


FIG.10

FIG.11



A



B

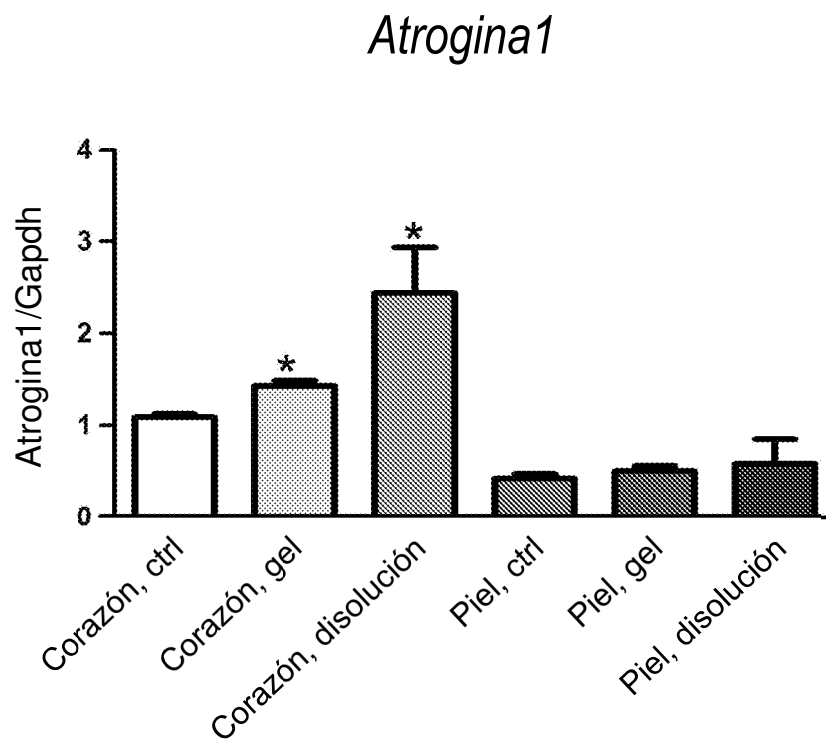


FIG.12

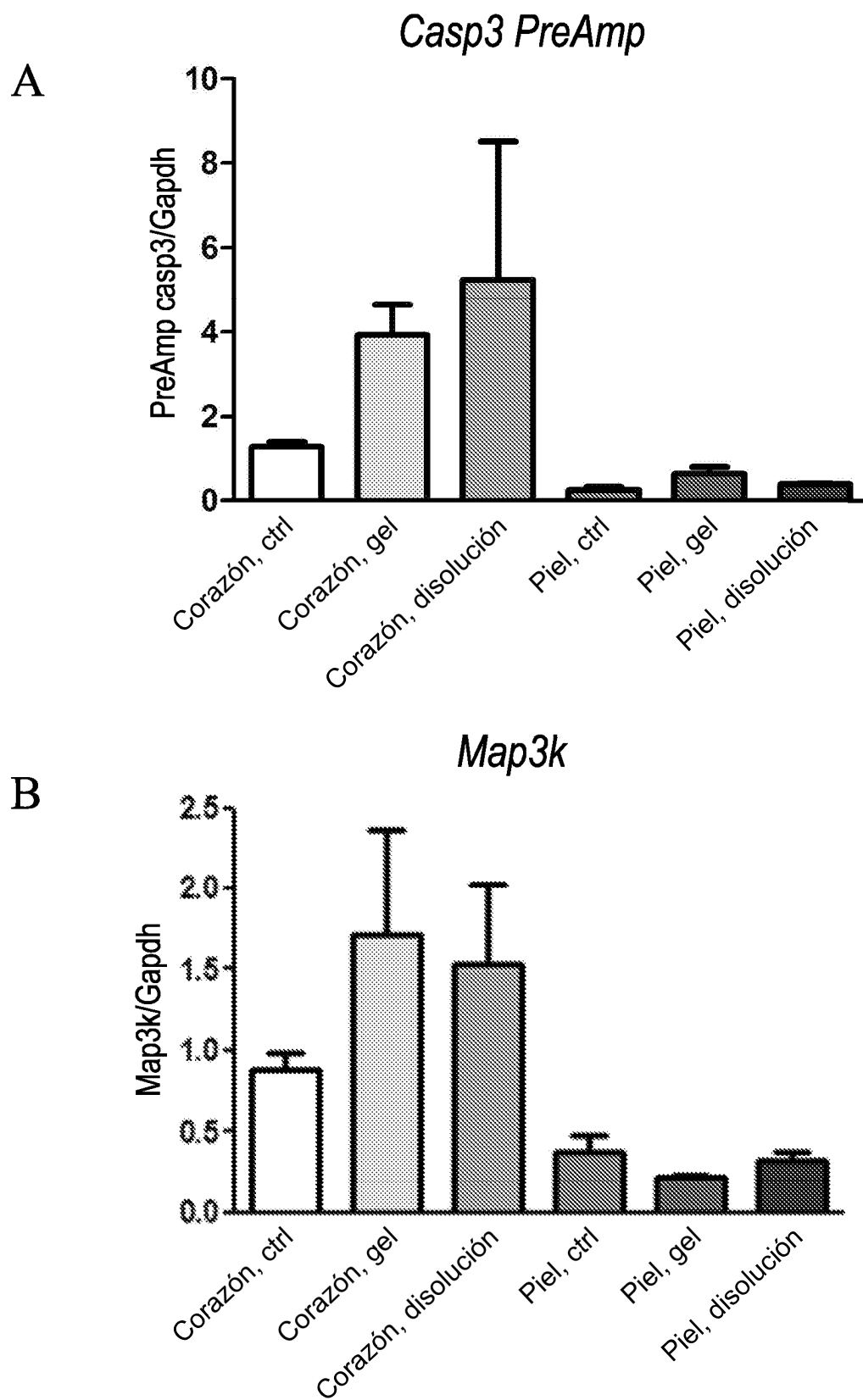


FIG.13

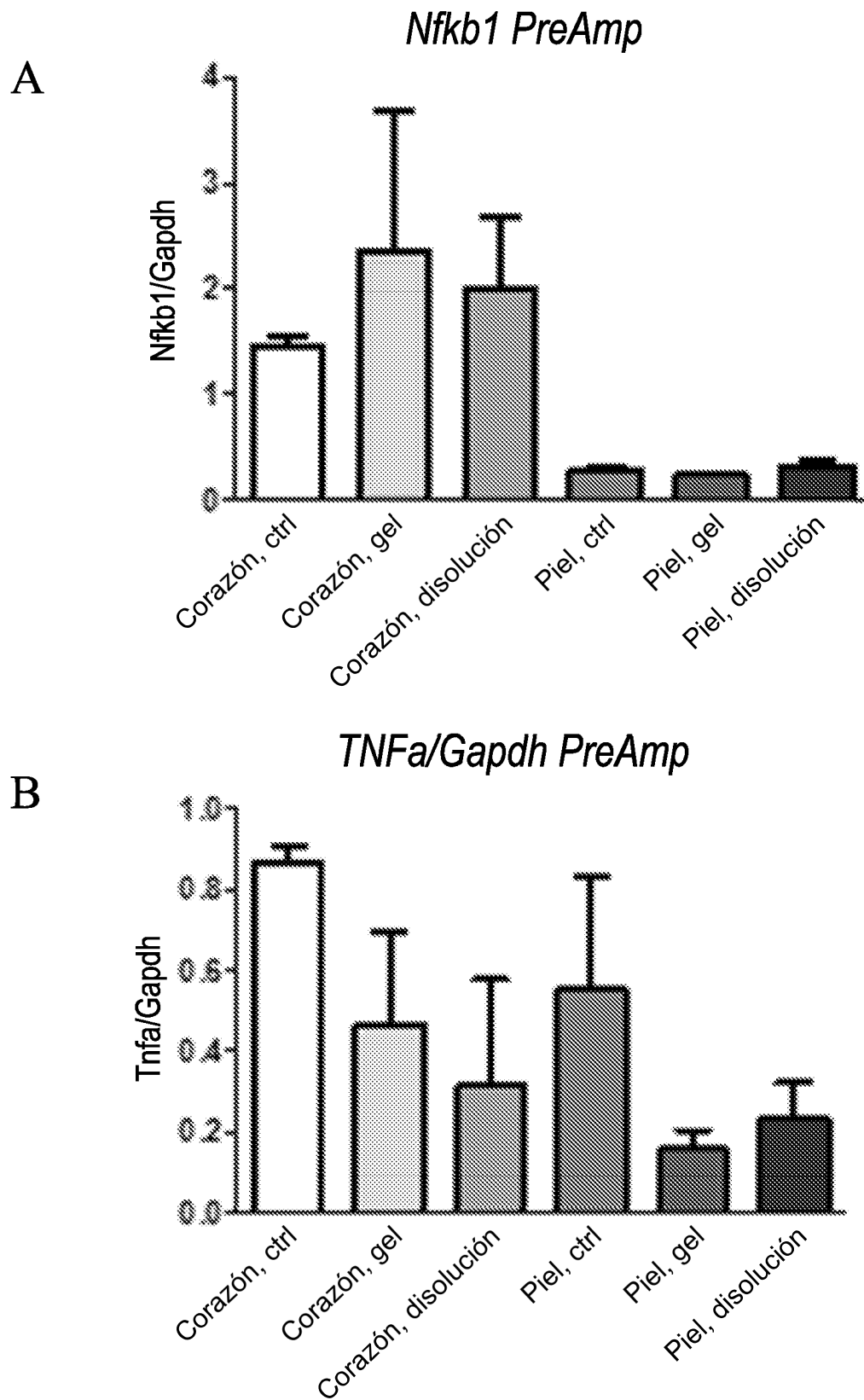


FIG.14

Diagrama de solubilidad de fases de MXD/HP β CD a 25 °C

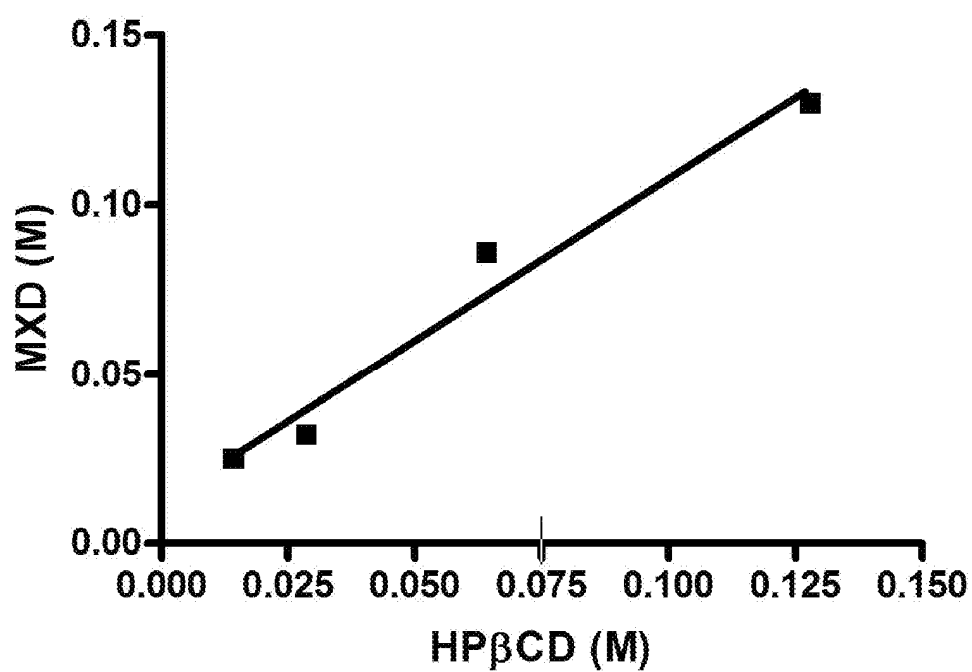


FIG.15