

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 332**

51 Int. Cl.:

A01N 65/00	(2009.01)
A61K 47/10	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A61K 47/38	(2006.01)
A61K 47/40	(2006.01)
A61K 47/44	(2006.01)
A61K 31/05	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.01.2006 PCT/US2006/002806**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2006 WO06081363**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2006 E 06733931 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 1848278**

54 Título: **Formulaciones orales para la administración de butanos catecólicos incluyendo compuestos de NDGA**

30 Prioridad:

27.01.2005 US 647495 P
27.01.2005 US 647648 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2017

73 Titular/es:

ERIMOS PHARMACEUTICALS LLC (100.0%)
9600 Bellaire Blvd., Suite 228
Houston, TX 77036, US

72 Inventor/es:

LOPEZ, ROCIO ALEJANDRA;
BLOMBERG, JESSICA ANDREA LODUCA;
RHODES, MELISSA CLAIRE;
HELLER, JONATHAN DANIEL y
GOODMAN, AMANDA BETH

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 606 332 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

Formulaciones orales para la administración de butanos catecólicos incluyendo compuestos de NDGA

Esta solicitud se refiere a una composición para la administración oral a un animal que comprende tetra-O-metil-NDGA. La solicitud también se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, cáncer u otras enfermedades proliferativas o inflamatorias, enfermedades metabólicas o enfermedades neurodegenerativas.

Los butanos catecólicos tales como ácido nordihidroguayarático ("NDGA") se han sometido a prueba para determinar sus aplicaciones terapéuticas en animales de experimentación mediante inyección intratumoral o aplicación tópica de tales compuestos. Por ejemplo, Jordan *et al.* en el documento US 5.008.294 describieron el efecto de NDGA sobre carcinoma de mama humano, MX-1, que se implantó por vía subcutánea en ratones en el día 0 (ejemplo 2). A los ratones que contenían tumores se les inyectaron diversas dosis de NDGA en el día 1, en una inyección intratumoral individual. En otro experimento, Jordan *et al.* inyectaron un adenocarcinoma de mama humano, MX-1, por vía intradérmica en ratones y trataron a los animales mediante aplicación tópica de NDGA después del día 23 (ejemplo 7).

Huang *et al.* describieron las pruebas de determinados derivados de NDGA (es decir, "derivados de NDGA") en el documento US 6.214.874. En un experimento, se les inyectó a los ratones una línea celular inmortal de ratón, células C3, y se trataron mediante inyección intratumoral con M₄N solo o en combinación con G₄N, siendo ambos derivados de NDGA.

El documento WO9917761 (A1) da a conocer formulaciones que comprenden ácido nordihidroguayarático (NDGA) y un vehículo anfífilo para reducir los niveles de triglicéridos, ácido graso libre o glicerol en suero en animales.

El documento WO9815184 (A1) da a conocer un agente terapéutico no tóxico que tiene actividad farmacológica que comprende un extracto concentrado producido extrayendo material vegetal de *Larrea tridentata* y añadiendo un agente reductor tal como ácido ascórbico para reducir la quinona de NDGA tóxica, que se produce de manera natural en el material vegetal, al propio NDGA.

Sería deseable si se descubriese una formulación oral de estos compuestos anticancerígenos que pudiese permitir una administración más fácil, especialmente autoadministración sin necesidad de hospitalización. La presente invención proporciona estos beneficios deseables.

Por tanto, uno de los objetos de la presente invención es proporcionar una o más formulaciones orales de butanos catecólicos y/o compuestos de NDGA novedosas, tales como derivados de NDGA, para el tratamiento de enfermedades mediante la administración oral de tales formulaciones a sujetos que necesitan tal tratamiento.

Otro de los objetos es proporcionar formulaciones como anteriormente que son seguras y tienen pocos efectos secundarios adversos cuando se administran a animales, incluyendo seres humanos.

Otro de los objetos es proporcionar formulaciones tales como una o más de las anteriores que tienen un periodo de estabilidad comercialmente razonable.

Otro de los objetos es proporcionar formulaciones tales como una o más de las anteriores que tienen una semivida en circulación comercialmente razonable tras la administración a animales.

Según los uno o más objetos anteriores de la invención, se proporcionan realizaciones de la presente invención tal como se ejemplifica a continuación:

La presente invención se refiere a una composición para la administración oral a un animal que comprende un principio activo farmacéutico y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que el principio activo farmacéutico comprende tetra-O-metil-NDGA, y el portador comprende polietilenglicol, una ciclodextrina y opcionalmente al menos uno de un agente de solubilización y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en: (a) un disolvente orgánico soluble en agua distinto de DMSO; siempre que cuando el disolvente orgánico soluble en agua sea propilenglicol, el propilenglicol esté en ausencia de vaselina blanca, en ausencia de goma xantana y en ausencia de al menos uno de glicerina o glicina, cuando el disolvente orgánico soluble en agua sea polietilenglicol, el polietilenglicol esté presente en ausencia de ácido ascórbico o hidroxitolueno butilado, y cuando el polietilenglicol sea polietilenglicol 400, el polietilenglicol 400 esté presente en ausencia de polietilenglicol 8000; (b) un tensioactivo iónico, no iónico o anfipático, siempre que cuando el tensioactivo sea un tensioactivo no iónico, el tensioactivo no iónico esté presente en ausencia de goma xantana; (c) una celulosa modificada; (d) un lípido insoluble en agua, siempre que cuando el lípido insoluble en agua sea aceite de ricino, el aceite de ricino esté presente en ausencia de cera de abejas o cera de carnauba; y una combinación de cualquiera de los portadores (a) - (d).

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición de la invención.

En otra realización, la presente invención se refiere a la composición de la invención para su uso en el tratamiento

de una enfermedad proliferativa, hipertensión, obesidad, diabetes, una enfermedad del sistema nervioso central, una enfermedad neurodegenerativa, dolor, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, demencia, enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, una enfermedad inflamatoria, neoplasia premaligna, displasia o una infección.

- 5 En otra realización, la presente invención se refiere a un kit que comprende la composición de la invención e instrucciones para el uso del mismo.

Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

- 10 El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se comprenderán mejor cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones que se prefieren actualmente.

En los dibujos:

- 15 La figura 1 comprende las figuras 1A y 1B y representa los resultados de ensayos de proliferación celular realizados para la línea celular C-33A y la línea celular HeLa tras tratamiento con M₄N. La figura 1A es una representación gráfica de la razón del número de células presentes tras el tratamiento con M₄N con respecto al número de células presentes en ausencia de tratamiento con M₄N, en donde M₄N se proporcionó en cantidades que variaban desde 0 μM hasta 80 μM en una formulación de DMSO. La figura 1B es una representación gráfica de la razón del número de células presentes tras el tratamiento con M₄N con respecto al número de células presentes en ausencia de tratamiento con M₄N, en donde M₄N se proporcionó en cantidades que variaban desde 0 μM hasta 80 μM en una formulación de HP-β-CD/PEG (formulación de "CPE").

- 20 La figura 2 comprende las figuras 2A y 2B y es una representación gráfica de mediciones de muerte celular basándose en el porcentaje células muertas para células C-33A y células HeLa en ausencia o presencia de concentraciones variables de M₄N en una formulación de DMSO (figura 2A) o en una formulación de HP-β-CD/PEG (figura 2B). Las concentraciones de M₄N variaban desde 0 μM hasta 80 μM.

- 25 La figura 3 es un histograma que muestra la absorción de M₄N en ratas Sprague-Dawley a puntos de tiempo de 0,5 h, 1 h, 2 h y 3 h tras la administración oral de una única dosis de 500 mg/kg de M₄N en diferentes agentes de solubilización líquidos y/o excipientes ("portador"). M₄N estaba presente a una concentración de aproximadamente 60 mg/ml en todos los portadores. Los portadores incluyen: (a) HP-β-CD (500 mg/ml) + HPMC (5 mg/ml); (b) HP-β-CD (500 mg/ml) + CMC (5 mg/ml); (c) TPGS (200 mg/ml); (d) TPGS (100 mg/ml) + PEG 400 (50% en v/v); (e) Tween® 20; (f) PEG 400 (50% en v/v) + Tween® 20 (50% en v/v); (g) PEG 400 (33% en v/v) + Tween® 20 (33% en v/v); (h) aceite de menta piperita (33%); (i) aceite de menta piperita (50%) + PEG 400 (50% en v/v); (j) aceite de menta piperita (50%) + Tween® 20 (50% en v/v); (k) aceite de menta piperita (50%) + aceite de sésamo (50%).

- 35 La figura 4 es una representación gráfica de la absorción de M₄N por perros Beagle a puntos de tiempo de 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h tras la administración oral de una única dosis de 100 mg/kg de M₄N en forma de polvo o en diferentes portadores sólidos, tal como sigue: (a) polvo de M₄N; (b) HP-β-CD liofilizado (81%) + M₄N (185 mg/g); (c) TPGS (20%) + M₄N (133 mg/g); (d) aceite de soja (95%) + cera de abejas (5%) + M₄N (200 mg/g); y (e) aceite de oliva (95%) + cera de abejas (5%) + M₄N (200 mg/g).

- 40 La figura 5 comprende las figuras 5A y 5B y es una representación gráfica de absorción de M₄N no micronizado en monooleato de glicerol por perros Beagle a puntos de tiempo de 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h y 36 h tras la administración oral de una única dosis de 100 mg/kg. La figura 5A está a una escala no logarítmica. La figura 5B está a una escala logarítmica.

La figura 6 comprende las figuras 6A y 6B y es una representación gráfica de absorción de M₄N micronizado en monooleato de glicerol por perros Beagle a puntos de tiempo de 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h y 36 h tras la administración oral de una única dosis de 100 mg/kg. La figura 6A está a una escala no logarítmica. La figura 6B está a una escala logarítmica.

- 45 La figura 7 comprende las figuras 7A y 7B y es una representación gráfica de niveles en suero de M₄N en diversos portadores a diversas concentraciones por perros Beagle macho a puntos de tiempo de 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h y 36 h tras la administración oral de una única dosis oral de 75 mg/kg. Las abreviaturas del portador usado, concentración de M₄N administrada, y una indicación de si la administración era a perros que ayunaron o que se alimentaron se muestran mejor en la figura 7B. La figura 7A presenta los datos a una escala no logarítmica. La figura 7B presenta los datos a una escala logarítmica.

- 50 La figura 8 comprende las figuras 8A y 8B y es una representación gráfica de niveles en suero de M₄N en diversos portadores a diversas concentraciones por perros Beagle hembra a puntos de tiempo de 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h, 24 h y 36 h tras la administración oral de una única dosis oral de 75 mg/kg. Las abreviaturas del portador usado, concentración de M₄N administrada, y una indicación de si la administración era a perros que ayunaron o que se alimentaron se muestran mejor en la figura 8B. La figura 8A presenta los datos a una escala no logarítmica. La figura 8B presenta los datos a una escala logarítmica.

La presente invención proporciona una composición novedosa, un kit y composición para su uso en el tratamiento de enfermedades, incluyendo enfermedades proliferativas tales como cáncer y psoriasis, hipertensión, obesidad, diabetes, tipo I o tipo II, enfermedades del sistema nervioso central o trastornos neurodegenerativos incluyendo dolor, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, y enfermedad inflamatoria, neoplasia premaligna o displasia, infección incluyendo infecciones virales tales como VIH, VLTH, VPH, VHS, VHB, VEB, varicela-zoster, adenovirus, parvovirus, virus de CJ u otros. Las enfermedades incluyen enfermedades proliferativas tales como cáncer y psoriasis, hipertensión, obesidad, diabetes tipo I o tipo II, enfermedades del sistema nervioso central o enfermedades neurodegenerativas incluyendo dolor, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, demencia, accidente cerebrovascular, y enfermedad inflamatoria, neoplasia premaligna o displasia, infección incluyendo infecciones virales tales como virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"), virus linfotrópico de células T humanas ("VLTH), virus del papiloma humano ("VPH"), virus de herpes simple ("VHS"), virus de la hepatitis B ("VHB"), virus de Epstein-Barr ("VEB"), varicela-zoster, adenovirus, parvovirus, virus de Creutzfeldt-Jakob ("virus de CJ") u otros.

La presente invención proporciona una composición novedosa que contiene tetra-O-metil-NDGA que se disuelve en determinados agentes de solubilización farmacéuticamente aceptables, que junto con otros diluyentes, excipientes y similares (de manera colectiva, "portador") constituyen formulaciones apropiadas para su administración a sujetos, tales como seres humanos, para el tratamiento de enfermedades. Tales formulaciones son adecuadas para la administración oral. Un portador farmacéuticamente aceptable adecuado incluye al menos uno seleccionado de: (a) un disolvente orgánico soluble en agua distinto de DMSO, tal como polietilenglicol ("PEG"), por ejemplo, PEG 300, PEG 400 o monolaurato de PEG 400, propilenglicol ("PG"), polivinilpirrolidona ("PVP"), etanol, alcohol bencílico o dimetilacetamida; (b) un tensioactivo iónico, no iónico o anfipático, tal como monolaurato de polioxietileno-sorbitano (también conocido como polisorbato), que es un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80, disponible comercialmente como Tween® 20 o Tween® 80, succinato de d-alfa-tocoferil-polietilenglicol 1000 ("TPGS"), monooleato de glicerol (también conocido como monooleato de glicerilo), un ácido graso esterificado o un producto de reacción entre óxido de etileno y aceite de ricino en una razón molar de 35:1, disponible comercialmente como Cremophor® EL; (c) una celulosa modificada, tal como etilcelulosa ("EC"), hidroxilpropilmetilcelulosa ("HPMC"), metilcelulosa ("MC") o carboximetilcelulosa ("CMC"); y (d) un lípido insoluble en agua, tal como una cera, aceite o una emulsión de grasa, por ejemplo Intralipid®. La ciclodextrina puede ser una ciclodextrina no modificada o una ciclodextrina modificada tal como hidroxipropil-β-ciclodextrina ("HP-β-CD") o sulfobutil éter-β-ciclodextrina ("SBE-β-CD").

En una realización de la invención, los compuestos en el presente documento se disuelven o disuelven y diluyen en diferentes portadores para formar una composición líquida oral para su administración a animales. Por ejemplo, en un aspecto de la realización, el presente compuesto de principio activo farmacéutico ("API") se solubiliza y/o diluye en una formulación de combinación que contiene un compuesto de PEG y HP-β-CD.

Aún en otra realización, los compuestos en el presente documento se disuelven en tensioactivos iónicos, no iónicos o anfipáticos tales como Tween® 20, Tween® 80, TPGS o un ácido graso esterificado. Por ejemplo, los presentes compuestos pueden disolverse en TPGS solo, o Tween® 20 solo, o en combinaciones tales como TPGS y PEG 400, o Tween® 20 y PEG 400.

En una realización adicional, los presentes compuestos se disuelven en un lípido insoluble en agua tal como una cera, emulsión de grasa, por ejemplo Intralipid®, o aceite. Por ejemplo, los presentes compuestos pueden disolverse en aceite de menta piperita solo, o en combinaciones de aceite de menta piperita con Tween® 20 y PEG 400, o aceite de menta piperita con PEG 400, o aceite de menta piperita con Tween® 20, o aceite de menta piperita con aceite de sésamo.

Por supuesto, puede sustituirse o añadirse etilcelulosa en lugar de la HPMC o CMC en los ejemplos anteriores; puede sustituirse o añadirse PEG 300 o monolaurato de PEG 400 en lugar de PEG 400 en los ejemplos anteriores; puede sustituirse o añadirse Tween® 80 en lugar de Tween® 20 en los ejemplos anteriores; y puede sustituirse o añadirse otros aceites tales como aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite mineral o glicerol, en lugar del aceite de menta piperita o aceite de sésamo en los ejemplos anteriores.

Además, puede aplicarse calentamiento, por ejemplo, calentamiento hasta una temperatura de aproximadamente 30°C a aproximadamente 90°C, en el transcurso de la formulación de cualquiera de estas composiciones para lograr la disolución de los compuestos en el presente documento o para obtener una suspensión uniformemente distribuida de los presentes compuestos.

En una realización, los compuestos en el presente documento se disuelven en primer lugar en un portador líquido como en los ejemplos anteriores, y posteriormente se preparan para dar una composición sólida para su administración como una composición oral.

En una realización adicional, los presentes compuestos se disuelven o suspenden en una disolución de TPGS, con calentamiento según sea apropiado para obtener una disolución o suspensión uniformemente distribuida. Tras enfriarse, la composición se vuelve cremosa y es adecuada para la administración oral.

Aún en otra realización, los presentes compuestos se disuelven en aceite y se añade cera de abejas para producir una composición sólida cérea.

Incluso aún en una realización adicional de la invención, los compuestos en el presente documento se solubilizan en celulosas modificadas tales como EC. Las celulosas modificadas tales como etilcelulosa pueden diluirse en etanol ("EtOH") antes de su uso.

La presente invención también proporciona lípidos insolubles en agua como solubilizantes para los presentes compuestos. Los lípidos insolubles en agua incluyen, por ejemplo, aceites así como composiciones de emulsión de grasa mixtas tales como Intralipid® (Pharmacia & Upjohn, ahora Pfizer), usado según la recomendación del fabricante. Por ejemplo, la dosificación para adultos se recomienda que no exceda los 2 g de grasa/kg de peso corporal/día (20 ml, 10 ml y 6,7 ml/kg de Intralipid® al 10%, al 20% y al 30%, respectivamente). Se cree que Intralipid® al 10% contiene en 1.000 ml: 100 g de aceite de soja purificado, 12 g de fosfolípidos de huevo purificados, 22 g de glicerol anhidro, agua para inyección c.s.p. 1.000 ml. El pH se ajusta con hidróxido de sodio hasta pH de aproximadamente 8. Intralipid® al 20% contiene en 1.000 ml: 200 g de aceite de soja purificado, 12 g de fosfolípidos de huevo purificados, 22 g de glicerol anhidro, agua para inyección c.s.p. 1.000 ml. El pH se ajusta con hidróxido de sodio hasta pH de aproximadamente 8. Intralipid® al 30% contiene en 1.000 ml: 300 g de aceite de soja purificado, 12 g de fosfolípidos de huevo purificados, 16,7 g de glicerol anhidro, agua para inyección c.s.p. 1.000 ml. El pH se ajusta con hidróxido de sodio hasta pH de aproximadamente 7,5. Estos productos Intralipid® se almacenan a temperatura ambiente controlada por debajo de 25°C y no deben congelarse.

En general, en la preparación de las formulaciones orales, los compuestos en el presente documento se solubilizan en primer lugar antes de que se añadan otros excipientes de modo que se produzcan composiciones de mayor estabilidad. Las formulaciones inestables no son deseables. Las formulaciones líquidas inestables forman frecuentemente precipitados cristalinos o disoluciones bifásicas. Las formulaciones sólidas inestables frecuentemente parecen granulosas y grumosas y a veces contienen líquidos fluidos. Una formulación sólida óptima parece suave, homogénea, y tiene un pequeño intervalo de temperatura de fusión. En general, las proporciones de excipientes en la formulación pueden influir en la estabilidad. Por ejemplo, demasiado poco agente espesante tal como cera de abejas puede dejar la formulación demasiado fluida.

Por tanto, en general, para las formulaciones líquidas de la presente invención, los excipientes usados deben ser buenos disolventes del API M₄N. En otras palabras, los excipientes deben poder disolver el API sin calentamiento. Los excipientes también deben ser compatibles entre sí independiente del API de manera que puedan formar una disolución, suspensión o emulsión estable. Además, en general, para las formulaciones sólidas de la presente invención, los excipientes usados también deben ser buenos disolventes del API para evitar grumos y formulaciones no uniformes. Para evitar formulaciones sólidas que tienen una textura demasiado fluida o heterogénea, que no son deseables, los excipientes deben ser compatibles entre sí de manera que formen un sólido homogéneo suave, incluso en ausencia del API.

Los términos usados en el presente documento tienen su significado de diccionario común y tal como se usa por los expertos en la técnica a menos que se disponga lo contrario. En particular, la presente invención puede entenderse mejor a la luz de las siguientes definiciones, que se usan con otros términos tal como se definen en otra parte en el presente documento:

El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento en referencia a una concentración o dosis significa el número especificado hasta \pm del 10% al 20%.

El término "principio activo farmacéutico," "API" o la referencia a los "compuestos" en el presente documento significa tetra-O-metil-NDGA.

El "tampón" adecuado para su uso en el presente documento incluye cualquier tampón convencional en la técnica, tal como, por ejemplo, Tris, fosfato, imidazol y bicarbonato.

Un "portador" tal como se usa en el presente documento se refiere a una carga, un diluyente, un vehículo, un excipiente, un agente de solubilización, un material de encapsulación o agente auxiliar de formulación de cualquier tipo convencional, sólido, semisólido o líquido no tóxico, y abarca todos los componentes de la composición distintos del principio activo farmacéutico. El portador puede contener agentes adicionales tales como agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Otros materiales tales como antioxidantes, humectantes, estabilizadores de la viscosidad, y agentes similares pueden añadirse según sea necesario.

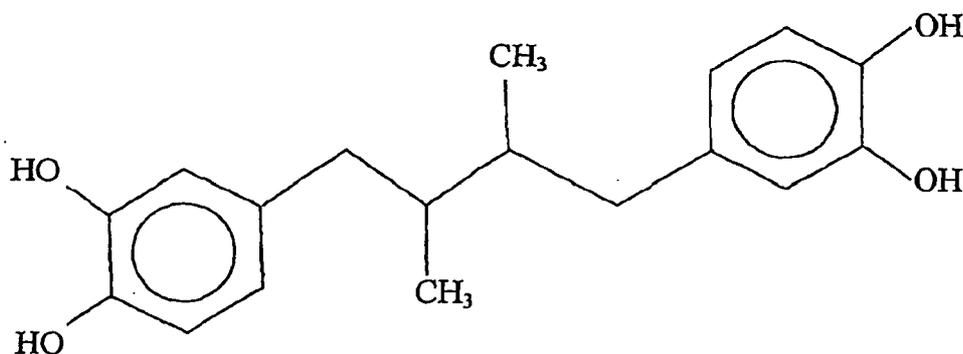
Una "ciclodextrina" tal como se usa en el presente documento significa una ciclodextrina no modificada o una ciclodextrina modificada, e incluye α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina y cualquier ciclodextrina modificada que contenga modificaciones en la misma, tal como HP- β -CD o SBE- β -CD. La ciclodextrina tiene normalmente 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina) y 8 (γ -ciclodextrina) azúcares, hasta tres sustituciones por azúcar, y por tanto son posibles de 0 a 24 sustituciones primarias (las sustituciones primarias se definen como sustituciones conectadas directamente al anillo de ciclodextrina). Las ciclodextrinas modificadas o no modificadas usadas en la presente invención pueden tener cualquier número y ubicación apropiados de sustituciones primarias u otras modificaciones.

El término "enfermedad" tal como se usa en el presente documento incluye todas las enfermedades, estados, infecciones, síndromes o trastornos para los que la aplicación de la presente composición produce un efecto terapéutico. Tal "enfermedad" incluye por ejemplo, cáncer, psoriasis y otras enfermedades proliferativas, trastornos inflamatorios incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica ("EPOC"), hipertensión, obesidad, diabetes, dolor, accidente cerebrovascular y/u otros trastornos neuronales o enfermedades o estados neurodegenerativos, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica ("ELA") y estados premalignos tales como neoplasia intraepitelial o displasia, y enfermedades infecciosas.

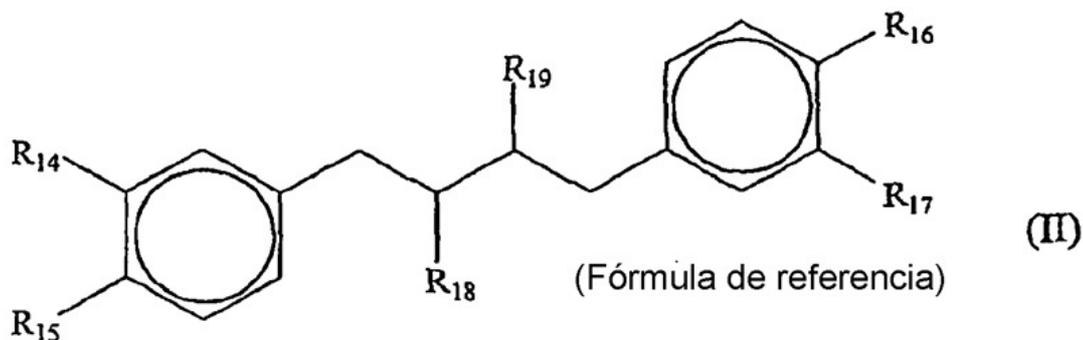
"M₄N" o "tetra-O-metil-NDGA" tal como se usa en el presente documento es un derivado de NDGA de fórmula II en la que R₁₄, R₁₅, R₁₆ y R₁₇ representan cada uno independientemente -OCH₃, y R₁₈ y R₁₉ son cada uno -CH₃.

Una "celulosa modificada" tal como se usa en el presente documento significa una celulosa que contiene una o más modificaciones en la molécula de celulosa e incluye, por ejemplo EC, HPMC, CMC y MC.

"NDGA" tal como se usa en el presente documento significa ácido nordihidroguayarático y tiene la siguiente fórmula:



"Derivado de NDGA" tal como se usa en el presente documento significa un derivado de NDGA que tiene una fórmula II



Tal como se usa en el presente documento, "por ciento", "porcentaje" o el símbolo "%" significa el tanto por ciento del componente indicado en la composición basándose en la cantidad del portador presente en la composición, en peso/peso (p/p), peso/volumen (p/v) o volumen/volumen (v/v), tal como se indica con respecto a cualquier componente particular, todos basándose en la cantidad del portador presente en la composición. Por tanto, pueden estar presentes diferentes tipos de portadores en una cantidad de hasta el 100% tal como se indica, lo cual no excluye la presencia del API, cuya cantidad puede indicarse como un % o como un determinado número de mg presentes en la composición o un determinado número de mg/g presentes, o un determinado número de mg/ml presentes, en los que el %, o mg/g, o mg/ml se basan en la cantidad del portador total presente en la composición. Determinados tipos de portadores pueden estar presentes en combinación para constituir el 100% del portador.

Un "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento no es tóxico para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y es compatible con otros componentes de la formulación. Por ejemplo, el portador para una formulación que contiene tetra-O-metil-NDGA, preferiblemente no incluye agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para el mismo. Un portador farmacéuticamente aceptable comprende un agente de solubilización. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, agua, dextrosa, glicerol, solución salina, etanol, tampón, Cremaphor® EL, solución salina tamponada con fosfato, PEG 300, PEG 400, ciclodextrina modificada y combinaciones de los mismos, todos tal como se expusieron anteriormente.

El término "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye vehículos, adyuvantes o diluyentes u otras sustancias auxiliares, tales como las convencionales en la técnica, que están fácilmente disponibles para el público, y que no

son tóxicas para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y son compatibles con otros componentes de la formulación. Por ejemplo, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables incluyen agentes tamponantes y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores y agentes humectantes.

5 El término “agente de solubilización” tal como se usa en el presente documento significa una composición en la que se disuelve tetra-O-metil-NDGA. Un agente de solubilización también puede ser un portador o un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Los términos “sujeto”, “huésped” y “paciente”, se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un animal que está tratándose con las presentes composiciones, incluyendo, simios, seres humanos, felinos, cánidos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales mamíferos de granja, animales mamíferos para el deporte y mascotas mamíferas.

15 Un compuesto “sustancialmente purificado” en referencia a los butanos catecólicos o derivados de NDGA tal como se usa en el presente documento es uno que está sustancialmente libre de materiales que no son el butano catecólico, compuestos de NDGA o derivados de NDGA (de manera colectiva, “materiales que no son NDGA”). Por sustancialmente libre quiere decirse libre al menos aproximadamente al 50% de materiales que no son NDGA, preferiblemente libre al menos aproximadamente al 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente al 80%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente al 90% y todavía más preferiblemente libre al menos aproximadamente al 95% de materiales que no son NDGA.

20 Tal como se usan en el presente documento, los términos “tratamiento”, “tratar”, y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a prevenir completa o parcialmente un estado o una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en cuanto a la curación parcial o completa para un estado o una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible al estado o la enfermedad. El “tratamiento” de un sujeto cubre, por ejemplo, cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluye: (a) impedir que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir el desarrollo o la progresión de la enfermedad, tal como, detener su desarrollo; y (c) aliviar, paliar o mejorar la enfermedad, tal como, por ejemplo, provocar la regresión o remisión de la enfermedad.

30 Cuando se proporciona un intervalo de valores, debe entenderse que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, se abarcan dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también quedan abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

35 Debe observarse que tal como se usa en el presente documento, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un compuesto” incluye una pluralidad de tales compuestos.

Las citas a referencias mencionadas en el texto de esta solicitud se identifican más completamente en la bibliografía que precede a las reivindicaciones.

40 Tetra-O-metil-NDGA, también conocido como meso-1,4-bis(3,4-dimetoxifenil)-2,3-dimetilbutano, o M₄N, se prepara tal como sigue: se prepara una disolución que contiene NDGA e hidróxido de potasio en metanol en un matraz de reacción. Entonces se añade sulfato de dimetilo al matraz de reacción y se permite que la reacción avance. Finalmente se extingue la reacción con agua, provocando que el producto precipite. Se aísla el precipitado mediante filtración y se seca en un horno a vacío. Entonces se disuelve el compuesto en una disolución de cloruro de metileno y tolueno y posteriormente se purifica mediante una columna de alúmina. Se eliminan los disolventes mediante evaporación rotatoria y se resuspende el sólido en isopropanol y se aísla mediante filtración. Se seca la torta de filtro en un horno a vacío. Se cristaliza el tetra-O-metil-NDGA (M₄N) resultante sometiendo a reflujo la torta de filtro en isopropanol y se vuelven a aislar los cristales mediante filtración.

Preparación de las composiciones terapéuticas

50 La presente invención proporciona composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden tetra-O-metil-NDGA, como principios activos farmacéuticos (“API”), y portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Normalmente, las composiciones de la presente invención contendrán desde menos de aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 99% del API; opcionalmente, la presente invención contendrá de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 90% del API.

55 La presente invención proporciona adicionalmente composiciones en las que M₄N está presente en concentraciones de 1 mg/ml a 200 mg/ml, o de 10 mg/ml a 175 mg/ml, o de 20 mg/ml a 150 mg/ml, o de 30 mg/ml a 125 mg/ml, o de 40 mg/ml a 100 mg/ml, o de 50 mg/ml a 75 mg/ml. En una realización, M₄N está presente en las composiciones en el presente documento a una concentración de 1 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml,

25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml 60 mg/ml 75 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 120 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml, 175 mg/ml o 200 mg/ml.

La presente invención proporciona adicionalmente composiciones en las que M₄N está presente en concentraciones en el intervalo de aproximadamente 1 mg/g a 250 mg/g, u opcionalmente de 20 mg/g a 200 mg/g, o de 40 mg/g a 180 mg/g, o de 60 mg/g a 160 mg/g, o de 80 mg/g a 130 mg/g, o de 50 mg/g a 100 mg/g. En una realización, los presentes compuestos están presentes en las composiciones en el presente documento a una concentración de 133 mg/g, 185 mg/g, 200 mg/g y 250 mg/g. Las cantidades a modo de ejemplo del API en la composición incluyen 20 mg/g, 50 mg/g, 75 mg/g 100 mg/g, 120 mg/g, 130 mg/g, 140 mg/g, 150 mg/g, 175 mg/g o 200 mg/g.

Expresado alternativamente, otras realizaciones de la composición de la presente invención pueden contener de menos de 0,1 mg a 200 mg o más del API, tal como 10 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 75 mg, 100 mg o 200 mg del API.

En una realización, la invención proporciona una composición según lo anterior que es una composición líquida que es adecuada para la administración oral. En otra realización, la invención proporciona una composición según lo anterior que es una composición sólida que también es adecuada para la administración oral.

Entre los disolventes orgánicos solubles en agua preferidos están etanol, alcohol bencílico, dimetilacetamida, PVP, PG y compuestos de PEG tales como: PEG 300, PEG 400, o monolaurato de PEG 400. El compuesto de PEG en las presentes composiciones se proporciona en una cantidad del 5% al 100%, o del 5% al 60%, o del 10% al 90%, o del 20% al 80%, o del 30% al 70%, o del 40% al 60%, siendo todas las concentraciones un porcentaje en volumen/volumen (v/v). PG puede estar presente a una concentración del 2,5% al 100% (v/v).

La concentración de los compuestos de PEG en las presentes composiciones puede variar dependiendo de qué otros solubilizantes o diluyentes o excipientes están también presentes. Por ejemplo, el PEG 300, PEG 400 o monolaurato de PEG 400 de la presente invención puede estar a una concentración del 5%, el 10%, el 12,5%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, o el 95%, facilitándose todas de tales concentraciones como porcentaje en volumen/volumen (v/v).

La presente invención también proporciona composiciones de tetra-O-metil-NDGA en una ciclodextrina, que incluye ciclodextrinas modificadas. Las ciclodextrinas en el presente documento pueden ser α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, y las ciclodextrinas modificadas pueden incluir HP- β -CD y SBE- β -CD, por ejemplo. En una realización, la presente composición contiene una ciclodextrina modificada en una concentración del 5% al 80%, o del 10% al 70%, o del 20% al 60%, o del 30% al 50%, facilitándose todas de tales concentraciones como porcentaje en peso/volumen (p/v).

Aún en otra realización, las ciclodextrinas modificadas, tales como HP- β -CD, están presentes en las composiciones a una concentración del 12,5%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70% o el 75%, facilitándose todas de tales concentraciones como porcentaje en peso/volumen (p/v).

Otro portador o excipiente farmacéuticamente aceptable que puede usarse solo o con otros en la composición de la presente invención es un tensioactivo iónico, no iónico o anfipático, tal como Cremophor® EL, polisorbatos, que son tensioactivos no iónicos, por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80, disponibles comercialmente como Tween® 20 o Tween® 80, TSGS, que es un tensioactivo anfipático, entre muchos otros. Los ejemplos adicionales de tensioactivos adecuados incluyen monooleato de glicerol y un ácido graso esterificado, tal como los que se producen normalmente mediante transesterificación de aceites vegetales, disponibles en varias calidades y variedades como Labrafil®, Labrasol® y Gelucire®, de Gattefosse Corp., Paramus, NJ, EE.UU. El tensioactivo puede estar presente en cualquier cantidad eficaz deseada, tal como a una concentración de aproximadamente el 1% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v), preferiblemente de aproximadamente el 9% (v/v) a aproximadamente el 80% (v/v), y más preferiblemente, de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 50% (v/v). Como ejemplos específicos, concentraciones preferidas de un tensioactivo no iónico son Tween® 20 a una concentración de aproximadamente el 9% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v) y Tween® 80 de aproximadamente el 33% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v). Todos los porcentajes del tensioactivo son porcentajes en volumen (v/v).

Otro portador o excipiente farmacéuticamente aceptable que puede usarse solo o con otros en la composición de la presente invención es una celulosa modificada, tal como EC, HPMC, MC y CMC. La celulosa modificada puede estar presente en cualquier cantidad eficaz deseada, tal como una concentración de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 25%, o de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 7,5%, o de aproximadamente el 1,0% a aproximadamente el 5%. Como ejemplos específicos, EC puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 20%; HPMC puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1%; MC puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 3%; y CMC puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 4%. Los porcentajes de celulosa modificada son en peso por volumen (p/v).

En otra realización, la presente invención proporciona una composición según lo anterior que contiene un compuesto

de PEG, tal como PEG 400, por ejemplo, y un tensioactivo, tal como Tween® 20, por ejemplo, como agente de solubilización y/o excipiente.

5 Otro portador o excipiente farmacéuticamente aceptable que puede usarse solo o con otros en la composición de la presente invención es un lípido insoluble en agua, tal como un aceite, emulsión de grasa o cera. Los portadores de lípido insoluble en agua pueden estar presentes en cualquier cantidad eficaz deseada, tal como una concentración de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 100%, o de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 85%, o de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 75%.

10 Los ejemplos de aceites incluyen aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de menta piperita, aceite de soja, aceite de semilla de sésamo, aceite mineral y glicerol. En una realización, el aceite está presente a una concentración de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v). Están disponibles composiciones de emulsión de grasa mixtas, tales como emulsión Intralipid®, tal como se describió anteriormente. En diversas realizaciones, las emulsiones de grasa mixtas pueden estar presentes a una concentración de aproximadamente el 10% (p/v) a aproximadamente el 30% (p/v); y preferiblemente de aproximadamente el 20% (p/v).

15 Ejemplos de ceras adecuadas son cera de abejas y cera de carnauba. En una realización, la cera está presente a una concentración de aproximadamente el 5% (p/p) a aproximadamente el 50% (p/p).

20 Los portadores insolubles en agua pueden usarse en combinación con cualquiera o más de los portadores solubles en agua, tales como compuestos de PEG y los tensioactivos, tales como Tween® 20 o Tween® 80. Como ejemplo adicional, la presente composición contiene una combinación de agente de solubilización y/o excipiente tal como, por ejemplo, aceite y tensioactivo, como aceite de menta piperita y Tween® 20 o aceite y un compuesto de PEG, tal como aceite de menta piperita y PEG 400.

En una realización adicional, la composición de la invención contiene aceite, un tensioactivo y un compuesto de PEG, tal como, por ejemplo, aceite de menta piperita, Tween® 20 y un compuesto de PEG 400.

25 Como ejemplo adicional, la presente composición incluye una combinación de aceites o aceite y cera, tal como, por ejemplo, aceite de menta piperita y aceite de sésamo, aceite de soja y cera de abejas o aceite de oliva y cera de abejas. La cera de abejas puede estar presente a una concentración en el intervalo de entre aproximadamente el 5% y el 50% (p/p).

Alternativamente, en otras realizaciones, Tween® 20 puede sustituirse por Tween® 80, y PEG 400 puede sustituirse por PEG 300 o monolaurato de PEG 400, y el aceite de menta piperita, aceite de soja y aceite de oliva pueden sustituirse por cualquiera de los aceites.

30 Aún otros excipientes incluyen monooleato de glicerol y diversos tipos de ácidos grasos esterificados, tales como los productos Labrafil®, Labrasol® y Gelucire®. Éstos normalmente se clasifican como tensioactivos o emulsionantes, pero los productos Labrasol® y Gelucire® también se usan como agentes que potencian la biodisponibilidad.

35 Labrafil®, y particularmente Labrafil® M 1944 CS, puede usarse como excipiente con un API, tal como M₄N, con el API disuelto en una concentración de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. El producto final puede ser una disolución, suspensión o sólido.

Labrasol® puede usarse como excipiente con un API, tal como M₄N, con el API disuelto en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. El producto final puede ser una disolución, suspensión o sólido.

40 Gelucire®, y particularmente Gelucire® 44/14, puede usarse como excipiente con un API, tal como M₄N, con el API disuelto en una concentración de aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. El producto final es un sólido.

Monooleato de glicerol puede usarse como excipiente con un API, tal como M₄N, con el API disuelto en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml. El producto final puede ser una disolución, suspensión o un sólido.

45 Pueden usarse combinaciones de los diversos componentes de portador con el API, tal como se indicó anteriormente. Un ejemplo de una realización de este tipo es una composición de M₄N 10 mg/ml en el 25% (p/v) de PEG 300, el 30% (p/v) de HP-β-CD, siendo el resto del portador "agua adecuada para inyección" en animales ("WFI", que designa una calidad reconocida de agua en la industria farmacéutica). En esta realización preferida, la HP-β-CD tiene de 6 a 8 grados de sustitución, pero otras sustituciones en otras realizaciones están bien dentro del alcance de esta invención, tal como se indicó anteriormente.

50 Aún otros excipientes y aditivos, tales como agentes que potencian la biodisponibilidad, pueden usarse en combinación con cualquiera de los portadores, en las composiciones de la presente invención. Los agentes que potencian la biodisponibilidad adecuados incluyen, por ejemplo, eugenol, cinamaldehído, lecitina, naringenina, naringina y piperina, además de los mencionados anteriormente.

Debe entenderse que siempre que los butanos catecólicos en el presente documento se disuelvan y permanezcan en disolución, suspensión o se mantengan en una forma semisólida o sólida de la composición, uno o más de los solubilizantes o diluyentes o excipientes en el presente documento pueden añadirse a la composición para optimizar la administración de la misma a un sujeto que necesita tal tratamiento.

- 5 Otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para su uso en el presente documento se describen en una variedad de publicaciones. Se describen ejemplos de portadores o excipientes útiles en, por ejemplo, Gennaro, A.R. (2003); Ansel, H.C. *et al.* (2004); Rowe, R.C. *et al.* (2003); y Garg, S. *et al.* (2001).

- 10 Las composiciones en forma líquida pueden incluir un tampón, que se selecciona según el uso deseado de tetra-O-metil-NDGA y también pueden incluir otras sustancias apropiadas para el uso previsto. Los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente un tampón apropiado, una amplia variedad de los cuales se conocen en la técnica, adecuado para un uso previsto.

Métodos terapéuticos

- 15 Las composiciones que contienen tetra-O-metil-NDGA encuentran uso como agentes terapéuticos o para el tratamiento en sujetos que necesitan tal tratamiento en cualquiera de varias enfermedades en las que pueden usarse tetra-O-metil-NDGA.

- 20 La presente invención proporciona una composición para su uso en el tratamiento de enfermedad incluyendo, por ejemplo, enfermedades proliferativas tales como cáncer benigno y maligno, psoriasis y estados premalignos y neoplasia, tal como neoplasia intraepitelial, o displasia. La presente invención también proporciona tratamiento de diabetes, incluyendo diabetes tipo I y tipo II, obesidad y complicaciones que resultan de las mismas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, accidente cerebrovascular e hipertensión. La presente invención proporciona además el tratamiento de enfermedades inflamatorias incluyendo artritis reumatoide, osteoartritis, esclerosis múltiple, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otras enfermedades asociadas al sistema inmunitario. Adicionalmente, la presente invención proporciona el tratamiento de enfermedades neurológicas, incluyendo enfermedades del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, demencia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y enfermedad de Parkinson. En una realización adicional, la presente invención proporciona el tratamiento de infecciones, tales como infecciones virales incluyendo virus que requieren unión a Sp1 para la transcripción o replicación. Los ejemplos de tales virus que requieren unión a Sp1 incluyen: VIH, VLTH, VPH, VHS, VHB, VEB, virus de la varicela-zoster, adenovirus, parvovirus y virus de CJ.

- 30 Puede tratarse una variedad de huéspedes animales según los métodos objeto, incluyendo seres humanos y animales no humanos. Generalmente tales huéspedes son "mamíferos", usándose estos términos de manera amplia para describir organismos que están dentro de la clase Mammalia, incluyendo los órdenes carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, cobayas y ratas), y otros mamíferos, incluyendo reses, cabras, caballos, ovejas, conejos, cerdos y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los huéspedes serán seres humanos. Los modelos animales son de interés para investigaciones experimentales, tales como proporcionar un modelo para el tratamiento de enfermedad humana. Además, la presente invención también puede aplicarse a la atención veterinaria.

Formulaciones, dosificaciones y vías de administración

- 40 En una realización de la invención, se administra una cantidad eficaz de la presente composición al huésped, en la que una "cantidad eficaz" significa una dosificación suficiente para producir un resultado deseado. En algunas realizaciones, por ejemplo, el resultado deseado es al menos una inhibición de la progresión de la neoplasia o displasia.

- 45 La presente invención proporciona adicionalmente composiciones en las que se administra M₄N a animales a una dosis oral de menos de 1 mg/kg a 600 mg/kg de peso de los animales, tales como seres humanos, por ejemplo. Opcionalmente, los animales pueden tratarse con 1 mg/kg, o 50 mg/kg, o 100 mg/kg, o 150 mg/kg, o 200 mg/kg, o 250 mg/kg, o 300 mg/kg, o 350 mg/kg, o 400 mg/kg, o 450 mg/kg, o 500 mg/kg, o 550 mg/kg. Una dosis de este tipo puede administrarse una vez o repetidamente a lo largo de un periodo de días o semanas o meses. Alternativamente, una dosis de este tipo también puede extenderse a lo largo de un periodo de tiempo, dependiendo de la salud del sujeto, la sensibilidad del sujeto, la magnitud de la enfermedad que va a tratarse, la edad del sujeto y similares.

- 50 En una realización, las composiciones terapéuticas en el presente documento se producen disolviendo en primer lugar el principio activo farmacéutico en un agente de solubilización, con agitación y calentamiento según sea necesario. Se añaden otros excipientes a la mezcla solubilizada para crear las proporciones deseadas en cuanto a requisitos de textura y estabilidad. En otra realización, el principio activo farmacéutico no puede disolverse realmente en el agente de solubilización sino que simplemente puede distribuirse uniformemente en una suspensión. En una realización adicional, la composición solubilizada puede liofilizarse y usarse en forma de polvo. Las composiciones orales finales pueden estar en forma de una disolución o suspensión líquida o pueden ser una cápsula, comprimido, o polvo sólido.

Tal como se indicó anteriormente, la dosis apropiada que va a administrarse depende del sujeto que va a tratarse, tal como la salud general del sujeto, la edad del sujeto, el estado de la enfermedad o la afección, el peso del sujeto, la magnitud de la enfermedad, tal como el tamaño del tumor, por ejemplo. Generalmente, pueden administrarse de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg o menos a un niño y pueden administrarse de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 gramos o menos a un adulto. El agente activo puede administrarse en una dosis individual o, más normalmente, dosis múltiples. Las dosificaciones preferidas para un agente dado pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica mediante una variedad de medios. Otras dosificaciones eficaces pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la técnica a través de ensayos de rutina estableciendo curvas de respuesta a la dosis. La cantidad de agente variará, por supuesto, dependiendo del agente particular usado.

La frecuencia de administración del agente activo, como con las dosis, se determinará por el cuidador basándose en la edad, el peso, el estado patológico, el estado de salud y la receptividad del paciente. Por tanto, los agentes pueden administrarse una o más veces al día, a la semana, al mes o según sea apropiado tal como se determine convencionalmente. Los agentes pueden administrarse de manera intermitente, tal como durante un periodo de días, semanas o meses, después no más hasta que haya pasado cierto tiempo, tal como 3 ó 6 meses, y entonces se administran de nuevo durante un periodo de días, semanas o meses.

En formas de dosificación farmacéuticas, los agentes activos pueden administrarse solos o en asociación apropiada, así como en combinación, con otros agentes terapéuticos o agentes farmacéuticamente activos incluyendo otras moléculas pequeñas, anticuerpos o agentes terapéuticos proteicos.

Además, si se desea, el portador o excipiente puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes tamponantes y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes o agentes emulsionantes. Se conocen métodos reales de preparación de tales formas de dosificación, o resultarán evidentes, para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª ed., Mack Publishing Co. Rawlins EA, (1997). La composición o formulación que va a administrarse, en cualquier caso, contendrá una cantidad del API adecuada para lograr el estado deseado en el sujeto que está tratándose.

En la presente invención se incluyen kits con dosis múltiples o unitarias del agente activo. En tales kits, además de los envases que contienen las dosis múltiples o unitarias de las composiciones que contienen tetra-O-metil-NDGA, habrá un prospecto de carácter informativo con instrucciones que describen el uso, y los beneficios que conlleva, de los fármacos en el tratamiento de un estado patológico de interés. Opcionalmente, en cada kit se incluye un aplicador para la administración de la presente composición.

Ejemplo 1. Formulaciones que contienen M₄N en HP-β-CD y/o PEG 300.

En este ejemplo, se preparó M₄N tal como se describe en el documento PCT/US2004/016117 y se solubilizó en un agente de solubilización. La disolución resultante se mezcló opcionalmente con un excipiente y/o un diluyente. El agente de solubilización y el excipiente pueden usarse de manera intercambiable o en combinación entre sí. Un agente de solubilización o excipiente usado era hidroxipropil-β-ciclodextrina controlada mediante endotoxina ("HP-β-CD") obtenida de Research Diagnostics, Inc. (n.º de cat. RDI-82004HPB, n.º de lote H3N188P) (Flanders, NJ, EE.UU.). Otro agente de solubilización o excipiente usado era PEG 300, obtenido de Spectrum Chemicals, Inc. (n.º de cat. P0108, n.º de lote TB1228) (Gardena, CA, EE.UU.).

En una realización de la invención, HP-β-CD y PEG 300 estaban presentes en una formulación individual. Para preparar esta formulación, en primer lugar se disolvió M₄N en PEG 300 para formar una disolución de M₄N en PEG 300 ("M₄N/PEG 300"). Entonces se añadió la disolución de M₄N/PEG 300 a una disolución preparada anteriormente de HP-β-CD para formar una disolución de M₄N en un PEG 300 y HP-β-CD (a continuación en el presente documento, una "formulación de CPE").

Cuando se prepara la disolución de HP-β-CD, debe tenerse en cuenta una expansión de volumen. Por ejemplo, para una disolución de HP-β-CD al 40% (p/v), debe tenerse en cuenta una expansión de volumen de 0,7 ml/g (es decir, 0,7 ml de agua desplazados por gramo de HP-β-CD añadido).

Se preparó una disolución de 100 ml de HP-β-CD al 40% para su uso como agente de solubilización y/o excipiente tal como sigue: se colocaron 65 ml de WFI en un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente cuarenta (40) gramos de HP-β-CD lentamente a la WFI con agitación, usando una espátula para dirigir la HP-β-CD al centro del vaso de precipitados para impedir que los cristales de HP-β-CD se pegaran a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la disolución de HP-β-CD durante aproximadamente 24 h o hasta que la HP-β-CD se disolvió completamente tras inspección visual. La disolución resultante medía aproximadamente 93 ml. Se añadieron aproximadamente 7 ml de WFI a esta disolución resultante para obtener 100 ml, produciendo una disolución final de HP-β-CD aproximadamente al 40%. Se agitó la disolución final durante aproximadamente 1 h, se almacenó a temperatura ambiente y se protegió de la luz. Puede aumentarse o reducirse a escala este método de preparación de la disolución de ciclodextrina modificada para obtener el volumen o la concentración deseados. Pueden prepararse de manera similar otras concentraciones u otras

disoluciones de ciclodextrina modificada, por ejemplo, sustituyendo HP- β -CD por otras ciclodextrinas modificadas, ajustadas para las concentraciones apropiadas en el procedimiento descrito anteriormente.

5 Se prepararon 10 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml en HP- β -CD al 40% tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 10 ml de la disolución de HP- β -CD al 40% a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 10 mg de M₄N lentamente a la HP- β -CD al 40% en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula. Se agitó la mezcla de M₄N/HP- β -CD al 40% durante 2 h o hasta que todo el M₄N se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Opcionalmente se calentó la mezcla de M₄N/HP- β -CD al 40% a 80°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 80°C para 100 ml de la mezcla de M₄N/HP- β -CD), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla o disolución de M₄N/HP- β -CD para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Se almacenó la disolución de M₄N/HP- β -CD al 40% final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otras disoluciones de ciclodextrina, tal como, por ejemplo, sustituyendo HP- β -CD en el procedimiento descrito anteriormente por otras ciclodextrinas. Los resultados mostrados en la tabla 1 demuestran que M₄N permaneció en disolución tras enfriar a concentraciones de 1 mg/ml y 10 mg/ml en la formulación de HP- β -CD al 40% durante más de 7 días.

25 Se prepararon 100 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 25 mg/ml en PEG 300 tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 100 ml de PEG 300 a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 2,5 g de M₄N lentamente al PEG 300 en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que el M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/PEG 300 durante 24 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Opcionalmente se calentó la mezcla de M₄N/PEG 300 a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/PEG 300), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla o disolución de M₄N/PEG 300 para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Tras observarse que se había disuelto todo el M₄N, se usó la disolución de M₄N/PEG 300 resultante inmediatamente o antes de que pasaran 48 h, de lo contrario pueden formarse cristales u otros precipitados. Si se formaron cristales, podía calentarse la disolución de M₄N/PEG 300 de nuevo a 60°C durante aproximadamente 1 h, con agitación, sobre una placa magnética caliente hasta que todo el M₄N se disolvió de nuevo en la disolución. Se almacenó la disolución de M₄N/PEG 300 final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros PEG, tal como, por ejemplo, sustituyendo PEG 300 en el procedimiento descrito anteriormente por PEG 400 o monolaurato de PEG 400.

45 Se preparó una disolución madre de 100 ml de una formulación que contenía PEG 300 al 50% (v/v), HP- β -CD al 20% (p/v) y 12,5 mg de M₄N añadiendo 50 ml de la disolución de HP- β -CD preparada anteriormente al 40% (preparada tal como se describió anteriormente) a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación sobre una placa magnética, agitando la barra de agitación a velocidad media, y añadiendo lentamente 50 ml de la disolución de M₄N/PEG 300 preparada anteriormente (preparada tal como se describió anteriormente), por ejemplo, a una velocidad de aproximadamente 10 ml por min. Se añadió M₄N/PEG 300 usando una pipeta al centro del vaso de precipitados para impedir que se pegara a las paredes del vaso de precipitados y para garantizar disolución completa. La adición de M₄N/PEG 300 a la disolución de HP- β -CD apareció inicialmente como una disolución blanca, pero finalmente se volvió transparente tras el mezclado continuo. Puede aumentarse o disminuirse a escala esta fórmula según sea apropiado para producir el volumen o la concentración deseados de M₄N/PEG 300 y HP- β -CD. Se esterilizó mediante filtración la disolución madre usando una membrana de PVDF de 0,22 μ m, tal como una membrana de filtro en la parte superior del frasco, de desecho, impulsada por vacío, esterilizada anteriormente, obtenida de Millipore (n.º de cat. SCGV T05 RE) (Billerica, MA, EE.UU.). El procedimiento de filtración se impulsó mediante fuerza de vacío y el filtrado se recogió en frascos de vidrio de 250 ml esterilizados anteriormente. Entonces se sellaron herméticamente los frascos, se almacenaron a temperatura ambiente y se protegieron de la luz. Puede prepararse de manera similar una disolución madre de M₄N/PEG 400 o M₄N/monolaurato de PEG 400 en HP- β -CD sustituyendo PEG 300 por PEG 400 o monolaurato de PEG 400 en el procedimiento descrito anteriormente.

60 La disolución madre de M₄N/PEG 300/HP- β -CD, M₄N/PEG 400/HP- β -CD o M₄N/monolaurato de PEG 400/HP- β -CD preparada de la manera anterior puede diluirse antes de su uso *in vitro* o para la administración a animales. Si la dilución es necesaria, preferiblemente se diluye la disolución madre en WFI, en lugar de solución salina, por ejemplo,

5 para mantener la osmolaridad baja. Para preparar 100 ml de una dilución 1:1 de la disolución madre en WFI, se añadieron aproximadamente 50 ml de la disolución madre a un vial de vidrio. Se añadieron aproximadamente 50 ml de WFI a los 50 ml de la disolución madre en el vial para formar una disolución diluida. Se cerró el vial de vidrio y se mezcló bien la disolución diluida agitando e invirtiendo el vial unas cuantas veces. Se esterilizó mediante filtración la disolución diluida usando una membrana de PVDF de 0,22 µm, tal como una membrana de filtro en la parte superior del frasco, de desecho, impulsada por vacío, esterilizada anteriormente, obtenida de Millipore (n.º de cat. SCGV T05 RE) (Billerica, MA, EE.UU.). El procedimiento de filtración se impulsó mediante fuerza de vacío y se recogió el filtrado en frascos de vidrio de 250 ml esterilizados anteriormente. Entonces se sellaron herméticamente los frascos, se almacenaron a temperatura ambiente y se protegieron de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o las diluciones requeridas, tales como diluciones de 1:2 ó 1:4, por ejemplo.

10 Puede prepararse una formulación adecuada para su uso como control con placebo que contiene PEG 300 al 50% y HP-β-CD al 20% tal como sigue. Para preparar 100 ml de disolución de la formulación de placebo o control, se añaden aproximadamente 50 ml de HP-β-CD al 40% a un vaso de precipitados de vidrio que contiene una barra de agitación sobre una placa magnética. Se ajusta la placa magnética para agitar la disolución de HP-β-CD a velocidad media. Se añaden aproximadamente 50 ml de PEG 300 lentamente a los 50 ml de HP-β-CD en el vaso de precipitados de vidrio mediante pipeta al centro del vaso de precipitados para impedir que el PEG 300 se pegue a las paredes del vaso de precipitados. Se agita la mezcla durante aproximadamente 1 h o hasta que se completa el mezclado. Esta formulación de placebo se esteriliza mediante filtración usando un filtro de membrana de PVDF de 0,22 µm impulsado mediante la fuerza de vacío. Se recoge el filtrado en frascos de vidrio de 250 ml esterilizados anteriormente. Se sellan herméticamente los frascos de vidrio, se almacenan a temperatura ambiente y se mantienen protegidos de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala esta fórmula según se requiera para producir las cantidades de concentración y volumen deseadas. Además, puede sustituirse PEG 300 por PEG 400 o monolaurato de PEG 400, según se desee.

15 Los resultados de la solubilidad de M₄N en formulaciones que contienen HP-β-CD y/o PEG 300, PEG 400, y en formulaciones que contienen HP-β-CD y propilenglicol ("PG"), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC), polivinilpirrolidona (PVP) o Tween® 80 preparadas según los procedimientos anteriores o similares así como las características de las formulaciones resultantes se muestran en las tablas 1 - 5, en las que N representa "No" y S representa "Sí".

Tabla 1. Ciclodextrinas modificadas como excipientes y/o agentes de solubilización

Excipientes	Concentración de excipiente (en p/v a menos que se especifique lo contrario)	Concentración de fármaco (en mg/ml a menos que se especifique lo contrario)	Disolución tras rotación	Disolución tras calentamiento a X°C	Disolución tras enfriamiento	Estabilidad a temperatura ambiente
α-CD	15%	1	N	N a 90°		
		10	N	N a 90°		
		50	N	N a 90°		
		100	N	N a 90°		
β-CD	1,50%	1	N	N a 90°		
		10	N	N a 90°		
γ-CD	5%	1	N	N a 90°		
HP-β-CD	50%	1	N	S a 90°	S	> 7 días
		10	N	S a 90°	S	> 7 días
		20	N	N a 90°		
		50	N	N a 90°		
		100	N	N a 90°		
	40%	1	N	S a 80°	S	> 7 días
		10	N	S a 80°	S	> 7 días
		12	N	N a 80°		
		14	N	N a 80°		
		16	N	N a 80°		
30%	100	1	N	N a 80°		
		20	N	N a 80°		
		50	N	N a 80°		
		100	N	N a 80°		
		1	N	S a 90°	S	> 7 días
		10	N	S a 90°	S	< 3 días

ES 2 606 332 T3

		20	N	N a 90°		
		50	N	N a 90°		
		100	N	N a 90°		
	20%	1	N	S a 90°	S	> 7 días
		10	N	N a 90°		
	81,5% (p/p), líoofilizado	185 mg/g	polvo			
HP-β-CD	50% en solución salina	10	N	S a 90°	S	>7 días
	20% en solución salina	1	N			
		10	N			
		50	N			
HP-β-CD y propilenglicol (PG)	HP-β-CD al 40%, PG al 2,5% (v/v)	1	N	N a 80°		
		10	N	N a 80°		
HP-β-CD y CMC	HP-β-CD al 50%, CMC al 0,5%	1	Suspensión			> 7 días
		20	Suspensión			> 7 días
		60	Suspensión			> 7 días
HP-β-CD y PVP	HP-β-CD al 50%, PVP al 1,25% (p/v)	1	N	S a 90°	S	< 3 días
		10	N	N		
		50	N	N		
	HP-β-CD al 40%, PVP al 1% (p/v)	1	N	N		
		10	N	N		
HP-β-CD y PEG 300	HP-β-CD al 27%, PEG 300 al 33% (v/v)	13,3	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 23%, PEG 300 al 43% (v/v)	12,9	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 20%, PEG 300 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 15%, PEG 300 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 7 días
	HP-β-CD al 12,5%, PEG 300 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 1 día
	HP-β-CD al 13%, PEG 300 al 67% (v/v)	16,7	N	S a 60°	N	
	HP-β-CD al	19,3	N	S a 60°	N	

	10%, PEG 300 al 77% (v/v)					
	HP-β-CD al 10%, PEG 300 al 25% (v/v)	6,25	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 6,7%, PEG 300 al 16,7% (v/v)	4,17	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 5%, PEG 300 al 12,5% (v/v)	3,13	N	S a 60°	S	< 7 días
HP-β-CD y PEG 400	HP-β-CD al 32%, PEG 400 al 20% (v/v)	10	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 30%, PEG 400 al 25% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 27%, PEG 400 al 33% (v/v)	13,3	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 23%, PEG 400 al 43% (v/v)	12,9	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 20%, PEG 400 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 7 días
	HP-β-CD al 15%, PEG 400 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 3 días
	HP-β-CD al 12,5%, PEG 400 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 1 día
	HP-β-CD al 40%, PEG 400 al 5% (v/v)	10	N	S a 60°	N	
HP-β-CD y Tween® 80	HP-β-CD al 27%, Tween® 80 al 33% (v/v)	13,3	N	S a 60°	N	

Todas las formulaciones soportan 4°C durante 24 h y 5 min de centrifugación a 5000 rpm sin formar precipitados visibles. La formulación que contiene disolución madre de PEG 300 al 50%, HP-β-CD al 20%, M₄N 12,5 mg/ml soporta 4°C durante al menos 4 meses. Diluciones de la misma disolución madre preparadas en diluciones de 1:1 ó 1:2 también soportan 4°C durante al menos 4 meses.

5 Tabla 2. Formulaciones de M₄N en PEG 300 y HP-β-CD

Disoluciones madre sin diluir			Para cada 10 mg de M ₄ N		Para cada 50 mg de M ₄ N		Para cada 100 mg de M ₄ N	
PEG 300	HP-β-CD	M ₄ N (mg/ml)	PEG 300 en ml	HP-β-CD	PEG 300 en ml (mg)	HP-β-CD	PEG 300 en ml (mg)	HP-β-CD

(v/v)	(p/v)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
50%	15%	12,5	0,4 (450)	120	2,0 (2250)	600	4,0 (4500)
50%	20%	12,5	0,4 (450)	160	2,0 (2250)	800	4,0 (4500)
43%	23%	12,9	0,33 (375)	178	1,67 (1875)	890	3,33 (3746)
33%	27%	13,3	0,25 (281)	200	1,25 (1406)	1000	2,5 (2813)

Tabla 3. Formulaciones de M₄N en PEG 400 y HP-β-CD

Disoluciones madre sin diluir			Para cada 10 mg de M ₄ N		Para cada 50 mg de M ₄ N		Para cada 100 mg de M ₄ N	
PEG 400 (v/v)	HOP-β-CD (p/v)	M ₄ N (mg/ml)	PEG 400 en ml (mg)	HP-β-CD (mg)	PEG 400 en ml (mg)	HP-β-CD (mg)	PEG 400 en ml (mg)	HP-β-CD (mg)
50%	20%	12,5	0,4 (450)	160	2,0 (2250)	800	4,0 (4500)	1600
43%	23%	12,9	0,33 ml (375)	178	1,67 (1875)	890	3,33 (3746)	1780
33%	27%	13,3	0,25 (281)	200	1,25 (1406)	1000	2,5 (2813)	2000
25%	30%	12,5	0,20 (225)	240	1,0 (1125)	1200	2,0 (2250)	2400
20%	32%	10,0	0,20 (225)	320	1,0 (1125)	1600	2,0 (2250)	3200

Tabla 4. Estabilidad de formulaciones de M₄N en PEG 300

Formulación	PEG 300 (v/v)	HP-β-CD (p/v)	M ₄ N (mg/ml)	Estabilidad a temperatura ambiente
A	50%	15%	12,5	> 3 días
B	50%	20%	12,5	> 5 meses
C	43%	23%	12,9	> 5 meses
D	33%	27%	13,3	> 5 meses

Tabla 5. Estabilidad de formulaciones de M₄N en PEG 400

Formulación	PEG 400 (v/v)	HP-β-CD (p/v)	M ₄ N (mg/ml)	Estabilidad a temperatura ambiente
E	50%	20%	12,5	> 6 días
F	43%	23%	12,9	> 5 meses
G	33%	27%	13,3	> 5 meses
H	25%	30%	12,5	> 5 meses
I	20%	32%	10,0	> 5 meses

5 De manera similar, puede solubilizarse el M₄N en otros agentes de solubilización, tales como disolventes orgánicos solubles en agua incluyendo etanol, polivinilpirrolidona (PVP), propilenglicol o glicerol.

Ejemplo 2. Efecto de M₄N en DMSO o formulación de combinación de PEG 300/ HP-β-CD sobre la proliferación y muerte de células tumorales en cultivo

10 Se sometió a prueba M₄N en HP-β-CD al 10% (p/v) y PEG 300 al 25% (v/v) (a continuación en el presente documento, la "formulación de CPE"), M₄N en HP-β-CD al 30% (p/v) y PEG 300 al 25% (v/v) (a continuación en el presente documento, la "formulación de CPE 25/30") y M₄N en HP-β-CD al 27% (p/v) y PEG 300 al 33% (v/v) (a continuación en el presente documento, la "formulación de CPE 33/27") para determinar sus efectos sobre la muerte y la proliferación celulares sobre dos líneas de células tumorales diferentes: HeLa, una línea de células de cáncer de cuello uterino humano positivas para VPH-18, y C-33A, una línea de células de cáncer de cuello uterino humano negativas para VPH. También se sometió a prueba en paralelo M₄N en DMSO. Se trataron ambas líneas de células tumorales con cantidades crecientes de M₄N: 0 μM, 20 μM, 40 μM, 60 μM y 80 μM, durante 72 h con el DMSO o la formulación de CPE. Cada formulación se añadió hasta un total del 1% del medio de crecimiento (medio esencial mínimo con L-glutamina complementado con suero bovino fetal al 10%, piruvato de sodio 1 mM, disolución de aminoácidos no esenciales 1 x y disolución de penicilina 1.000 UI/ml/estreptomina 1.000 μg/ml). Se hicieron crecer las células control en las mismas condiciones y se dejaron sin tratar. Tras 72 h de tratamiento o sin tratamiento, se contó el número total de células y el número de células vivas en cada muestra, usando el método de exclusión de azul de tripano. Se analizaron la tasa de proliferación celular y el porcentaje de células muertas en cada muestra.

15

20

Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1, la figura 2 y las tablas 6 a 12.

La figura 1 es una representación gráfica de la razón del número de células tratadas/número de células no tratadas representado frente a concentraciones crecientes de M₄N o bien en la formulación de DMSO o bien en la formulación de CPE para el tratamiento de las células C-33A y las células HeLa. La figura 2 es una representación gráfica del porcentaje de células muertas representado frente a concentraciones crecientes de M₄N y o bien en la formulación de DMSO o bien en la formulación de CPE para el tratamiento de las dos líneas de células de cáncer, células C-33A y HeLa en cultivo.

Los resultados muestran que DMSO solo, en ausencia de M₄N, tiene un efecto antiproliferativo significativo y cierto efecto tóxico, tal como se mide mediante el % de células muertas, sobre ambas líneas de células tumorales sometidas a prueba en comparación con los controles no tratados. Por el contrario, la formulación de CPE sola tiene un efecto antiproliferativo y muy poco efecto tóxico sobre las dos líneas de células tumorales en comparación con los controles no tratados.

Se redujo la tasa de proliferación celular en ambas líneas celulares tras el tratamiento con M₄N o bien en la formulación de DMSO o bien en la formulación de CPE, en comparación con los controles no tratados con M₄N (es decir, 0 µg/ml o 0 M de M₄N) en la misma formulación. De hecho, el efecto antiproliferativo parecía depender de la dosis de M₄N en la formulación de CPE. En la formulación de CPE, por ejemplo, se encontró que aproximadamente 20 µM o 7,2 µg/ml de M₄N eran suficientes para provocar una inhibición de aproximadamente el 50% en la proliferación celular para ambos tipos de células tumorales. Aumentos adicionales en la concentración de M₄N en la formulación de CPE dieron como resultado aumentos adicionales en el efecto antiproliferativo para ambos tipos de células.

En general, dosis mayores de M₄N o bien en la formulación de DMSO o bien en la formulación de CPE indujeron porcentajes mayores de muerte celular tanto para las células C-33A como para las células HeLa. Sin embargo, M₄N en la formulación de DMSO era más tóxico para las células que las concentraciones correspondientes de M₄N en la formulación de CPE. Mientras que la concentración más alta de M₄N sometida a prueba (80 µM o 28,7 µg/ml) en la formulación de DMSO promovió la muerte celular en aproximadamente el 40% de la población celular, la misma concentración de M₄N en la formulación de CPE promovió la muerte celular en sólo aproximadamente el 20% de la población celular en este experimento.

Se encontró que estos resultados eran reproducibles en ambas líneas celulares. Los datos de este estudio indican que M₄N en la formulación de CPE tiene capacidad para detener la proliferación celular, similar a M₄N en la formulación de DMSO, al tiempo que induce menos toxicidad celular que la formulación de DMSO.

Se recogieron los datos de puntos de tiempo continuados para someter a prueba la eficacia de la formulación de CPE a lo largo del tiempo. Los datos mostraron que tras un periodo de doce meses de almacenamiento a 2-8°C, la formulación de CPE es tan eficaz como cuando es nueva. La viabilidad de las células permaneció similar a lo largo de los doce meses durante los que se almacenó la formulación de CPE. Las tasas de muerte y de proliferación celular permanecieron dentro del mismo intervalo.

Se recogieron datos para comparar la formulación de CPE original con la nueva formulación de CPE 25/30. Se realizaron estudios a 0 y 3 meses para someter a prueba la eficacia de la formulación a lo largo del tiempo así como para someter a prueba cómo de bien funciona la nueva formulación en relación con la antigua. Los datos mostraron que la formulación de CPE 25/30 es tan eficaz en la inhibición del crecimiento de células tumorales como la formulación de CPE original. La viabilidad celular era similar entre las células HeLa tratadas con diversas concentraciones de fármaco usando o bien la formulación de CPE o bien la formulación de CPE 25/30. La muerte y la proliferación celulares permanecieron dentro del mismo intervalo a lo largo del tiempo.

Se recogió información comparando la formulación de CPE original con la formulación de CPE 33/27 a tiempo cero en células HeLa. Los datos mostraron que CPE 33/27 tenía los mismos efectos sobre células HeLa en viabilidad celular, porcentaje de células muertas y tasa de proliferación.

Tabla 6. Efecto de M₄N en DMSO o la formulación de CPE sobre células C-33 A

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	95,4	4,6	1,00
DMSO 0 µM	82,0	18,0	0,47
DMSO 20 µM	82,6	17,4	0,20
DMSO 40 µM	67,0	33,0	0,15
DMSO 60 µM	60,4	39,6	0,14
DMSO 80 µM	56,7	43,3	0,11
CPE 0 µM	92,8	7,2	0,79
CPE 20 µM	93,0	7,0	0,43
CPE 40 µM	89,1	10,9	0,43
CPE 60 µM	89,4	10,6	0,22

CPE 80 μ M	77,5	22,5	0,15
----------------	------	------	------

Tabla 7. Efecto de M₄N en DMSO o la formulación de CPE sobre células HeLa a tiempo 0

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	97,7	2,3	1,00
DMSO 0 μ M	93,7	6,3	0,43
DMSO 20 μ M	90,1	9,9	0,25
DMSO 40 μ M	86,8	13,2	0,25
DMSO 60 μ M	63,9	36,1	0,13
DMSO 80 μ M	61,4	38,6	0,02
CPE 0 μ M	96,3	3,7	1,03
CPE 20 μ M	95,6	4,4	0,52
CPE 40 μ M	90,6	9,4	0,28
CPE 60 μ M	80,4	19,6	0,13
CPE 80 μ M	78,5	21,5	0,13

Tabla 8. Efecto de M₄N en DMSO o la formulación de CPE sobre células HeLa a los 9 meses

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	95,7	4,2	1,00
DMSO 0 μ M	94,9	5,1	0,76
DMSO 20 μ M	89,3	10,7	0,19
DMSO 40 μ M	91,2	8,8	0,14
DMSO 60 μ M	67,5	32,5	0,03
DMSO 80 μ M	50,0	50,0	0,02
CPE 0 μ M	95,6	4,4	0,72
CPE 20 μ M	68,7	31,3	0,24
CPE 40 μ M	72,8	27,2	0,10
CPE 60 μ M	86,4	13,6	0,09
CPE 80 μ M	88,1	11,9	0,08

Tabla 9. Efecto de M₄N en DMSO o la formulación de CPE sobre células HeLa a los 12 meses

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	92,1	7,9	1,00
DMSO 0 μ M	90,5	9,5	0,77
DMSO 20 μ M	87,4	12,6	0,23
DMSO 40 μ M	86,4	13,7	0,04
DMSO 60 μ M	64,6	35,4	0,04
DMSO 80 μ M	76,5	23,6	0,15
CPE 0 μ M	95,6	4,4	1,50
CPE 20 μ M	96,8	3,3	0,74
CPE 40 μ M	95,0	5,0	0,21
CPE 60 μ M	75,0	25,0	0,05
CPE 80 μ M	52,8	47,2	0,03

Tabla 10. Comparación de la formulación de CPE y la formulación de CPE 25/30 en células HeLa

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	93,5	6,6	1,00
CPE 0 μ M	92,3	7,8	0,92
CPE 20 μ M	93,5	6,6	0,33
CPE 40 μ M	76,7	23,4	0,08
CPE 60 μ M	44,5	55,6	0,03
CPE 80 μ M	43,4	56,7	0,04
CPE 25/30 0 μ M	90,7	9,3	0,81
CPE 25/30 20 μ M	90,7	9,4	0,34
CPE 25/30 40 μ M	89,1	11,0	0,31
CPE 25/30 60 μ M	77,3	22,8	0,12
CPE 25/30 80 μ M	54,8	45,2	0,07

Tabla 11. Comparación de la formulación de CPE y la formulación de CPE 25/30 en células HeLa a los 3 meses

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	95,8	4,2	1,00
CPE 0 μ M	95,0	5,0	0,91
CPE 20 μ M	91,0	9,0	0,39
CPE 40 μ M	83,5	16,5	0,09
CPE 60 μ M	56,9	43,1	0,03
CPE 80 μ M	71,0	29,0	0,03
CPE 25/30 0 μ M	93,4	6,6	0,87
CPE 25/30 20 μ M	88,1	11,9	0,39
CPE 25/30 40 μ M	86,6	13,4	0,32
CPE 25/30 60 μ M	76,9	23,1	0,11
CPE 25/30 80 μ M	64,4	35,6	0,04

Tabla 12. Comparación de la formulación de CPE y la formulación de CPE 33/27 en células HeLa a tiempo cero

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	95,0	5,0	1,00
CPE 0 μ M	96,4	3,6	1,11
CPE 20 μ M	88,1	11,9	0,35
CPE 40 μ M	74,2	25,9	0,14
CPE 60 μ M	73,9	26,2	0,10
CPE 80 μ M	78,4	21,6	0,11
CPE 33/27 0 μ M	95,4	4,7	0,92
CPE 33/27 20 μ M	89,2	10,9	0,43
CPE 33/27 40 μ M	86,4	13,6	0,19
CPE 33/27 60 μ M	70,7	29,3	0,10
CPE 33/27 80 μ M	75,0	25,0	0,09

Ejemplo 3. Pueden usarse múltiples lotes de M₄N y crear los mismos resultados

5 Se sometieron a prueba diversos lotes de M₄N para mostrar la eficacia del fármaco de diferentes lotes. Se trataron células HeLa con cantidades crecientes de M₄N: 0 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M y 80 μ M, durante 72 h con la formulación de CPE. Cada formulación se añadió hasta un total del 1% del medio de crecimiento (medio esencial con L-glutamina complementado con suero bovino fetal al 10%, piruvato de sodio 1 mM, disolución de aminoácidos no esenciales 1 x y disolución de penicilina 1.000 UI/ml/estreptomicina 1.000 μ g/ml). Se hicieron crecer las células control en las mismas condiciones y se dejaron sin tratar. Tras 72 h de tratamiento o sin tratamiento, se contó el número total de células y el número de células vivas en cada muestra, usando el método de exclusión de azul de tripano. Se analizaron la tasa de proliferación celular y el porcentaje de células muertas en cada muestra. 10 Los resultados de este experimento se muestran en las tablas 13 y 14. Este resultado muestra que independientemente del lote de M₄N usado, la eficacia del fármaco sigue siendo la misma.

Tabla 13. Tratamiento de células HeLa con diversos lotes de M₄N (lote EM1001)

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	96,2	3,7	1,00
CPE 0 μ M	96,2	3,8	0,92
CPE 20 μ M	94,9	5,1	0,25
CPE 40 μ M	73,7	26,3	0,10
CPE 60 μ M	44,4	55,6	0,01
CPE 80 μ M	59,8	40,2	0,01

15 Tabla 14. Tratamiento de células HeLa con diversos lotes de M₄N (lote EM1002)

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	95,9	4,1	1,00
CPE 0 μ M	96,1	3,8	0,65
CPE 20 μ M	88,0	12,0	0,32
CPE 40 μ M	74,2	25,8	0,11
CPE 60 μ M	41,9	58,1	0,05
CPE 80 μ M	40,3	59,7	0,03

Ejemplo 4. Solubilidad de M₄N en celulosas modificadas (ejemplo de referencia)

Se preparó una disolución de 10 ml de HP-β-CD al 50% (p/v) e hidroxipropilmetilcelulosa ("HPMC") al 0,5% (p/v) para su uso como agente de solubilización y/o excipiente tal como sigue: se colocaron 5,9 ml de WFI en un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron lentamente cinco gramos de HP-β-CD al WFI con agitación, usando una espátula para dirigir la HP-β-CD hacia el centro del vaso de precipitados. Se agitó la disolución de HP-β-CD durante aproximadamente 24 h o hasta que la HP-β-CD se disolvió completamente tras inspección visual. La disolución resultante medía aproximadamente 9,4 ml. Se añadieron aproximadamente 0,6 ml de WFI a esta disolución resultante hasta alcanzar 10 ml, para producir una disolución de HP-β-CD al 50% (p/v). Se añadieron cincuenta miligramos de HPMC a la disolución de HP-β-CD al 50% y se agitó durante aproximadamente 1 h o hasta que la HPMC se disolvió tras inspección visual. Se agitó la disolución final durante aproximadamente 1 h y entonces se almacenó a temperatura ambiente, protegida de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este método de preparación de ciclodextrinas modificadas con celulosas modificadas para obtener el volumen o la concentración deseados de la disolución de HP-β-CD/HPMC. Pueden prepararse de manera similar otras disoluciones de ciclodextrina modificada/celulosa modificada, por ejemplo, sustituyendo HP-β-CD por otras ciclodextrinas modificadas, o HPMC por otras celulosas modificadas, en el procedimiento descrito anteriormente.

Se prepararon 10 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml en HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5% tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 10 ml de la disolución de HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5% a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 100 mg de M₄N lentamente a la HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5% en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula. Se agitó la mezcla de M₄N/HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5% durante 24 h o hasta que todo el M₄N se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Se calentó la mezcla de M₄N/HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5% a aproximadamente 90°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 90°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5%), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla de M₄N/HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5% para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Se almacenó la disolución de M₄N/HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5% final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz. Se disolvió M₄N en esta formulación de HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5% a las concentraciones de 1 mg/ml y 10 mg/ml cuando se calentó a 90°C y permaneció en disolución tras enfriarse, con estabilidad a temperatura ambiente durante más de 7 días. M₄N no se disolvió en la misma formulación a la concentración de 50 mg/ml ni siquiera a 90°C.

Puede aumentarse o disminuirse a escala el procedimiento anterior para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otras disoluciones de ciclodextrina/celulosa, tal como, por ejemplo, sustituyendo HP-β-CD en el procedimiento descrito anteriormente por otras ciclodextrinas, o sustituyendo HPMC por otras celulosas modificadas.

Se prepararon 10 ml de una disolución de etilcelulosa ("EC") al 5% en etanol (p/v) para su uso como excipiente y/o agente de solubilización tal como sigue: se colocaron 10 ml de alcohol etílico ("EtOH") al 100% en un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación, cubierto por una cubierta de Teflon® redonda. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron lentamente quinientos (500) miligramos de EC al etanol con agitación, usando una espátula para dirigir el EC al centro del vaso de precipitados para impedir que el polvo de EC se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la disolución de EC durante aproximadamente 2 h o hasta que el EC se disolvió completamente tras inspección visual. Se almacenó la disolución final a temperatura ambiente, y se protegió de la luz.

Puede aumentarse o disminuirse a escala este método de preparación de disoluciones de celulosa modificada para obtener el volumen o la concentración deseados. Pueden prepararse de manera similar otras disoluciones de celulosa modificada, por ejemplo, sustituyendo EC por otras celulosas modificadas, en el procedimiento descrito anteriormente.

Se prepararon 10 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml en EC al 5% (p/v) (la "formulación de EC") tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 10 ml de la formulación de EC al 5%, preparada tal como se describió anteriormente, a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media, y se cubrió con una cubierta de Teflon® redonda. Se añadieron aproximadamente 200 mg de M₄N lentamente a la formulación de EC al 5% en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que el M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/EC durante 2 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Se calentó la mezcla de M₄N/EC a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se

deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/EC), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla o disolución de M₄N/EC para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Se almacenó la disolución de M₄N/EC final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz.

5

Puede aumentarse o disminuirse a escala el procedimiento anterior para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N y puede aumentarse o disminuirse la temperatura de calentamiento para lograr la disolución de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otras celulosas modificadas, tal como, por ejemplo, HPMC, MC y CMC. Los resultados de la solubilidad de M₄N en las celulosas modificadas se exponen en la tabla 15.

10

Los resultados muestran que M₄N no era soluble en HPMC al 2,3% (p/v) a ninguna de las concentraciones sometidas a prueba o tras el calentamiento hasta 90°C. M₄N formó una suspensión en HPMC al 1% (p/v) a la concentración de 10 mg/ml. Esta suspensión era estable a temperatura ambiente durante menos de 2 días.

En presencia de HP-β-CD (50% en p/v) y HPMC (0,5% en p/v), se solubilizó M₄N a 90°C y permaneció en disolución tras enfriarse a las concentraciones de 1 mg/ml y 10 mg/ml. Estas disoluciones eran estables a temperatura ambiente durante más de 7 días. M₄N no se disolvió en la misma composición de HP-β-CD (50% en p/v) y HPMC (0,5% en p/v) a la concentración de 50 mg/ml ni siquiera tras el calentamiento hasta 90°C.

15

En otro experimento, M₄N formó suspensiones en ausencia de calor en la composición de HP-β-CD (50% en p/v) y HPMC (0,5% en p/v) a todas las concentraciones sometidas a prueba, es decir, 1 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml y 50 mg/ml. Estas suspensiones eran estables a temperatura ambiente durante más de 7 días.

20

Los resultados en la tabla 15 también muestran que M₄N era soluble a 1 mg/ml en la formulación de EC sin aplicación de calor, siendo la disolución estable a temperatura ambiente durante más de 3 días. M₄N era soluble a la concentración de 10 mg/ml a 40°C y permaneció en disolución tras enfriarse, siendo esta disolución estable a temperatura ambiente durante más de 3 días. M₄N era soluble en la formulación de EC a la concentración de 20 mg/ml a 60°C y permaneció en disolución tras enfriarse, siendo esta disolución estable a temperatura ambiente durante más de 3 días. M₄N a la concentración de 30 mg/ml era soluble en la formulación de EC a 60°C, pero no permaneció en disolución tras enfriarse. Concentraciones mayores de M₄N, tales como a los niveles de 50 mg/ml o 100 mg/ml, eran solubles en la formulación de EC a 90°C, pero no permanecieron en disolución tras enfriarse.

25

M₄N también formó suspensiones en CMC de baja viscosidad al 1% a los niveles de 10 mg/ml y 20 mg/ml. Estas suspensiones eran estables a temperatura ambiente durante menos de 2 días.

30

Tabla 15. Solubilidad de M₄N en formulaciones que contienen celulosas modificadas

Excipientes	Concentración de excipiente (en p/v a menos que se declare lo contrario)	Concentración de fármaco (en mg/ml a menos que se declare lo contrario)	Disolución tras rotación	Disolución tras calentamiento	Disolución tras enfriamiento	Tiempo de estabilidad a temperatura ambiente
HPMC	2,3%	1	N	N a 90°C		
		10	N	N a 90°C		
		50	N	N a 90°C		
		100	N	N a 90°C		
	1%	10	suspensión			< 2 días
HP-β-CD y HPMC	HP-β-CD al 50%, HPMC al 0,5%	1	N	S a 90°C	S	> 7 días
		10	N	S a 90°C	S	> 7 días
		50	N	N a 90°C		
	HP-β-CD al 50%, HPMC al 0,5%	1	Suspensión			> 7 días
		10	Suspensión			> 7 días
		20	Suspensión			> 7 días
		50	Suspensión			> 7 días
	HP-β-CD al 84%, HPMC al 1%, liofilizado	150 mg/g	polvo			

EC	5% en EtOH	1	S			> 3 días
		10	N	S a 40°C	S	> 3 días
		20	N	S a 60°C	S	> 3 días
		30	N	S a 60°C	N	
		50	N	S a 90°C	N	
		100	N	S a 90°C	N	
MC	2%	1	N	N a 90°C		
(Baja viscosidad)		10	N	N a 90°C		
CMC	1%	1	N	N a 90°C		
(Alta viscosidad)		10	N	N a 90°C		
CMC	4%	1	N	N a 90°C		
(Baja viscosidad)		10	N	N a 90°C		
	1%	10	suspensión			< 2 días
		20	suspensión			< 2 días

Ejemplo 5. Solubilidad de M₄N en lípidos insolubles en agua y en disolventes orgánicos solubles en agua (ejemplo de referencia)

Se preparó una disolución de 10 ml de M₄N a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml en aceite de sésamo tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 10 ml de aceite de sésamo a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 500 mg de M₄N lentamente al aceite de sésamo en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que el M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo durante aproximadamente 2 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Se calentó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/aceite de sésamo), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla o disolución de M₄N/aceite de sésamo para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Si se formaron cristales, podía calentarse la disolución de M₄N/aceite de sésamo de nuevo a 60°C durante aproximadamente 1 h, con agitación, sobre una placa magnética caliente hasta que todo el M₄N se disolvió de nuevo en la disolución. Se almacenó la disolución de M₄N/aceite de sésamo final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz.

Puede aumentarse o disminuirse a escala el procedimiento anterior para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N y puede aumentarse o disminuirse la temperatura de calentamiento para lograr la disolución de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros lípidos insolubles en agua, tal como, por ejemplo, sustituyendo aceite de sésamo en el procedimiento descrito anteriormente por aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de menta piperita, u otros agentes de solubilización, y combinaciones de los mismos. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Se preparó una mezcla de 10 g de M₄N a una concentración de aproximadamente 200 mg/g en el 95% de aceite de oliva y el 5% de cera de abejas tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 7,6 ml de aceite de oliva a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 2 g de M₄N lentamente al aceite de oliva en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que el M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/aceite de oliva durante aproximadamente 2 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Opcionalmente se calentó la mezcla de M₄N/aceite de oliva a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/aceite de oliva), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla de M₄N/aceite de oliva para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Si se formaron cristales, podía calentarse la disolución de M₄N/aceite de oliva de nuevo a 60°C durante aproximadamente 1 h, con agitación, sobre una placa magnética caliente hasta que todo el M₄N se disolvió de nuevo en la disolución. Se añadieron aproximadamente 400 mg de cera de abejas blanca a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. También se colocó el vaso de precipitados sobre

una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se calentó la cera de abejas a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba una cantidad mayor), o hasta que toda la cera de abejas se había fundido. Entonces se añadió la disolución de M₄N/aceite de oliva a aproximadamente 400 mg de cera de abejas fundida y se agitó y se calentó a aproximadamente 50°C durante aproximadamente 30 min o hasta que toda la mezcla de M₄N/aceite de oliva/cera de abejas se había disuelto o se había mezclado uniformemente. Se retiró la barra de agitación del vaso de precipitados y se permitió que se enfriara la mezcla de M₄N/aceite de oliva/cera de abejas. Se almacenó la mezcla de M₄N/aceite de oliva/cera de abejas final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz.

Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros lípidos insolubles en agua, tal como, por ejemplo, sustituyendo aceite de oliva en el procedimiento descrito anteriormente por aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de menta piperita, lecitina, u otros agentes de solubilización, y combinaciones de los mismos, y sustituyendo cera de abejas por parafina, PEG 3350, u otros agentes espesantes, y combinaciones de los mismos. También, si se desea, en combinación con cualquiera de los portadores, puede incluirse un agente que potencia la biodisponibilidad, tal como eugenol, cinamaldehído, lecitina, naringenina, naringina y piperina, por ejemplo. Los resultados se muestran en la tabla 16.

Se prepararon 10 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 60 mg/ml en el 85% de aceite de sésamo y el 15% de Tween® 20 tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 8,5 ml de aceite de sésamo a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 1,5 ml de Tween® 20 lentamente hacia el centro del vaso de precipitados. Se añadieron aproximadamente 600 mg de M₄N lentamente a la mezcla de aceite de sésamo/Tween® 20 en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que el M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 durante aproximadamente 2 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Se calentó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Se almacenó la disolución de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz. Si se formaron cristales durante el almacenamiento, pudo calentarse de nuevo la disolución de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 a 60°C, con agitación, sobre una placa magnética caliente hasta que todo el M₄N se disolvió de nuevo en la disolución.

Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N y puede aumentarse o disminuirse la temperatura de calentamiento para lograr la disolución de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros lípidos insolubles en agua combinados con tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos o disolventes orgánicos solubles en agua, tal como, por ejemplo, sustituyendo aceite de sésamo o Tween® 20 en el procedimiento descrito anteriormente por aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de menta piperita, Tween® 80, TPGS, lecitina, PEG 300, PEG 400, monolaurato de PEG 400, glicerol, PVP, PG u otros agentes de solubilización, y combinaciones de los mismos. Los resultados de la solubilidad de M₄N en lípidos insolubles en agua se exponen en la tabla 16.

Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros lípidos insolubles en agua combinados con tensioactivos no iónicos, iónicos o anfipáticos o disolventes orgánicos solubles en agua, tal como, por ejemplo, sustituyendo aceite de sésamo en el procedimiento descrito anteriormente por aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de menta piperita, o aceite mineral y sustituyendo Tween® 20 por Tween® 80, TPGS, lecitina, PEG 300, PEG 400, monolaurato de PEG 400, glicerol, PVP, PG u otros agentes de solubilización, y combinaciones de los mismos. Los resultados de la solubilidad de M₄N en lípidos insolubles en agua y la estabilidad de tales composiciones se exponen en la tabla 16. La estabilidad en referencia a las disoluciones líquidas transparentes en el presente documento se refiere al tiempo que tarda en formarse una precipitación cristalizada en la disolución. Una disolución estable es una que es transparente y está libre de materiales particulados durante un periodo de tiempo prolongado.

La tabla 16 muestra, por ejemplo, que M₄N era soluble en aceite de maíz cuando se calentó a 60°C a concentraciones de hasta 100 mg/ml y, excepto al nivel de 100 mg/ml, M₄N a concentraciones menores permaneció en disolución tras enfriarse, siendo las disoluciones estables durante mucho más de 3 días a las concentraciones de 1 y 10 mg/ml, durante menos de 3 días a los niveles de 20, 40 y 50 mg/ml y durante menos de 1 día al nivel de 60 mg/ml. Además, M₄N era soluble en aceite de oliva a 60°C al nivel de 30 mg/ml pero no permaneció en disolución tras enfriarse.

En aceite de sésamo, M₄N era soluble a temperatura ambiente al nivel de 10 mg/ml. A 60°C, M₄N era soluble hasta la concentración de 50 mg/ml, y permaneció en disolución tras enfriarse. Las disoluciones de 10 mg/ml y 20 mg/ml eran estables a temperatura ambiente durante más de 3 días, la disolución de 30 mg/ml era estable a temperatura

ambiente durante menos de 3 días, y la disolución de 50 mg/ml era estable a temperatura ambiente durante menos de 1 día.

5 En aceite de menta piperita, M₄N era soluble a entre 1 mg/ml y 125 mg/ml. A concentraciones de hasta 20 mg/ml, M₄N era soluble sin calentamiento. Estas composiciones eran estables a temperatura ambiente durante más de 3 días. M₄N era soluble a mayores concentraciones, hasta el nivel de 125 mg/ml, tras el calentamiento a 40°C y permaneció en disolución tras enfriarse. De estas mayores concentraciones de M₄N en aceite de menta piperita, la composición de 40 mg/ml era estable a temperatura ambiente durante más de 3 días.

10 M₄N también se solubiliza en aceite de soja a concentraciones de hasta 50 mg/ml tras el calentamiento a 60°C. De estas, solo la concentración de 10 mg/ml permaneció en disolución tras enfriarse, y esta disolución permaneció estable durante más de 7 días.

M₄N también era soluble en aceite mineral cuando se calentó a 60°C a concentraciones de hasta 200 mg/ml. Las composiciones de 10 mg/ml y 50 mg/ml permanecieron en disolución tras enfriarse. De estas, la disolución de 10 mg/ml era estable durante más de 7 días a temperatura ambiente.

15 En una combinación del 50% de aceite de menta piperita y el 50% de PEG 300, M₄N era soluble hasta 125 mg/ml cuando se calentó a 35°C. Entre los niveles de 40 mg/ml y 60 mg/ml, M₄N permaneció en disolución tras enfriarse y era estable a temperatura ambiente durante más de 7 días. En una combinación del 60% de aceite de menta piperita y el 40% de PEG 300, M₄N era soluble a 60 mg/ml tras el calentamiento a 40°C y permaneció en disolución tras enfriarse. Esta composición era estable a temperatura ambiente durante más de 3 días.

20 Cuando se combinó aceite de menta piperita con PEG 400 al 50% cada uno, M₄N se solubilizó hasta 125 mg/ml cuando se calentó a 40°C. A concentraciones de 40 mg/ml y 60 mg/ml de M₄N, el compuesto permaneció en disolución tras enfriarse y las composiciones eran estables a temperatura ambiente durante más de 7 días. En una combinación del 60% de aceite de menta piperita y el 40% de PEG 400, M₄N se solubilizó a 60 mg/ml tras el calentamiento a 40°C.

25 En una combinación del 50% de aceite de menta piperita y el 50% de Tween® 20, M₄N era soluble hasta 125 mg/ml sometido a prueba tras el calentamiento a 40°C. De estas, M₄N permaneció en disolución tras enfriarse a las concentraciones de 40 mg/ml y 60 mg/ml.

30 En otra combinación, tal como aceite de menta piperita y aceite de sésamo, cada uno al 50%, M₄N era soluble hasta la concentración de 60 mg/ml sometida a prueba. M₄N era soluble a 20 mg/ml a temperatura ambiente, siendo la composición estable a temperatura ambiente durante más de 3 días. Las disoluciones de 40 mg/ml y 60 mg/ml de M₄N permanecieron en disolución tras enfriarse, y eran estables durante más de 3 días a temperatura ambiente.

Aún en otra combinación, que contiene el 33% de aceite de menta piperita, del 33% de Tween® 20 y el 33% de PEG 400, M₄N era soluble a 60 mg/ml cuando se calentó a 40°C, y permaneció en disolución tras enfriarse. Estas composiciones eran estables durante más de 3 días.

35 La tabla 16 también muestra, por ejemplo, que M₄N puede solubilizarse en aceite de soja y prepararse dando lugar a un sólido céreo cuando se combina con cera de abejas. Además, M₄N también puede solubilizarse en aceite de oliva y puede añadirse cera de abejas para convertir la composición en un sólido céreo.

Tabla 16. Solubilidad de M₄N en lípidos insolubles en agua

Excipientes	Concentración de excipiente (en v/v a menos que se declare lo contrario)	Concentración de fármaco (en mg/ml a menos que se declare lo contrario)	Disolución tras rotación	Disolución tras calentamiento	Disolución tras enfriamiento	Tiempo de estabilidad a temperatura ambiente
Aceite de maíz	100%	1	N	S a 60°C	S	> 3 días
		10	N	S a 60°C	S	> 3 días
		20	N	S a 60°C	S	< 3 días
		40	N	S a 60°C	S	< 3 días
		50	N	S a 60°C	S	< 3 días
		60	N	S a 60°C	S	< 1 día
		100	N	S a 60°C	N	
Aceite de oliva	100%	30	N	S a 60°C	N	

ES 2 606 332 T3

Aceite de sésamo	100%	10	S			> 3 días
		20	N	S a 60°C	S	> 3 días
		30	N	S a 60°C	S	< 3 días
		50	N	S a 60°C	S	< 1 día
Aceite de menta piperita	100%	1	S			> 3 días
		10	S			> 3 días
		20	S			> 3 días
		40	N	S a 40°C	S	> 3 días
		60	N	S a 40°C	S	< 3 días
		100	N	S a 40°C	S	< 1 día
		125	N	S a 40°C	S	< 1 día
Aceite de soja	100%	10	N	S a 60°C	S	> 7 días
		30	N	S a 60°C	N	
		50	N	S a 60°C	N	
Aceite mineral	100%	10	N	S a 60°C	S	> 7 días
		50	N	S a 60°C	S	< 1 día
		100	N	S a 60°C	N	
		200	N	S a 60°C	N	
Aceite de oliva, aceite de soja	El 80% de aceite de oliva, el 20% de aceite de soja	60	N	S a 70°C	N	
Aceite de sésamo, Tween® 20 y glicerol	El 75% de aceite de sésamo, el 9% de Tween® 20, el 16% de glicerol	24,3	N	S a 60°C	S	< 7 días
	El 10% de emulsión de aceite en el 90% de solución salina	2,4	S			<1 día
Aceite de sésamo y Tween® 20	El 89% de aceite de sésamo, el 11% de Tween® 20	29	N	S a 60°C	S	> 7 días
	El 10% de emulsión de aceite en el 90% de solución salina	2,9	S			<3 días
	El 85% de aceite de sésamo, el 15% de Tween® 20	40	N	S a 45°C	N	
	El 85% de aceite de sésamo, el 15% de Tween® 20	60	N	S a 55°C	N	

ES 2 606 332 T3

Aceite de menta piperita, PEG 300	El 50% de aceite de menta piperita, el 50% de PEG 300	40	N	S a 35°C	S	> 7 días
		60	N	S a 35°C	S	> 7 días
		125	N	S a 35°C	N	
	El 60% de aceite de menta piperita, el 40% de PEG 300	60	N	S a 40°C	S	> 3 días
Aceite de menta piperita, PEG 400	El 50% de aceite de menta piperita, el 50% de PEG 400	40	N	S a 40°C	S	> 7 días
		60	N	S a 40°C	S	> 7 días
		100	N	S a 40°C	N	
		125	N	S a 40°C	N	
	El 60% de aceite de menta piperita, el 40% de PEG 400	60	N	S a 40°C	N	
Aceite de menta piperita y Tween® 20	El 50% de aceite de menta piperita, el 50% de Tween® 20	40	N	S a 40°C	S	> 3 días
		60	N	S a 40°C	S	> 3 días
		125	N	S a 40°C	N	
Aceite de menta piperita, PEG 400, glicerol	El 40% de aceite de menta piperita, el 40% de PEG 400, el 20% de glicerol	52	N	S a 40°C	N	
	El 45% de aceite de menta piperita, el 45% de PEG 400, el 10% de glicerol	59	N	S a 40°C	N	
Aceite de menta piperita y aceite de sésamo	El 50% de aceite de menta piperita, el 50% de aceite de sésamo	20	S			> 3 días
		40	N	S a 40°C	S	> 3 días
		60	N	S a 40°C	S	> 3 días
Aceite de menta piperita, Tween® 20, PEG 400	El 33% de aceite de menta piperita, el 33% de Tween® 20, el 33% de PEG	60	N	S a 40°C	S	> 3 días

	400					
Aceite de soja, cera de abejas	El 50% de aceite de soja, el 50% de cera de abejas (p/p)	100 mg/g	N	S a 60°C	sólido céreo	
	El 75% de aceite de soja, el 25% de cera de abejas (p/p)	200 mg/g	N	S a 60°C	sólido céreo	
	El 90% de aceite de soja, el 10% de cera de abejas (p/p)	200 mg/g	N	S a 60°C	sólido céreo	
	El 95% de aceite de soja, el 5% de cera de abejas (p/p)	200 mg/g	N	S a 60°C	sólido céreo	
Aceite de oliva, cera de abejas	El 90% de aceite de oliva, el 10% de cera de abejas (p/p)	200 mg/g	N	S a 60°C	sólido céreo	
	El 95% de aceite de oliva, el 5% de cera de abejas (p/p)	200 mg/g	N	S a 60°C	sólido céreo	
Cinamaldehído, aceite de oliva, cera de abejas	Cinamaldehído al 0,4% (v/v), cera de abejas al 5% (p/v), aceite de oliva al 94,5% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 50°C	Sólido cremoso	
Eugenol, cera de abejas, aceite de oliva	Eugenol al 0,5% (v/v)	100 mg/ml	N	S a 50°C	Sólido cremoso	
Aceite de Camelia	100%	50 mg/ml	N	S a 60°C	N	>7 días
		100 mg/ml	N	S a 60°C	Sólido cremoso	

La tabla 17 muestra los resultados obtenidos para la solubilidad de M₄N en disolventes orgánicos solubles en agua EtOH, PG, PEG 300, PEG 400, monolaurato de PEG 400, glicerol, PVP, y determinadas combinaciones de los mismos.

Tabla 17. Solubilidad de M₄N en disolventes orgánicos solubles en agua

Excipientes	Concentración de excipiente (en v/v a menos que se indique lo contrario)	Concentración de fármaco (en mg/ml)	Disolución tras rotación	Disolución tras calentamiento	Disolución tras enfriamiento	Tiempo de estabilidad a temperatura ambiente
Etanol	100%	1	S			> 3 días
		10	N	N a 37°C		
PVP	15% (p/v)	1	N	N a 90°C		
		10	N	N a 90°C		
Propilenglicol	100% (p/v)	1	N	S a 55°C	S	< 1 día
		10	N	S a 55°C	S	< 1 día
		20	N	S a 55°C	S	< 1 día

PEG 400	100%	25	N	S a 50°C	S	< 7 días
		30	N	S a 50°C	S	< 3 días
		40	N	S a 50°C	S	< 1 día
		50	N	S a 60°C	S	< 1 día
		100	N	S a 60°C	N	
	5%	10	N	N a 50°C		
Monolaurato de PEG 400	100%	20	N	S a 50°C	S	> 3 días
		50	N	S a 50°C	S	< 1 día
PEG 300	100%	25	N	S a 50°C	S	< 7 días
		30	N	S a 50°C	S	< 3 días
		40	N	S a 50°C	S	< 1 día
		50	N	S a 60°C	S	< 1 día
		100	N	S a 60°C	N	
	33%	10	N	N a 50°C		
Glicerol	100%	1	N	S a 70°C	N	
		10	N	S a 70°C	N	
		20	N	S a 70°C	N	
Propilenglicol y etanol	Propilenglicol al 40% (p/v), etanol al 10% (v/v)	10	N	N		

Ejemplo 6. Solubilidad de M₄N en tensioactivos no iónicos (ejemplo de referencia)

Se preparó una disolución de 10 ml de TPGS al 20% (p/v) para su uso como agente de solubilización y/o excipiente tal como sigue: se colocaron 8 ml de WFI en un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética caliente y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se calentó el WFI a aproximadamente 95°C durante 5 minutos. Se añadieron dos gramos de TPGS lentamente a otro vaso de precipitados de vidrio, y se calentó a aproximadamente 40°C durante 15 minutos, o hasta que todo el TPGS se había fundido. Se añadió lentamente el TPGS fundido al WFI casi en ebullición, usando una espátula para dirigir el TPGS al centro del vaso de precipitados para impedir que cualquier TPGS se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la disolución de TPGS al 20% durante aproximadamente 24 h o hasta que el TPGS se disolvió completamente tras inspección visual. Entonces se almacenó la disolución final a temperatura ambiente, y se protegió de la luz.

Puede aumentarse o disminuirse a escala este método de preparación de TPGS para obtener el volumen o la concentración deseados de la disolución de TPGS. De manera similar pueden prepararse otras disoluciones de TPGS en combinación con otros tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos, tensioactivos anfipáticos, disolventes orgánicos solubles en agua, u otros agentes de solubilización en el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 18.

Se preparó una disolución de 10 ml de M₄N a una concentración de aproximadamente 60 mg/ml en Tween® 20 tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 10 ml de Tween® 20 a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra de agitación. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 600 mg de M₄N lentamente al Tween® 20 en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que el M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/Tween® 20 durante 2 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Se calentó la mezcla de M₄N/Tween® 20 a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/Tween® 20), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla o disolución de M₄N/Tween® 20 para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Se almacenó la disolución de M₄N/Tween® 20 final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz. Si se iban a formar cristales, podía calentarse la disolución de M₄N/Tween® 20 de nuevo a 60°C durante aproximadamente 1 h, con agitación, sobre una placa magnética caliente o hasta que todo el M₄N se había disuelto de nuevo en la disolución.

Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N y puede aumentarse o disminuirse la temperatura de calentamiento para lograr la disolución de M₄N.

Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otro tensioactivo no iónico, tensioactivos iónicos o moléculas anfífilas, tal como, por ejemplo, sustituyendo Tween® 20 en el procedimiento descrito anteriormente por Tween® 80, otros agentes de solubilización y combinaciones de los mismos. Los resultados de la solubilidad de M₄N en Tween® 20, Tween® 80 y una combinación de Tween® 20 y PEG 400 se muestran en la tabla 18.

La tabla 18 muestra que M₄N era soluble en Tween® 20 o Tween® 80 a una concentración de 1 mg/ml a temperatura ambiente. La disolución de M₄N en Tween® 20 ("M₄N/Tween® 20") era estable a temperatura ambiente durante más de 7 días, mientras que la disolución de M₄N en Tween® 80 ("M₄N/Tween® 80") era estable durante más de 3 días de observación. Concentraciones mayores de M₄N eran solubles en Tween® 20 o Tween® 80 a 50°C. Además, M₄N permaneció en disolución tras enfriar a concentraciones de hasta 60 mg/ml en Tween® 20 o hasta 50 mg/ml en Tween® 80, mientras que se volvía insoluble tras enfriar a los niveles de 80 mg/ml y 100 mg/ml en Tween® 20. Se observó que las disoluciones de M₄N/Tween® 20 de 10 mg/ml y 20 mg/ml eran estables a temperatura ambiente durante más de 7 días. Se observó que las disoluciones de M₄N/Tween® 20 de 40 mg/ml y 80 mg/ml eran estables a temperatura ambiente durante menos de 3 días. Para las disoluciones de M₄N/Tween® 80, se observó que la disolución de 10 mg/ml era estable a temperatura ambiente durante más de 3 días mientras que la disolución de 50 mg/ml era estable a temperatura ambiente durante menos de 1 día.

Los resultados también muestran que M₄N era soluble en una combinación del 50% de Tween® 20 y el 50% de PEG 400, hasta una concentración de 60 mg/ml de M₄N sometida a prueba cuando se calentó a 65°C. M₄N permaneció en disolución en estas formulaciones tras enfriarse, siendo las disoluciones estables a temperatura ambiente durante más de 3 días.

Se sometieron a prueba combinaciones de PEG 400 y Tween® 20 a diversas temperaturas de calentamiento, a la cantidad de tiempo que se le añadió calor, el método y tiempo de enfriamiento y la concentración de fármaco añadido.

Se preparó una disolución de 10 ml empezando con 10 ml de monooleato de glicerol ("glimo") añadido a un vaso de precipitados de vidrio. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra de agitación para agitar a velocidad media. Se calentó hasta 60°C durante 30 minutos para permitir que todo el fármaco se disolviera. Se observó la mezcla para determinar la presencia de cualquier M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de materiales particulados. Se enfrió la mezcla de glimo hasta temperatura ambiente con calentamiento y la mezcla se convirtió en una suspensión. Se almacenó a temperatura ambiente, protegida de la luz. La suspensión permaneció estable durante dos semanas y entonces comenzó a separarse. Puede recombinarse con agitación.

Tabla 18. Solubilidad de M₄N en tensioactivos no iónicos

Excipientes	Concentración de excipiente	Concentración de fármaco (en mg/ml a menos que se declare lo contrario)	Disolución tras rotación	Disolución tras calentamiento	Disolución tras enfriamiento	Estabilidad a temperatura ambiente
TPGS	20% (p/v)	1	N	S a 30°C	Cremoso	
		10	N	S a 60°C	Cremoso	
		125	N	S a 60°C	Cremoso	
		200	N	S a 60°C	Cremoso	
		60	Suspensión			> 3 días
		100	Suspensión			> 3 días
Tween® 20	100% (v/v)	1	S			> 7 días
		10	N	S a 50°C	S	> 7 días
		20	N	S a 50°C	S	> 7 días
		40	N	S a 50°C	S	< 3 días
		60	N	S a 50°C	S	< 3 días
		80	N	S a 50°C	N	
		100	N	S a 50°C	N	
Tween® 80	100% (v/v)	1	S			> 3 días
		10	N	S a 50°C	S	> 3 días
		50	N	S a 50°C	S	< 1 día
Tween® 20, PEG 400	Tween® 20 al 50% (v/v), PEG	30	N	S a 65°C	S	> 3 días

ES 2 606 332 T3

	400 al 50% (v/v)					
		40	N	S a 65°C	S	> 3 días
		50	N	S a 65°C	S	> 3 días
		60	N	S a 65°C	S	> 3 días
Tween® 20, PEG 400, cera de abejas	Tween® 20 al 47,5% (v/v), PEG 400 al 47,5% (v/v), cera de abejas al 5% (p/v)	200 mg/g	N	S a 65°C	Sólido céreo	> 3 días
TPGS. PEG 400	TPGS al 10% (p/v), PEG 400 al 50% (v/v)	50	suspensión			> 7 días
PEG 400, Tween® 20, cinamal-dehído	Cinamaldehído al 0,4% (v/v), PEG 400 al 49,8% (v/v), Tween® 20 al 49,8% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 60°C	S	>4 días
Tween® 20, PEG 400, eugenol	Eugenol al 0,4% (v/v), Tween® 20 al 49,8% (v/v), PEG 400 al 49,8% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 50°C	S	>2 días
Tween® 20, PEG 400, naringina	Naringina al 0,4% (v/v), PEG 400 al 49,8% (v/v), Tween® 20 al 49,8% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 50°C	Suspensión	
		120 mg/ml	N	S a 50°C	Suspensión	
		200 mg/ml	N	S a 50°C	Suspensión	
		300 mg/ml	N	S a 50°C	Suspensión	
PEG 400, Tween® 20, lecitina	Lecitina al 25% (p/v), PEG 400 al 37,5% (v/v), Tween® 20 al 37,5% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 50°C	S	> 14 días
PEG 400, Tween® 20, monoeste-arato de glicerol	Monoeste-arato de glicerol al 3% (p/v), PEG 400 al 48,5% (v/v), Tween® 20 al 48,5% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 80°C	S	>24 horas
PEG 400, Tween® 20, naringenina	Naringenina al 0,3% (p/v), PEG 400 al 49,8% (v/v), Tween® 20 al 49,8% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 50°C	Sólido cremoso	
PEG 400, Tween® 20, aceite de menta piperita, cinamal-dehído	Cinamaldehído al 0,4% (v/v), aceite de menta piperita al 4,6% (v/v), PEG 400 al 47,5% (v/v), Tween® 20 al 47,5% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 60°C	S	>2 días
PEG 400, Tween® 20, aceite de menta piperita	Aceite de menta piperita al 5% (v/v), Tween® 20 al 47,5% (v/v), PEG 400	60 mg/ml	N	S a 80°C	S	>2 días

ES 2 606 332 T3

	al 47,5% (v/v)					
PEG 400, Tween® 20, piperina	Piperina al 0,3% (v/v), PEG 400 al 49,8%(v/v), Tween® 20 al 49,8% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 55°C	Suspensión	>9 días
Tween® 20, PEG 400, cera de abejas	Tween® 20 al 47,5% (v/v), PEG 400 al 47,5% (v/v), cera de abejas al 5% (p/v)	200 mg/g	N	S a 65°C	Sólido céreo	> 3 días
Tween® 20, PEG 400, PEG 3350, cera de abejas	Tween® 20 al 47,5% (v/v), PEG 400 al 47,5% (v/v), cera de abejas al 2,5% (p/v), PEG 3350 al 2,5% (p/v)	60 mg/ml	N	S a 65°C	S	>4 días
Tween® 20, PEG 400, PEG 3350, cera de abejas, naringenina	Tween® 20 al 50,3% (v/v), PEG 400 al 44,6% (v/v), cera de abejas al 2,4% (p/v), PEG 3350 al 2,4% (p/v), naringenina al 0,3% (p/v)	60 mg/ml	N	S a 65°C	S	>4 días
Tween® 20, PEG 400, PEG 3350, cera de abejas, lecitina	Tween® 20 al 50% (v/v), PEG 400 al 40% (v/v), lecitina al 5% (p/v), PEG 3350 al 2,5% (p/v), cera de abejas al 2,5% (p/v)	60 mg/ml	N	S a 60°C	Sólido cremoso	
TPGS, PEG 400	TPGS al 10% (p/v), PEG 400 al 50% (v/v)	50	suspensión			> 7 días
Monooleato de glicerol	100% (p/v)	0,10	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		0,25	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		1,00	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en

ES 2 606 332 T3

						suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		5,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		10,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		12,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		15,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		17,5	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		20,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		25,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante

ES 2 606 332 T3

						hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		30,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		40,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		50,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		60,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		65,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		70,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		80,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede

ES 2 606 332 T3

						volver a mezclarse entre sí
		100,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		200,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
		300,0	N	S a 60°C	Suspensión	Permanece en suspensión durante hasta 10 días. Puede volver a mezclarse entre sí
PEG 400, Tween® 20, monooleato de glicerol	PEG 400 al 25% (v/v), Tween® 20 al 25% (v/v), monooleato de glicerol al 50% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 50°C	N-separada en 2 fases separadas	
	PEG 400 al 30% (v/v), Tween® 20 al 30% (v/v), monooleato de glicerol al 40% (v/v)	60 mg/ml	N	S a 50°C	N-separada en 2 fases separadas	
Mono-estearato de glicerol	Disolución en agua al 15% (p/v)	60 mg/ml	N	N		
Gelucire® 44/14	100%	60 mg/ml	N	S a 60°C	Sólido cremoso	
		200 mg/ml	N	S a 60°C	Sólido cremoso	
		300 mg/ml	N	S a 60°C	Sólido cremoso	
Labrasol®	100%	50 mg/ml	N	S a 60°C	S	> 4 días
		60 mg/ml	N	S a 60°C	S	> 4 días
		70 mg/ml	N	S a 60°C	S	> 4 días
		80 mg/ml	N	S a 60°C	S	> 4 días
		90 mg/ml	N	S a 60°C	suspensión	
		100 mg/ml	N	S a 60°C	suspensión	
		200 mg/ml	N	S a 60°C	suspensión	
Labrafil®	100%	60 mg/ml	N	S a 60°C	S	> 4 días
		200 mg/ml	N	S a 60°C	Sólido cremoso	

Ejemplo 7. (Ejemplo de referencia)

Se determinó el punto de fusión del Tween® 20 al 47,5% (v/v), PEG 400 al 47,5% (v/v), PEG 3350 al 2,5% (p/v),

cera de abejas al 2,5% (p/v) del ejemplo 6 (véase la tabla 18) para varias concentraciones diferentes de M₄N, tal como sigue:

Concentración de M ₄ N	Temperatura de fusión
0%	47,5°C
5%	47,5°C
10%	48°C
20%	55°C
30%	55°C
40%	62°C
50%	62°C

Ejemplo 8. Formulaciones liofilizadas que contienen M₄N en HP-β-CD (ejemplo de referencia)

5 Se prepararon 120 mg de polvo liofilizado de M₄N a una concentración de aproximadamente 185 mg/g (p/p) en HP-β-CD tal como sigue. Se usaron cantidades molares iguales de HP-β-CD y M₄N para aumentar la tasa de complejación entre HP-β-CD y M₄N. Se mezclaron aproximadamente 98 mg de HP-β-CD y aproximadamente 22,2 mg de M₄N entre sí en un tubo de polipropileno de 1,5 ml de tamaño. Se añadieron aproximadamente 0,2 ml de WFI a la mezcla en el tubo de polipropileno que contenía la mezcla de polvo de HP-β-CD/M₄N y se agitó con vórtex durante 1 minuto para producir una suspensión de HP-β-CD/M₄N en agua. Se congeló la suspensión de HP-β-CD/M₄N a -20°C durante 24 horas. Entonces se centrifugó la suspensión de HP-β-CD/M₄N a 1.400 rpm a vacío a 60°C durante aproximadamente 2 horas para eliminar todo el agua de la suspensión. El polvo seco del complejo de HP-β-CD/M₄N pesaba aproximadamente 120 mg. Entonces puede disolverse o resuspenderse este complejo de polvo de HP-β-CD/M₄N en agua u otros agentes de solubilización. Se almacenó el complejo de polvo de M₄N/HP-β-CD final a temperatura ambiente y se mantuvo protegido de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N con otras ciclodextrinas, tal como, por ejemplo, sustituyendo HP-β-CD en el procedimiento descrito anteriormente por otras ciclodextrinas. Los resultados mostrados en la tabla 1 muestran que se obtuvo un complejo de polvo de HP-β-CD/M₄N tras la liofilización de la suspensión de HP-β-CD/M₄N que consiste aproximadamente en el 81,5% de HP-β-CD y el 18,5% de M₄N.

20 Se prepararon 400 mg de polvo liofilizado de M₄N a una concentración de aproximadamente 150 mg/g (p/p) en HP-β-CD/HPMC tal como sigue. Se añadió aproximadamente 1 ml de una disolución de HP-β-CD al 50%/HPMC al 0,5%, preparada tal como se describió anteriormente, a un tubo de polipropileno de 1,5 ml de tamaño. Se añadieron aproximadamente 60 mg de M₄N al tubo de polipropileno que contenía la suspensión de HP-β-CD/HPMC y se agitó con vórtex durante 1 minuto para producir una suspensión de HP-β-CD/HPMC/M₄N. Se congeló la suspensión de HP-β-CD/HPMC/M₄N a -20°C durante 24 horas. Entonces se centrifugó la suspensión de HP-β-CD/HPMC/M₄N a 1.400 rpm a vacío a 60°C durante aproximadamente 5 horas para eliminar todo el agua de la suspensión. El polvo seco del complejo de HP-β-CD/HPMC/M₄N pesaba aproximadamente 400 mg. Entonces puede disolverse o resuspenderse este complejo de polvo de HP-β-CD/HPMC/M₄N en agua u otros agentes de solubilización. Se almacenó el complejo de polvo de M₄N/HPMC/HP-β-CD final a temperatura ambiente y se mantuvo protegido de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N con otras disoluciones de ciclodextrina/celulosa, tal como, por ejemplo, sustituyendo HP-β-CD en el procedimiento descrito anteriormente por otras ciclodextrinas, o sustituyendo HPMC por otras celulosas modificadas. Los resultados mostrados en la tabla 15 muestran que se obtuvo un complejo de polvo de HP-β-CD/HPMC/M₄N tras la liofilización de la suspensión de HP-β-CD/HPMC/M₄N que consiste aproximadamente en el 84% de HP-β-CD, el 1% de HPMC y el 15% de M₄N.

Ejemplo 9. Absorción de M₄N en ratas Sprague-Dawley tras la administración oral de una formulación líquida (ejemplo de referencia)

Se expusieron diez grupos de ratas macho (n = 5 por grupo) (edad = 8-10 semanas) mediante sonda nasogástrica a una única dosis de 500 mg/kg de M₄N en excipiente para determinar el excipiente líquido oral óptimo. Los animales ayunaron durante la noche antes de la dosificación. Los excipientes/la formulación sometidos a prueba fueron: (a) HP-β-CD + HPMC; (b) HP-β-CD + CMC; (c) TPGS; (d) TPGS + PEG 400; (e) Tween® 20; (f) PEG 400 + Tween® 20; (g) PEG 400 + Tween® 20 + aceite de menta piperita; (h) aceite de menta piperita + PEG 400; (i) aceite de menta piperita + Tween® 20; (j) aceite de menta piperita + aceite de sésamo, tal como se muestra en la tabla 19, usando las formulaciones preparadas tal como se describió anteriormente. Se recogió sangre de cada animal por la vena yugular a los siguientes puntos de tiempo: antes de la dosis, 0,5, 1,2 y 3 h tras la dosificación. Se determinaron las concentraciones de M₄N en suero mediante CL/EM/EM, CL significa cromatografía de líquidos, EM significa espectrometría de masas. Este método analiza el M₄N que se ha separado mediante CL, entonces se detecta y cuantifica mediante dos ciclos de EM consecutivos.

50 Tal como se muestra en la figura 3 y tabla 20, la absorción de M₄N varió entre las formulaciones de excipiente. La absorción era la más alta para PEG 400 + Tween® 20, que era mayor que PEG 400 + Tween® 20 + aceite de menta

piperita, que era mayor que aceite de menta piperita + Tween® 20, que era mayor que aceite de menta piperita + PEG 400, que era mayor que aceite de menta piperita + aceite de sésamo, que era mayor que o igual a Tween® 20, que era mayor que o igual a HP-β-CD + CMC, que era mayor que HP-β-CD + HPMC, que era mayor que TPGS, que era mayor que TPGS + PEG 400.

5 En la tabla 20, se indicaron cuatro formulaciones como suspensiones estables: HP-β-CD + HPMC, HP-β-CD + CMC, TPGS y TPGS + PEG 400. El criterio usado para designar a las suspensiones como “estables” era que las suspensiones no mostraron precipitación de su contenido (los componentes no se sedimentaron en el fondo del vaso de precipitados de la suspensión). Las otras formulaciones en el estudio con ratas eran disoluciones líquidas transparentes, no suspensiones, y no tenían ningún componente flotante.

10 Tabla 19. Formulaciones orales para estudios de absorción

GRUPO	DESCRIPCIÓN DEL ARTÍCULO	CONCENTRACIÓN DE M ₄ N
Estudio de excipientes con ratas		
1	HP-β-CD 500 mg/ml, HPMC 5 mg/ml	60 mg/ml*
2	HP-β-CD 500 mg/ml, CMC 5 mg/ml	60 mg/ml*
3	TPGS 200 mg/ml	60 mg/ml*
4	TPGS 100 mg/ml	
5	PEG 400 al 50% (v/v)	60 mg/ml*
6	Tween® 20 al 100% (v/v)	60 mg/ml
7	PEG 400 al 50% (v/v), Tween® 20 al 50% (v/v)	60 mg/ml
8	PEG 400 al 33% (v/v), Tween® 20 al 33% (v/v), aceite de menta piperita al 33% (v/v)	60 mg/ml
9	Aceite de menta piperita al 50% (v/v), PEG 400 al 50% (v/v)	60 mg/ml
10	Aceite de menta piperita al 50% (v/v), Tween® 20 al 50% (v/v)	60 mg/ml
	Aceite de menta piperita al 50% (v/v), aceite de sésamo al 50% (v/v)	60 mg/ml
		*Suspensiones estables
GRUPO DESCRIPCIÓN DEL ARTÍCULO CONCENTRACIÓN DE M ₄ N		
Estudio de excipientes con perros		
1	M ₄ N	polvo
2	HP-β-CD liofilizada	185 mg/g (p/p)
3	TPGS al 20% (p/v)	133 mg/g (p/p)
4	Aceite de soja al 95% (v/v), cera de abejas al 5% (p/v)	200 mg/g (p/p)
5	Aceite de oliva al 95% (v/v), cera de abejas al 5% (p/v)	200 mg/g (p/p)

Tabla 20. Absorción de M₄N en ratas^a tras la administración oral

Excipiente/Formulación	Concentración (ng/ml)			
	0,5 horas	1 hora	2 horas	3 horas
HP-β-CD + HPMC	238±39 ^b	398±89	305±48	482±128
UP-β-CD + CMC	403±116	601±125	470±96	448±94
TPGS	127±45	222±57	216±57	156±36
TPGS + PEG 400	87±14	120±17	77±13	130±45
Tween® 20	424±138	620±211	581±149	371±61
PEG 400 + Tween® 20	1033±287	1300±425	1371±429	1598±379
PEG 400 + Tween®20 + aceite de menta piperita	557±169	1023±335	1404±719	977±546
Aceite de menta piperita + PEG 400	896±228	876±156	832±239	487±133
Aceite de menta piperita + Tween® 20	851±346	502±96	1017±683	1233±722
Aceite de menta piperita + aceite de sésamo	445±193	496±137	657±143	655±264

^a n = 5 machos/grupo

^b los valores se expresan como medias ± errores estándar

Ejemplo 10. Absorción de M₄N en perros Beagle tras la administración oral (ejemplo de referencia)

Se expusieron cinco grupos de perros (n = 2 por grupo, un macho y una hembra) (edad = aproximadamente 6 - 9

5 meses) a una única dosis de 100 mg/kg de M₄N en excipiente para determinar el excipiente sólido oral óptimo. La composición de M₄N en excipiente se encapsuló en cápsulas de gelatina duras de tamaño 12 antes de la administración oral. Los animales ayunaron durante la noche antes de la dosificación. Los excipientes/formulaciones sometidos a prueba se exponen en la tabla 19 y eran: (a) sin excipiente, en el que se encapsuló M₄N; (b) HP-β-CD; (c) TPGS; (d) aceite de soja + cera de abejas; y (e) aceite de oliva + cera de abejas. Se recogió sangre de cada animal por la vena yugular a los siguientes puntos de tiempo: antes de la dosis, 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 4 h, 6 h y 8 h tras la dosificación. Se determinaron las concentraciones de M₄N en suero mediante cromatografía de líquidos combinada con espectroscopía de masas en tándem (CL/EM/EM).

10 Tal como se muestra en la figura 4, la absorción de M₄N varió dependiendo del excipiente/formulación. La absorción era la más alta para la formulación que contenía aceite de oliva + cera de abejas, que era mayor que la que contenía HP-β-CD, que era mayor que la que contenía TPGS, que era mayor que la que contenía aceite de soja + cera de abejas, que era mayor que M₄N sin excipiente.

Aunque los ejemplos anteriores se ilustran con M₄N.

15 Ejemplo 11. Recogida de muestras para la determinación de la farmacocinética de M₄N micronizado y no micronizado tras la administración oral a perros (ejemplo de referencia)

El objetivo de este estudio era evaluar el perfil farmacocinético de M₄N cuando se administra en forma micronizada o no micronizada mediante dosificación por sonda nasogástrica en perros Beagle. Se prepararon los artículos de prueba en monooleato de glicerol a 60 mg/ml. El diseño del estudio se resume en la tabla 21.

Tabla 21. Diseño de estudio para pruebas de M₄N no micronizado y micronizado en perros

Grupo/fase	Número de animales	Artículo de prueba	Vía de la dosis	Nivel de dosis objetivo (mg/kg)	Concentración de dosis objetivo (mg/ml)	Volumen de dosis objetivo (ml/kg)
1/1	3 M, 3 F	M ₄ N no micronizado	Oral	100	60	1,67
1/2	3 M, 3 F	M ₄ N micronizado	Oral	100	60	1,67

M Macho

H Hembra

Nota: Hubo un periodo de lavado de aproximadamente 7 días entre las fases.

20 Se recogió sangre (aproximadamente 2 ml) de una vena yugular en tubos de parte superior roja Monoject de 2 ml que no contenían anticoagulante antes de la dosis y a 0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h y 36 h tras la dosis.

25 La absorción de M₄N se produjo tras la administración de ambas formulaciones. Los parámetros farmacocinéticos medios se presentan en la tabla 22, en la que C_{máx} es la concentración máxima de M₄N absorbida y AUC representa las áreas bajo la curva, en relación con el M₄N total absorbido. La absorción era mayor tras la administración de M₄N micronizado en comparación con M₄N no micronizado. Sin embargo las curvas de concentración tendían a ser más constantes entre animales tras la administración de M₄N no micronizado (figuras 5A y 5B, escalas no logarítmica y logarítmica, respectivamente, que muestran la absorción de M₄N no micronizado; y las figuras 6A y 6B, escalas no logarítmica y logarítmica, respectivamente, que muestran la absorción de M₄N micronizado).

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos medios tras la administración de M₄N

	EM-1421 no micronizado	EM-1421 micronizado
C _{máx} (ng/ml)	3051	4574
Desviación estándar	380	2088
% de CV	12,5	45,8
T _{máx} (h)	3,3	3,7
Desviación estándar	1,0	0,8
% de CV	31,0	22,3
AUC _{0-36 h} (ng*h/ml)	31470	37773
Desviación estándar	5607	9920
% de CV	17,8	26,3
AUC _{infinito}	32572	40113
Desviación estándar	5683	8809
% de CV	17,4	22,0

30 Ejemplo 11. Comparación de farmacocinética oral con alimentación/en ayunas i.v./oral de dos formulaciones de M₄N en perros Beagle

5 El fin de este estudio era evaluar los niveles en suero logrados tras una única dosis de 75 mg/kg de M₄N preformulado administrado por vía oral (mediante sonda nasogástrica o cápsula) en estados de alimentación o en ayunas o administración i.v. Se administró EM-1421 en monooleato de glicerol (“glimo”), M₄N en Tween® 20/PEG 400/naringina (“TPN”), o M₄N en hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD) al 20% en PEG 300 (“CPE”) al 50% a tres perros/sexo. También se administraron glimo y TPN sin concentrar (60 mg/ml) o concentrado (300 mg/g, p/p), tal como se indica en las leyendas de las figuras 7B y 8B.

Todos los animales sobrevivieron a lo largo del estudio. Las observaciones clínicas incluyeron diarrea, emesis y ataxia (se produjo ataxia en 1 hembra tras dosificación i.v. y duró aproximadamente 1 hora).

10 Los niveles en suero de M₄N variaron ampliamente con la formulación y el estado. La tabla 23 resume estos hallazgos. Los niveles en suero eran los más bajos tras la administración con TPN o glimo concentrado. C_{máx} era la más alta tras la administración de TPN (sin concentrar, estado de ayuno) (tabla 23 y las figuras 7A y 8A, escalas no logarítmicas que muestran los niveles en suero de M₄N administrado por vía oral a perros macho y hembra, respectivamente). Las AUC eran las más altas tras la administración de glimo (sin concentrar, estado de ayuno) (tabla 23 y las figuras 7B y 8B, escalas logarítmicas que muestran los niveles en suero de M₄N administrado por vía oral a perros macho y hembra, respectivamente). Las AUC logradas tras la administración oral de glimo (sin concentrar, estado de ayuno) eran del 35% (machos) y el 47% (hembras) de las AUC logradas tras la dosificación i.v., en donde se supone que la dosificación i.v. es el 100% (tabla 23).

Tabla 23. Farmacocinética de M₄N formulado en perros tras una única dosis de 75 mg/kg

Formulación	Administración	Estado	Sexo	C _{máx} (ng/ml)	AUC (ng*h/ml)
CPE	i.v.	Con alimentación	M	37671	134103
CPE	i.v.	Con alimentación	F	40580	137547
TPN	Oral (sonda nasogástrica)	En ayunas	M	6256	20792
TPN	Oral (sonda nasogástrica)	En ayunas	F	8221	41975
TPN	Oral (sonda nasogástrica)	Con alimentación	M	5712	37722
TPN	Oral (sonda nasogástrica)	Con alimentación	F	3144	22758
Glimo	Oral (sonda nasogástrica)	En ayunas	M	5157	46938
Glimo	Oral (sonda nasogástrica)	En ayunas	F	5439	64362
Glimo	Oral (sonda nasogástrica)	Con alimentación	M	2807	24367
Glimo	Oral (sonda nasogástrica)	Con alimentación	F	5300	57168
TPN – Conc.	Oral (cápsula)	En ayunas	M	890	7070
TPN – Conc.	Oral (cápsula)	En ayunas	F	695	9635
TPN – Conc.	Oral (cápsula)	Con alimentación	M	1232	9559
TPN – Conc.	Oral (cápsula)	Con alimentación	F	638	5924
Glimo – Conc.	Oral (cápsula)	En ayunas	M	1020	5092
Glimo – Conc.	Oral (cápsula)	En ayunas	F	1001	13185
Glimo – Conc.	Oral (cápsula)	Con alimentación	M	1851	12890
Glimo – Conc.	Oral (cápsula)	Con alimentación	F	817	10074

20 Ejemplo 12. Estudio farmacocinético de dosis repetida oral (sonda nasogástrica) de M₄N en ratas (ejemplo de referencia)

El fin de este estudio era proporcionar información sobre la farmacocinética de una dosis de 500 mg/kg de M₄N en diez formulaciones de excipiente diferentes. Se asignaron cincuenta ratas macho y hembra CrI:(CD)SD a diez grupos de dosificación, cinco ratas por sexo por grupo. Se prepararon muestras que tenían portadores tal como sigue que se administraron a los siguientes grupos de sujetos:

Grupo I	PEG 400/Tween® 20
Grupo II	PEG 400/Tween20®/naringina
Grupo III	PEG 400/Tween20®/naringenina
Grupo IV	PEG 400/Tween20®/monoestearato de glicerilo
Grupo V	Monooleato de glicerol
Grupo VI	PEG 400/Tween20®/piperina
Grupo VII	PEG 400/Tween20®/PEG3350/cera de abejas/naringina

Grupo VIII	PEG 400/Tween20@/cinamaldehído
Grupo IX	PEG 400/Tween20@/aceite de menta piperita
Grupo X	PEG 400/Tween20@/PEG3350/cera de abejas

Cada formulación de M₄N se administró por vía oral mediante sonda nasogástrica en tres ocasiones. La concentración del M₄N era de 60 mg/ml administrado a un volumen de dosificación de 8,33 ml/kg, basándose en el peso corporal más reciente. Se les dio a las ratas la primera dosis (día 1 de estudio) tras haber ayunado durante la noche seguido por un periodo de lavado de 72 horas (recuperación). El día 5 del estudio (DS 5), se administró la segunda dosis de artículo de prueba a ratas sin ayuno seguido por un periodo de lavado de una semana (recuperación). El DS 6, se sometieron las ratas a una dieta alta en grasas (aproximadamente el 10% de contenido en grasa frente a aproximadamente el 5% en una dieta convencional). El DS 12, se administró la tercera dosis a las ratas que no ayunaron. Se observaron las ratas para evaluar la viabilidad al menos dos veces al día y para observaciones clínicas y aspecto general semanalmente durante el periodo de aclimatación. También se examinaron las ratas para observaciones clínicas, muertes antes de la dosificación y a intervalos aproximadamente de hora en hora durante las primeras cuatro horas tras la dosificación y al final del día laboral normal en el primer día de administración de la dosificación, y a aproximadamente 2 horas en días posteriores de administración de la dosificación. También se registraron estas observaciones una vez al día en días sin dosificación y durante el periodo tras la dosificación. Se registraron los pesos corporales al menos semanalmente durante el periodo de aclimatación, a diario durante la dosificación y el peso final en el sacrificio. Se registraron los valores de consumo de alimento semanalmente durante el periodo de dosificación y en el sacrificio (valor de alimento dejado). En los días 1, 5 y 12 del estudio, se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 0,5 ml cada una) por la vena lateral de la cola de cada rata asignada al estudio. Se registró el tiempo de cada recogida de sangre en los datos sin procesar. Se recogieron muestras de sangre de cada rata en los días 1, 5, y 12 del estudio a los siguientes puntos de tiempo: antes de la dosificación, 15 minutos tras la dosificación, y 1 y 4 horas tras la dosificación. Se transfirieron las muestras a tubos separadores de suero y se centrifugaron en una centrífuga. Se transfirió el suero resultante a tubos de polipropileno marcados con el número de protocolo, número de estudio del promotor, número de rata, número de grupo, nivel de dosificación, día de estudio, intervalo de recogida, fecha de recogida, especie, generación y condiciones de almacenamiento. Todas las muestras se congelaron inmediatamente sobre hielo seco y se mantuvieron congeladas (de -68°C a -78°C) hasta el envío para su análisis.

Todas las ratas sobrevivieron hasta su sacrificio programado. Se produjo una mancha de orina en el pelaje abdominal en cuatro de las cinco ratas hembra a las que se administró PEG 400/Tween@ 20/aceite de menta piperita (grupo IX). Este signo se produjo en los DS 2 a 3 y no persistió. Heces blandas o líquidas fue la única observación clínica que se produjo en al menos unas pocas ratas en cada grupo con la excepción de ratas con PEG 400/Tween@ 20/aceite de menta piperita (grupo IX). Todos los grupos tenían ganancias de peso promedio durante el estudio. Las ganancias de peso para las ratas macho y hembra para los DS 6 a 13 cuando se alimentaron con las dietas altas en grasas siempre fueron menores que para los DS 1 a 6 cuando se alimentaron con la dieta convencional. Las ganancias de peso generalmente eran comparables entre los grupos con la excepción de las ratas hembra en los DS 6 a 13 en los grupos de dosificación de PEG 400/Tween@ 20 y PEG 400/Tween@ 20/PEG 3350/cera de abejas (grupos I y X, respectivamente) que tenían ganancias de peso corporal reducidas. Los valores de consumo de alimento absoluto y relativo eran comparables entre los grupos a lo largo del estudio. No se observaron lesiones macroscópicas relacionadas con las formulaciones de artículo de prueba en la necropsia. Se produjo la absorción de M₄N de todos los vehículos. Los niveles en sangre de ratas con una dieta alta en grasas siempre eran mayores que los logrados con una dieta habitual o tras ayunar. La mayor absorción se produjo en el grupo de PEG 400/Tween@ 20/naringina tras la administración de una dieta alta en grasas. La mayor absorción se produjo en el grupo de PEG 400/Tween@ 20/naringenina tras la administración de una dieta convencional. La mayor absorción se produjo en el grupo de PEG 400/Tween@ 20/aceite de menta piperita tras un estado de ayuno. Los mayores niveles de exposición se lograron generalmente en el plazo de una hora tras la dosis, excepto para la formulación de monooleato de glicerol, que pareció que continuaba aumentando a las cuatro horas tras la dosis.

En conclusión, todas las formulaciones de artículo de prueba se toleraron sin mortalidad y todos los grupos ganaron peso. Heces blandas y líquidas fueron la observación clínica más común pero no se produjo ningún efecto sobre el consumo de alimento para ningún vehículo. Los niveles en sangre de M₄N siempre fueron mayores cuando las ratas se alimentaron con la dieta alta en grasas. La exposición pico se produjo en el plazo de una hora tras la dosificación con la excepción de la formulación de monooleato de glicerol.

Ejemplo 13. Un estudio farmacocinético de microdosis cruzado de tres vías en seres humanos de fase 0 de M₄N marcado con ¹⁴C en ocho sujetos masculinos sanos

Se diseñó este estudio para evaluar la absorción de M₄N cuando se administró a seres humanos como dosis subterapéutica o bien como una única dosis oral en estados con alimentación y de ayuno o bien una única dosis intravenosa (regímenes A - C, respectivamente, en la tabla 24). El estudio era un diseño de estudio cruzado de tres vías en una población objetivo de sujetos masculinos sanos y consistió en tres periodos de estudio de aproximadamente 35 horas de duración, cada uno separado por un periodo mínimo de al menos 7 días entre dosificación. Durante el transcurso de cada periodo de estudio, se tomaron muestras de sangre para farmacocinética en puntos de tiempo especificados tras la dosificación y se recogió orina a lo largo de intervalos de tiempo

predefinidos. Los sujetos pudieron abandonar la unidad clínica tras completarse los procedimientos específicos del estudio a las 24 horas tras la dosis.

En este estudio, se administró M₄N a seres humanos en una cantidad de 100 µg. M₄N estaba ligeramente marcado con ¹⁴C (3,3 kBq por 100 mg) y se administró a voluntarios sanos. Cada administración oral de M₄N consistía en 0,1 mg de M₄N marcado con ¹⁴C y 376,8 mg de monooleato de glicerol en una cápsula de gelatina de tamaño 0. La infusión intravenosa individual de M₄N consistía en M₄N marcado con ¹⁴C 0,1 mg/ml, HP-β-CD al 30% (p/v) y PEG al 25% (v/v) diluido con agua hasta 1 ml para inyección en bolo. Tras la recogida de sangre y orina de cada sujeto, se analizaron las muestras para evaluar el contenido de ¹⁴C usando espectrometría de masas con acelerador (AMS) para determinar la concentración máxima de M₄N (C_{máx}) que se produjo a tiempo T_{máx}, el área bajo la curva (AUC) global que corresponde a la absorción global de M₄N a los tiempos de prueba (AUC_{0-t}) y global (AUC_{0-∞}), la semivida terminal (T_{1/2}) de cada muestra y la biodisponibilidad relativa y global (F_{rel} y F), de la dosis oral de M₄N en comparación con la dosis i.v. de M₄N. Los valores medios ± D.E. de parámetros farmacocinéticos para ¹⁴C se presentan en la tabla 24. Se corrigieron los valores iniciales de M₄N para cualquier M₄N residual que permanecía en los sujetos tras los periodos entre dosificación para no inflar los niveles de M₄N para cualquier dosificación posterior.

Tabla 24. Valores medios ± D.E. de parámetros farmacocinéticos para ¹⁴C (corregidos con respecto al valor inicial)

Parámetro	Régimen A (oral, con alimentación)	Régimen B (oral, en ayunas)	Régimen C (intravenoso)
C _{máx} (pmol/l)	5,94 ± 1,33	9,29 ± 1,40	10,31 ± 1,77
T _{máx} (horas)	2,50 ^a	1,00 ^a	0,08 ^a
AUC _{0-t} (pmol.h/l)	88,0 ± 19,4	117,2 ± 9,2	96,6 ± 9,23
AUC _{0-∞} (pmol.h/l)	625,6 ± 183,7	416,6 ± 142,6	707,7 ± 380,4
T _{1/2} (horas)	96,5 ± 20,7	50,9 ± 22,4	116,2 ± 64,0
F _{rel} (%)	75,1 ± 16,2	-	-
F (%)	91,2 ± 19,1	122,1 ± 14,5	-

^aMediana

- Régimen A: 100 µg de M₄N marcado con ¹⁴C (3,3 kBq) administrados como una única dosis oral tras un desayuno con alto contenido en grasa.
- Régimen B: 100 µg de M₄N marcado con ¹⁴C (3,3 kBq) administrados como una única dosis oral tras un ayuno durante la noche.
- Régimen C: 100 µg de M₄N marcado con ¹⁴C (3,3 kBq) administrados como una disolución intravenosa en bolo de 1 ml tras un ayuno durante la noche.

Para las dosis orales, los valores de C_{máx} para ¹⁴C total eran menores tras la administración oral de 100 µg de M₄N marcado con ¹⁴C tras un desayuno con alto contenido en grasas (C_{máx}=5,94 ± 1,33 pmol/l) que tras la administración oral tras ayuno durante la noche (C_{máx}=9,29 ± 1,40 pmol/l). El T_{máx} tendía a aparecer más tarde en sujetos con alimentación que en sujetos en ayuno. En sujetos con alimentación, T_{máx}, el tiempo de aparición de C_{máx}, era altamente variable y oscilaba entre 1,5 y 24 horas tras la dosis, y en sujetos en ayuno T_{máx} aparecía generalmente 1 hora tras la dosis (intervalo de 0,50 a 2,00 horas). Los valores de AUC_{0-t} eran generalmente inferiores en sujetos con alimentación que en sujetos en ayuno.

Tras la dosis intravenosa apareció la concentración máxima (C_{máx}=10,31 ± 1,77 pmol/l), tal como se esperaba, en el primer tiempo de toma de muestras (0,08 horas tras la dosis) en ocho de los diez sujetos. En dos sujetos, el T_{máx} fue de 0,17 horas tras la dosis. Los valores de AUC_{0-t} para las concentraciones en plasma de ¹⁴C total fueron ligeramente menores tras la única dosis oral en sujetos con alimentación que tras la dosis intravenosa. A la inversa, los valores de AUC_{0-t} correspondientes fueron ligeramente mayores tras la única dosis oral en los sujetos en ayuno que tras la dosis intravenosa.

Las formulaciones del estudio se toleraron bien en administraciones tanto orales como intravenosas. No hubo acontecimientos adversos serios o graves y ningún sujeto abandonó debido a un acontecimiento adverso relacionado con el tratamiento de estudio. No se observaron cambios clínicamente significativos en los signos vitales o ECG.

En conclusión, con respecto a este estudio, la absorción aparente de M₄N era muy alta tras la administración oral en el estado con alimentación y en ayuno. En presencia de alimento, la velocidad y el grado de absorción fueron menores en comparación con el estado en ayuno y el tiempo de aparición de C_{máx} se prolongó en el estado con alimentación. Estas conclusiones se realizan suponiendo que las dosis administradas por vía oral de M₄N marcado con ¹⁴C no se degradaban antes de la absorción.

Ejemplo 14. Estudios adicionales de solubilidad de M₄N en disolventes orgánicos solubles en agua (ejemplo de referencia)

Se evaluó la solubilidad de M₄N en combinaciones de disolventes orgánicos solubles en agua tal como se indica en la tabla 25 hasta 48 horas. Tras 2, 24 y 48 horas de incubación a temperatura ambiente se analizaron las muestras

ES 2 606 332 T3

mediante HPLC de fase inversa ("RP-HPLC") para cuantificar la solubilidad de M₄N. Para preparar muestras de M₄N, se colocaron 200 µl de M₄N 100 mg/ml disuelto en acetona en microtubos de polipropileno de 1,5 ml. Se permitió que se evaporara el disolvente a temperatura ambiente durante 48 horas hasta que las muestras estaban completamente secas.

- 5 Se prepararon las formulaciones con disolvente orgánico miscible en agua en tubos de centrifuga de polipropileno de 15 ml. Se prepararon 10 ml de cada formulación. Se añadió cada disolvente en base al peso usando su densidad respectiva a 25°C. Tras mezclado breve, se filtró cada formulación a través de un filtro de acetato de celulosa libre de tensioactivo ("SFCA") de 0,45 µm a un tubo nuevo de 15 ml. Se mantuvieron las formulaciones a temperatura ambiente hasta que estuvieron listas para usarse.
- 10 Se añadieron 400 µl de cada combinación de formulación (tabla 25, en la que Benz = alcohol bencílico; Crem = Cremophor® EL; DMA = dimetilacetamida; T80 = Tween® 80) al microtubo, permitiendo una solubilidad máxima de M₄N 50 mg/ml. Se evaluó la solubilidad de M₄N mediante RP-HPLC a las 2, 24 y 48 horas de incubación a temperatura ambiente. En cada punto de tiempo, se centrifugaron las muestras durante 2 minutos a 13.000 rpm para sedimentar cualquier M₄N sólido. Tal como se indica en la tabla 25, más de la mitad de las condiciones de formulación examinadas pudieron solubilizar M₄N hasta una concentración de más de 10 mg/ml. La solubilidad de M₄N en glicerol a las 2 y 48 horas no pudo detectarse.
- 15

Tabla 25. Solubilidad de M₄N en disolventes orgánicos miscibles en agua hasta 48 horas

Composición	M ₄ N (mg/ml)		
	Tiempo (h)		
	2	24	48
EtOH al 100%	7,20	7,22	7,91
PG al 100%	1,10	1,33	1,76
100% de PEG300	5,81	10,37	11,52
Glicerol al 100%	XXX	0,08	XXX
Crem al 100%	1,19	7,51	12,48
EtOH al 50%, PG al 50%	3,64	4,15	4,43
EtOH al 50%, PEG300 al 50%	10,94	15,07	16,61
EtOH al 50%, glicerol al 50%	1,14	1,53	1,60
EtOH al 50%, Crem al 50%	13,95	17,58	18,49
EtOH al 50%, T80 al 50%	15,91	19,28	19,68
PG al 50%, PEG300 al 50%	2,65	4,88	5,30
PG al 50%, glicerol al 50%	0,13	0,48	0,51
PG al 50%, Crem al 50%	2,94	6,33	7,20
PG al 50%, T80 al 50%	5,07	8,16	8,41
EtOH al 48%, PG al 50%, Benz al 2%	4,42	4,79	4,92
EtOH al 48%, PEG300 al 50%, Benz al 2%	14,51	15,78	16,49
EtOH al 48%, glicerol al 50%, Benz al 2%	1,25	1,66	1,73
EtOH al 48%, Crem al 50%, Benz al 2%	14,02	18,17	18,51
EtOH al 48%, T80 al 50%, Benz al 2%	16,17	19,55	19,96
EtOH al 44%, PG al 50%, DMA al 6%	4,80	5,48	2,93
EtOH al 44%, PEG300 al 50%, DMA al 6%	15,12	18,61	18,27
EtOH al 44%, glicerol al 50%, DMA al 6%	1,43	1,90	2,01
EtOH al 44%, Crem al 50%, DMA al 6%	14,85	20,42	21,08
EtOH al 44%, T80 al 50%, DMA al 6%	17,72	22,41	23,00
EtOH al 18%, PG al 30%, PEG300 al 40%, T80 al 10%, Benz al 2%	7,84	9,79	10,16
EtOH al 18%, PG al 30%, glic al 40%, T80 al 10%, Benz al 2%	0,58	1,01	1,15
EtOH al 18%, PG al 30%, Crem al 40%, T80 al 10%, Benz al 2%	8,64	11,78	11,86
EtOH al 14%, PG al 30%, PEG300 al 40%, T80 al 10%, DMA al 6%	9,40	10,55	11,30
EtOH al 14%, PG al 30%, glic al 40%, T80 al 10%, DMA al 6%	0,85	1,24	1,48
EtOH al 14%, PG al 30%, Crem al 40%, T80 al 10%, DMA al 6%	9,03	12,08	12,28
EtOH al 28%, PG al 30%, PEG300 al 30%, T80 al 10%, Benz al 2%	8,87	10,19	10,27
EtOH al 28%, PG al 30%, glic al 30%, T80 al 10%, Benz al 2%	1,86	2,22	2,53
EtOH al 28%, PG al 30%, Crem al 30%, T80 al 10%, Benz al 2%	8,98	11,35	11,28
EtOH al 24%, PG al 30%, PEG300 al 30%, T80 al 10%, DMA al 6%	9,91	10,80	10,67
EtOH al 24%, PG al 30%, glic al 30%, T80 al 10%, DMA al 6%	1,63	2,26	2,52
EtOH al 24%, PG al 30%, Crem al 30%, T80 al 10%, DMA al 6%	10,42	11,25	12,48

Ejemplo 15. Solubilidad de M₄N en disoluciones acuosas (ejemplo de referencia)

Se evaluó la solubilidad de M₄N en disoluciones acuosas que contenían o bien hidroxipropil HP-β-CD o bien

5 sulfobutil éter- β -ciclodextrina (SE- β -CD) (Captisol®, CyDex, Inc., Lenexa, KS, EE.UU.) hasta 48 horas a temperatura ambiente descritas anteriormente en el ejemplo 14. Se prepararon diez disoluciones al 50% de HP- β -CD y SE- β -CD en una base de peso con respecto a volumen. Se preparó el M₄N para su uso en las muestras tal como se expone en el ejemplo 14. Se pesaron entre 1,0 g y 5,0 g de cualquier compuesto en un matraz volumétrico de 10 ml en una

10 Tal como se muestra en la tabla 26, la solubilidad de M₄N en WFI, solución salina al 0,9%, dextrosa al 5% (D5W) estaba por debajo del límite de cuantificación del método de RP-HPLC a lo largo de todo el transcurso de este estudio. Obsérvese el aumento de la solubilidad de M₄N como función de la concentración de HP- β -CD y Captisol® y el tiempo.

Tabla 26. Solubilidad de M₄N en disoluciones acuosas hasta 48 horas

Composición	M ₄ N (mg/ml)		
	Tiempo (h)		
	2	24	48
WFI	XXX	XXX	XXX
Solución salina al 0,9%	XXX	XXX	XXX
D5W	XXX	XXX	XXX
HP- β -CD al 10%	0,35	0,45	0,46
HP- β -CD al 20%	0,66	0,91	0,88
HP- β -CD al 30%	1,38	1,97	2,02
HP- β -CD al 40%	1,89	3,01	3,23
HP- β -CD al 50%	2,52	4,95	4,98
Captisol® al 10%	0,48	0,74	0,94
Captisol® al 20%	0,76	1,45	1,39
Captisol® al 30%	1,57	2,87	2,69
Captisol® al 40%	1,42	3,90	4,15
Captisol® al 50%	1,17	4,49	6,41

15 Más de 20 condiciones de formulación que usaban disolventes orgánicos miscibles en agua podían solubilizar M₄N hasta una concentración de más de 10 mg/ml. La solubilidad de M₄N en WFI, solución salina al 0,9%, D5W estaba por debajo del límite de detección del método de RP-HPLC. La solubilidad de M₄N aumenta como función de la concentración de HP- β -CD y Captisol® y el tiempo.

Ejemplo 16. Solubilidad de M₄N en hidroxipropil- β -ciclodextrina (ejemplo de referencia)

20 Se evaluó la solubilidad acuosa de M₄N a diversas concentraciones de HP- β -CD mediante el método indicado por Higuchi y Connors (1965). Brevemente, se pesó con precisión M₄N y se añadió en cantidades que superaban su solubilidad acuosa, se hicieron rotar suavemente (~12 rpm) a temperatura ambiente con disoluciones acuosas de HP- β -CD en concentraciones crecientes (0-350 mmol/l), durante un periodo de 48 horas. Entonces se filtraron las disoluciones de M₄N/HP- β -CD a través de un filtro de SFCA de 0,45 μ m y se analizaron mediante RP-HPLC.

25 Aunque se cree que la mayoría de los complejos de fármaco/ciclodextrina son complejos de inclusión, también se sabe que las ciclodextrinas forman complejos de no inclusión y agregados de complejos que pueden disolver fármacos a través de estructuras similares a micelas. Los perfiles de solubilidad en fase no verificaron la formación de complejos de inclusión, sino que sólo detallaron cómo influye la concentración creciente de ciclodextrina en la solubilidad del fármaco. La formación del complejo M₄N/HP- β -CD no es lineal, pero la determinación precisa de la estequiometría (así como las constantes de estabilidad) no se estudió en los experimentos de este ejemplo, aunque

30 pudo determinarse mediante otros medios tales como RMN o potenciometría.

Ejemplo 17. Estabilidad de M₄N en disoluciones tampón de HP- β -CD/PEG 300

Se evaluó la estabilidad de M₄N 10 mg/ml (preparado en una razón de HP- β -CD al 40%:M₄N en PEG 300 40 mg/ml 75:25) en disoluciones tampón 15 mM tras la incubación a 60°C.

35 Se prepararon disoluciones al 40% tamponadas de HP- β -CD en una base en peso con respecto al volumen. Se preparó el M₄N para su uso en las muestras tal como se expone en el ejemplo 14. Se pesaron 2,0 g de HP- β -CD en matraces volumétricos de 5 ml en una balanza Analytical Plus de OHAUS. Se añadió 1 ml de una disolución tampón 100 mM a cada matraz. Se añadió cantidad suficiente de WFI a cada muestra hasta 5 ml. Tras una incubación de 1 hora a 40°C, se filtraron las preparaciones a través de un filtro de SFCA de 0,45 μ m a un tubo de 15 ml nuevo. Se mantuvieron las preparaciones a temperatura ambiente hasta que estuvieron listas para su uso.

Se colocaron 750 µl de disolución tamponada de HP-β-CD al 40% en microtubos de polipropileno de 1,5 ml. Se añadieron 250 µl de M₄N 40 mg/ml en PEG 300 a cada microtubo permitiendo una solubilidad de M₄N 10 mg/ml. Tras inversión suave de los tubos de muestra, se midió el pH de cada disolución usando un medidor de pH modelo 420A de Orion. Se retiró una alícuota inicial para el análisis mediante RP-HPLC. Entonces se colocaron las muestras de prueba en un incubador Precision a 60°C. Se evaluó la estabilidad de M₄N mediante RP-HPLC. En cada punto de tiempo, se centrifugaron las muestras durante 2 minutos a 13.000 rpm para sedimentar cualquier M₄N sólido.

Tal como se muestra en la tabla 27, se observa una ligera disminución en la concentración de las diversas disoluciones de M₄N tras la incubación de 14 días a 60°C. Los datos de RP-HPLC no revelaron un aumento de impurezas de la muestra que pudiera explicar la magnitud de la disminución en la concentración de M₄N. Sin embargo, se observó un cambio dependiente del pH en las impurezas de M₄N, aunque estas impurezas constituían menos del 0,1% del área del pico total. Se observan pocos o ningún cambio en el pH de la muestra aparente durante el periodo de incubación (tabla 27).

Tabla 27. Estabilidad de M₄N en disoluciones de HP-β-CD/PEG hasta 14 días a 60°C

Composición	M ₄ N (mg/ml)				
	Tiempo (días)				
	0	2	6	10	14
WFI, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,4	10,1	9,9	9,7	9,6
Fosfato 15 mM, pH 3, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,3	10,1	9,6	9,7	9,6
Fosfato 15 mM, pH 4, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,5	10,1	9,6	9,7	9,6
Acetato 15 mM, pH 5, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,6	10,2	9,6	9,7	9,6
Acetato 15 mM, pH 6, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,5	10,1	9,7	9,7	9,6
Fosfato 15 mM, pH 7, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,5	10,3	9,7	9,7	9,7
Fosfato 15 mM, pH 8, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,6	10,4	9,7	9,8	9,6
Fosfato 15 mM, pH 9, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,4	10,2	9,7	9,8	9,7
Borato 15 mM, pH 10, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,5	10,1	9,7	9,6	9,6
Borato 15 mM, pH 11, HP-β-CD al 30%, PEG300 al 25%	10,5	10,3	9,8	9,5	9,4

Se observó una disminución uniforme de la estabilidad independientemente del pH de la muestra aparente o tampón, tal como se indica por una pérdida en la recuperación de M₄N, tras 14 días de incubación a 60°C.

Ejemplo 18. Estabilidad de M₄N en disoluciones de PEG300/HP-β-CD 11-14 mg/ml

Para apoyar las especificaciones de fabricación, este estudio examinó la estabilidad a temperatura ambiente de 24 horas de combinaciones de PEG300/HP-β-CD a concentraciones objetivo de M₄N variables. Se prepararon muestras madre de disoluciones madre de M₄N en PEG 300 al 100% a concentraciones de fármaco de 33-56 mg/ml a 60°C tal como sigue.

Se solubilizó fármaco a granel M₄N hasta concentraciones de 33, 44, 48, 52, 55 y 56 mg/ml (p/p) en PEG 300 usando el procedimiento expuesto en los ejemplos 14 y 17, tras la incubación de al menos 2 horas a 60°C. Fueron necesarias agitación con vórtex vigorosa y mezclado para la solubilización completa de M₄N por encima de 44 mg/ml. Se filtraron las disoluciones madre de M₄N a través de un filtro de SFCA de 0,45 µm y se usaron en el plazo de 30 minutos de la preparación. Por separado, se preparó una disolución de HP-β-CD al 40% (p/v) en WFI estéril y se filtró. Se combinaron combinaciones de la disolución madre de HP-β-CD al 40% y las disoluciones madre de M₄N/PEG 300 en microtubos de polipropileno de 1,5 ml. Se evaluó la solubilidad de M₄N mediante RP-HPLC a las 2 y 24 horas de incubación a temperatura ambiente.

Se añadió la cantidad requerida de disolución madre de M₄N a HP-β-CD al 40% para proporcionar las concentraciones finales de fármaco y excipientes enumeradas en la tabla 28. Se hicieron rotar las muestras suavemente (~12 rpm) a temperatura ambiente. A las 2 y 24 horas de incubación, se centrifugaron las muestras 2 minutos a 13.000 rpm y se retiraron alícuotas de 50 µl para el análisis mediante RP-HPLC. Independientemente del M₄N o la formulación objetivo, se observaron pocos o ningún cambio tras la incubación de 24 horas (tabla 28).

Tabla 28. Estabilidad de M₄N en disoluciones de PEG300/HP-β-CD 11-14 mg/ml

Composición	M ₄ N mg/ml observado	
	t=2 horas	t=24 horas
M ₄ N 11 mg/ml, PEG300 al 25%, HP-β-CD al 30%	11,3	11,3
M ₄ N 12 mg/ml, PEG300 al 25%, HP-β-CD al 30%	11,8	11,6
M ₄ N 13 mg/ml, PEG300 al 25%, HP-β-CD al 30%	12,7	12,7
M ₄ N 14 mg/ml, PEG300 al 25%, HP-β-CD al 30%	13,5	13,5
M ₄ N 11 mg/ml, PEG300 al 33%, HP-β-CD al 27%	11,4	11,3

M ₄ N 11 mg/ml, PEG300 al 20%, HP-β-CD al 32%	11,5	11,4
--	------	------

Las muestras de prueba que contenían M₄N entre 11-14 mg/ml formulado hasta una concentración final de PEG 300 al 25% y HP-β-CD al 30% eran estables tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente.

Ejemplo 19. Estabilidad de M₄N/PEG300 40 mg/ml (ejemplo de referencia)

5 Se evaluó la estabilidad de M₄N 40 mg/ml disuelto en PEG 300 al 100% hasta 24 horas de incubación a 30°C, 45°C y 60°C. Se preparó una disolución madre de M₄N 40 mg/ml en PEG 300 a 60°C, siguiendo el procedimiento expuesto en el ejemplo 18. Posteriormente, se retiraron alícuotas y se incubaron a la temperatura apropiada. Se hicieron rotar las muestras a 450 rpm durante todo el transcurso de la incubación. Se recogieron observaciones visuales y datos de RP-HPLC todo el tiempo. Tal como se muestra en la tabla 29, tras 6 horas de incubación a 30°C, se observaron pequeños cristales en la formulación de M₄N/PEG 300 40 mg/ml, apareciendo más tras 24 horas. La formación de cristales coincidió con una pérdida de M₄N soluble (tabla 30). Las muestras de M₄N/PEG 300 40 mg/ml 10 incubadas a 45°C y 60°C eran estables tras 24 horas de incubación tal como se evaluó mediante observaciones visuales y análisis de RP-HPLC (tablas 29 y 30). No se observaron cambios en la cantidad o los tipos de picos de impurezas a ninguna de las temperaturas de incubación.

TABLA 29. Aspecto visual de muestras de estabilidad de M₄N/PEG 300 40 mg/ml

Condiciones de incubación	Aspecto visual			
	Tiempo (horas)			
	2	4	6	24
30°C	Transparente	Transparente	Pocos cristales pequeños	Muchos cristales pequeños
45°C	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
60°C	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente

15 TABLA 30. Muestras de estabilidad de M₄N/PEG 300 40 mg/ml: Análisis de RP-HPLC

Condiciones de incubación	M ₄ N (mg/ml)			
	Tiempo (horas)			
	0	2	6	24
30°C	39,5	40,8	40,6	37,4
45°C		40,4	39,8	40,6
60°C		39,1	39,2	39,2

Tras 6 horas de incubación a 30°C se observaron cristales pequeños en la formulación de M₄N/PEG 300 40 mg/ml. Tras 24 horas, se observaron incluso más cristales así como una pérdida >5% de M₄N soluble tal como se determinó mediante análisis de RP-HPLC.

20 Las muestras de M₄N/PEG 300 40 mg/ml incubadas a 45°C y 60°C eran estables tras 24 horas de incubación tal como se evaluó mediante observaciones visuales y análisis de RP-HPLC.

Bibliografía

- Ansel, H.C. *et al.* (2004). *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems* eds., 8ª ed., Lippincott Williams & Wilkins.
- 25 Garg, S. *et al.* (2001). *Compendium of Pharmaceutical Excipients for Vaginal Formulations*. *Pharmaceutical Technol. Drug Delivery*. 1 de septiembre de 2001, págs. 14 - 24.
- Gennaro, A.R. (2003). *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª ed., with Facts and Comparisons: DrugfactsPlus. Lippincott Williams & Williams.
- Higuchi T y Connors KA (1965) "Phase solubility techniques", *Adv Anal Chem Instr.* 4, 117-212.
- 30 Hwu, J.R. *et al.* (1998). Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 1. Synthesis, structure identification, and inhibition of Tat-regulated HIV transactivation. *J. Med. Chem.* 41: 2994 - 3000.
- McDonald, R.W. *et al.* (2001). Synthesis and anticancer activity of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and analogues. *Anti-Cancer Drug Design* 16: 261 - 270.
- Rowe, R.C. *et al.* eds. (2003). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 4ª edición. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association.

REIVINDICACIONES

1. Composición para la administración oral a un animal que comprende un principio activo farmacéutico y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que el principio activo farmacéutico comprende tetra-O-metil-NDGA, y el portador comprende polietilenglicol, una ciclodextrina y opcionalmente al menos uno de un agente de solubilización y un excipiente seleccionado del grupo que consiste en: (a) un disolvente orgánico soluble en agua distinto de DMSO; siempre que cuando el disolvente orgánico soluble en agua sea propilenglicol, el propilenglicol esté en ausencia de vaselina blanca, en ausencia de goma xantana y en ausencia de al menos uno de glicerina o glicina, cuando el disolvente orgánico soluble en agua sea polietilenglicol, el polietilenglicol esté presente en ausencia de ácido ascórbico o hidroxitolueno butilado, y cuando el polietilenglicol sea polietilenglicol 400, el polietilenglicol 400 esté presente en ausencia de polietilenglicol 8000; (b) un tensioactivo iónico, no iónico o anfipático, siempre que cuando el tensioactivo sea un tensioactivo no iónico, el tensioactivo no iónico esté presente en ausencia de goma xantana; (c) una celulosa modificada; (d) un lípido insoluble en agua, siempre que cuando el lípido insoluble en agua sea aceite de ricino, el aceite de ricino esté presente en ausencia de cera de abejas o cera de carnauba; y una combinación de cualquiera de los portadores (a) - (d).
2. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende de 0,1 mg a 200 mg del principio activo farmacéutico.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que la composición comprende 10 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 75 mg, 100 mg o 200 mg del agente farmacéutico activo.
4. Composición según la reivindicación 1, en la que el principio activo farmacéutico está presente a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml o de 1 mg/g a 250 mg/g.
5. Composición según la reivindicación 4, en la que el principio activo farmacéutico está presente a una concentración de 1 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 12,5 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml o 175 mg/ml.
6. Composición según la reivindicación 4, en la que el principio activo farmacéutico está presente a una concentración de 20 mg/g, 50 mg/g, 75 mg/g, 100 mg/g, 120 mg/g, 130 mg/g, 140 mg/g, 150 mg/g, 175 mg/g o 200 mg/g.
7. Composición según la reivindicación 1, en la que el disolvente orgánico soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polipropilenglicol, polivinilpirrolidona, alcohol etílico, alcohol bencílico y dimetilacetamida.
8. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol está presente a una concentración del 5% (v/v) al 100% (v/v).
9. Composición según la reivindicación 8, en la que el polietilenglicol está presente a una concentración del 20% (v/v) al 80% (v/v).
10. Composición según la reivindicación 9, en la que el polietilenglicol está presente a una concentración del 50% (v/v).
11. Composición según la reivindicación 9, en la que el polietilenglicol está presente a una concentración del 40% (v/v).
12. Composición según la reivindicación 9, en la que el polietilenglicol está presente a una concentración del 33% (v/v).
13. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol es PEG 300.
14. Composición según la reivindicación 13, en la que el PEG 300 está presente a una concentración del 10% (v/v), el 20% (v/v), el 30% (v/v), el 40% (v/v) o el 50% (v/v).
15. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol es PEG 400.
16. Composición según la reivindicación 15, en la que el PEG 400 está presente a una concentración del 10% (v/v), el 20% (v/v), el 30% (v/v), el 40% (v/v) o el 50% (v/v).
17. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol es monolaurato de PEG 400.
18. Composición según la reivindicación 17, en la que el monolaurato de PEG 400 está presente a una concentración del 20% (v/v) al 50% (v/v).

ES 2 606 332 T3

19. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende una ciclodextrina no modificada o una ciclodextrina modificada.
20. Composición según la reivindicación 19, en la que la ciclodextrina modificada se selecciona del grupo que consiste en hidroxipropil- β -ciclodextrina y sulfobutil éter- β -ciclodextrina.
- 5 21. Composición según la reivindicación 19, en la que la ciclodextrina modificada está presente a una concentración del 5% (p/v) al 80% (p/v).
22. Composición según la reivindicación 21, en la que la ciclodextrina modificada está presente a una concentración del 15% (p/v), el 20% (p/v), el 25% (p/v), el 30% (p/v), el 35% (p/v), el 40% (p/v) o el 50% (p/v).
- 10 23. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende un tensioactivo.
24. Composición según la reivindicación 23, en la que el tensioactivo está presente a una concentración del 5% (v/v) al 100% (v/v).
25. Composición según la reivindicación 24, en la que el tensioactivo está presente a una concentración del 30% (v/v), el 40% (v/v) o el 50% (v/v).
- 15 26. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en polisorbato, succinato de d-alfa-tocoferil-polietilenglicol 1000, un ácido graso esterificado y el producto de reacción de óxido de etileno y aceite de ricino en una razón molar de 35:1.
27. Composición según la reivindicación 25, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 y polisorbato 80.
- 20 28. Composición según la reivindicación 27, en la que el tensioactivo es polisorbato 20.
29. Composición según la reivindicación 23, en la que el polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en PEG 300 y PEG 400.
30. Composición según la reivindicación 29, en la que el tensioactivo es polisorbato 20.
31. Composición según la reivindicación 23, en la que el tensioactivo es un ácido graso esterificado.
- 25 32. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende una celulosa modificada.
33. Composición según la reivindicación 32, en la que la celulosa modificada se selecciona del grupo que consiste en etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa.
34. Composición según la reivindicación 32, en la que la celulosa modificada está presente a una concentración del 0,1% (p/v) al 10% (p/v).
- 30 35. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende un lípido insoluble en agua.
36. Composición según la reivindicación 35, en la que el lípido insoluble en agua se selecciona del grupo que consiste en al menos uno de un aceite, una cera y una emulsión de grasa, siempre que cuando la composición contenga aceite de ricino, no contenga cera de abejas o cera de carnauba.
37. Composición según la reivindicación 35, en la que el lípido insoluble en agua es una emulsión de grasa.
- 35 38. Composición según la reivindicación 37, en la que la emulsión de grasa está presente a una concentración del 10% al 30%.
39. Composición según la reivindicación 37, en la que la emulsión de grasa está presente a una concentración del 20%.
40. Composición según la reivindicación 31, en la que el lípido insoluble en agua es aceite.
- 40 41. Composición según la reivindicación 40, en la que el aceite se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de menta piperita, aceite de soja, aceite de semilla de sésamo, aceite mineral y glicerol.
42. Composición según la reivindicación 40, en la que el aceite está presente a una concentración del 10% al 100%.
- 45 43. Composición según la reivindicación 40, en la que el aceite es aceite de menta piperita.

44. Composición según la reivindicación 43, que comprende además aceite de sésamo.
45. Composición según la reivindicación 40, que comprende además polisorbato 20.
46. Composición según la reivindicación 40, en la que el polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en PEG 300 y PEG 400.
- 5 47. Composición farmacéutica que comprende la composición según la reivindicación 1.
48. Composición según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, hipertensión, obesidad, diabetes, una enfermedad del sistema nervioso central, una enfermedad neurodegenerativa, dolor, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, demencia, enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, una enfermedad inflamatoria, neoplasia premaligna, displasia o una infección.
- 10 49. Composición para su uso según la reivindicación 48, en la que la enfermedad proliferativa es cáncer o psoriasis.
50. Composición para su uso según la reivindicación 48, en la que la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y esclerosis múltiple.
- 15 51. Composición para su uso según la reivindicación 48, en la que la enfermedad es una neoplasia intraepitelial.
52. Composición para su uso según la reivindicación 48, en la que la infección es una infección viral.
- 20 53. Composición para su uso según la reivindicación 52, en la que el virus se selecciona del grupo que consiste en VIH, VLTH, VPH, VHS, VHB, VEB, virus de la varicela-zoster, adenovirus, parvovirus o virus de CJ.
54. Composición para su uso según la reivindicación 48, en la que la composición se administra a una dosis en un intervalo de 10 mg de principio activo farmacéutico por kg de peso del sujeto a 600 mg de principio activo farmacéutico por kg de peso del sujeto.
- 25 55. Composición para su uso según la reivindicación 48, en la que la composición se administra una o más veces a la semana.
56. Composición para su uso según la reivindicación 48, en la que la composición se administra una o más veces al mes.
57. Kit que comprende la composición según la reivindicación 1 e instrucciones para el uso de la misma.

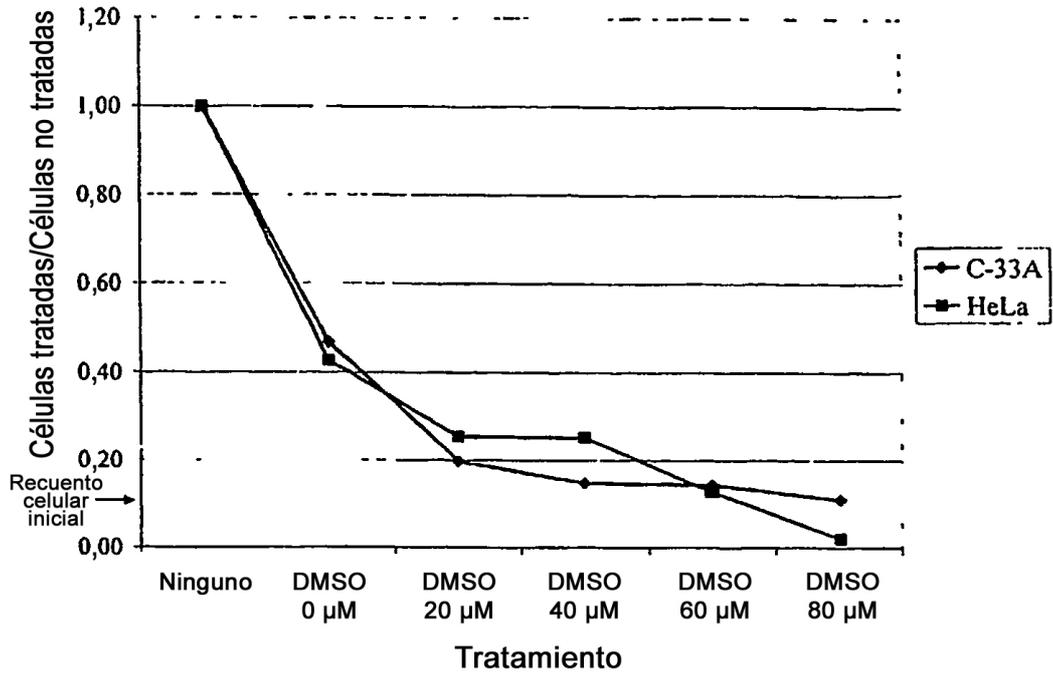


FIG. 1A

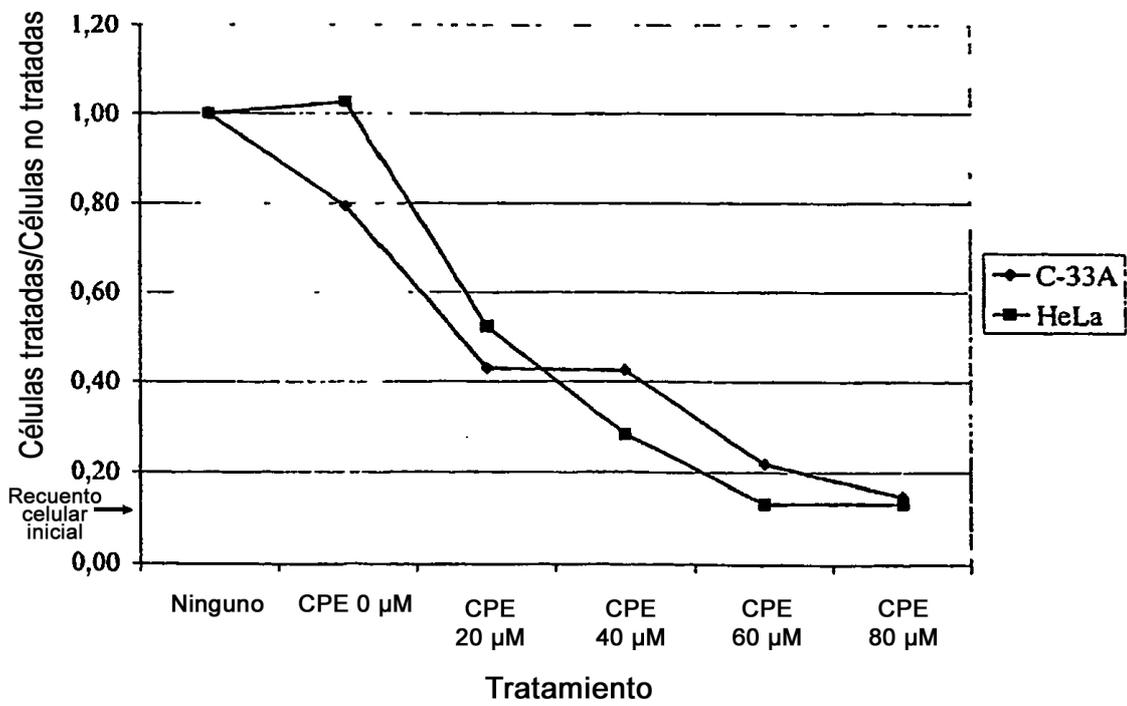


FIG. 1B

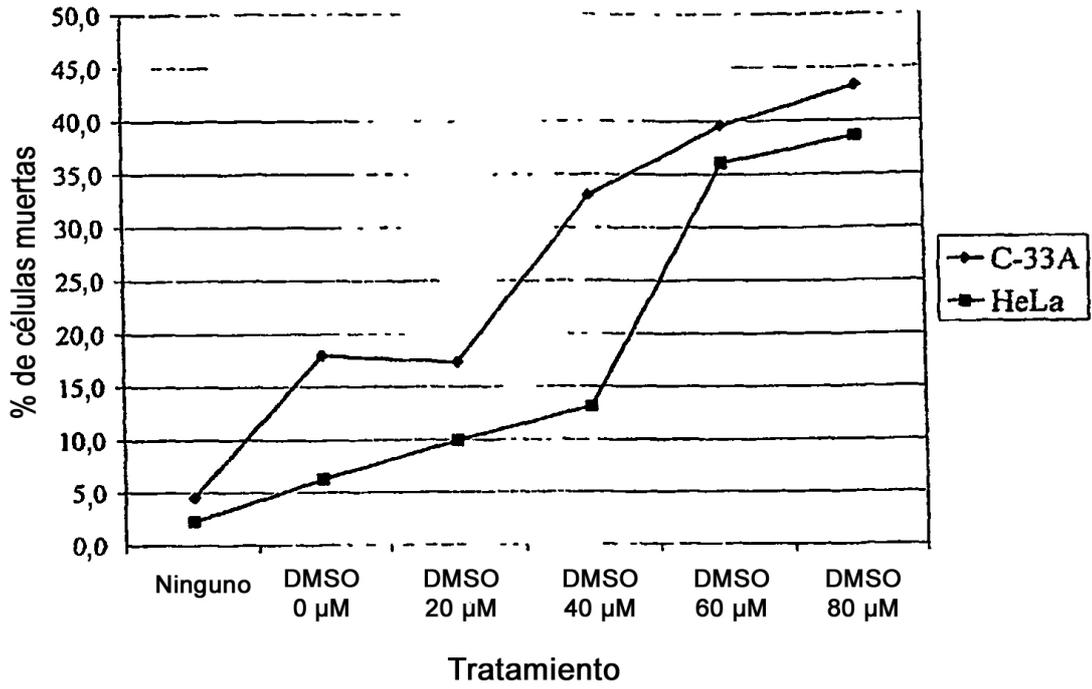


FIG. 2A

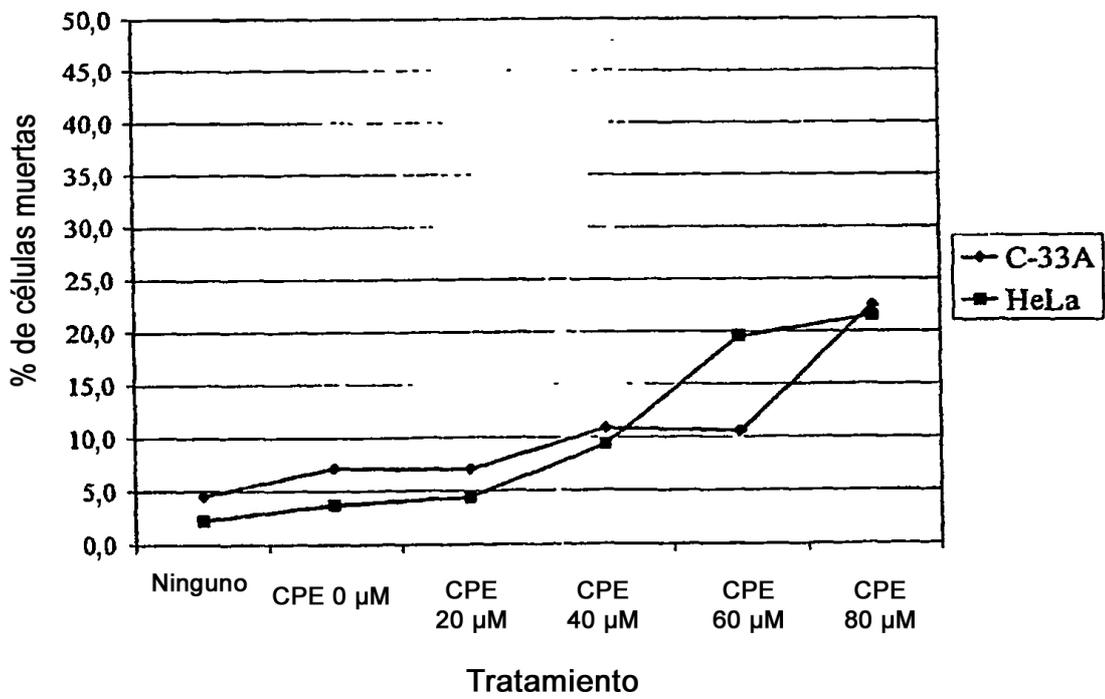


FIG. 2B

Absorción de M₄N en ratas

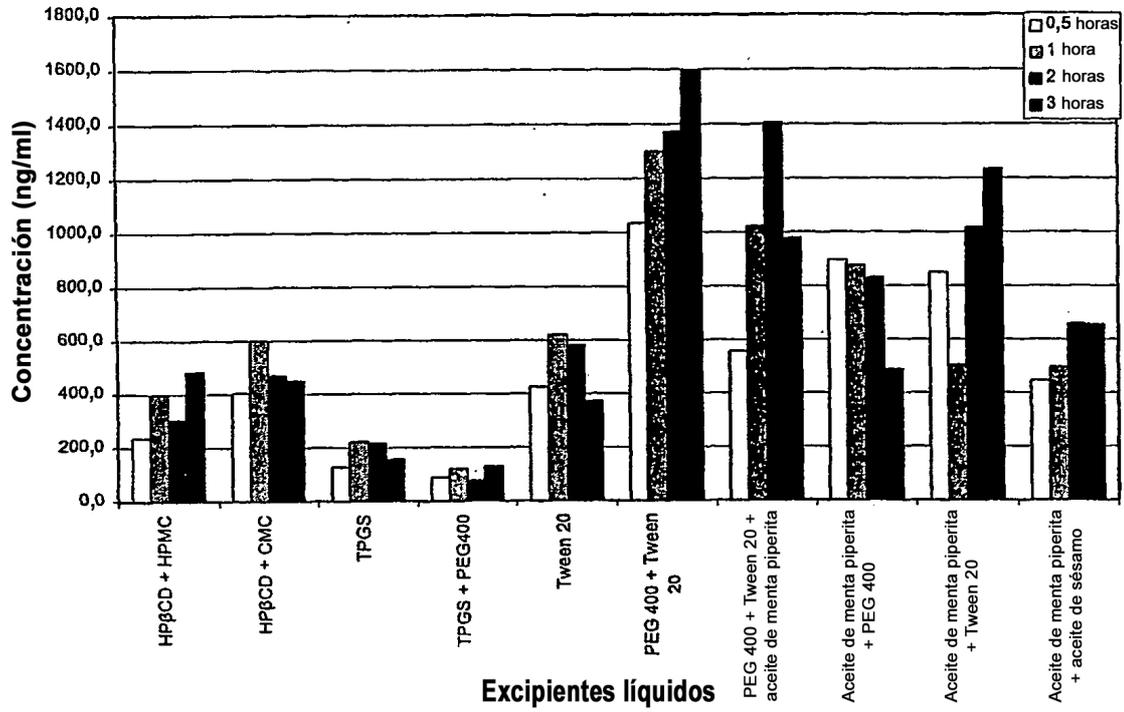


FIG. 3

Absorción de M₄N en perros Beagle

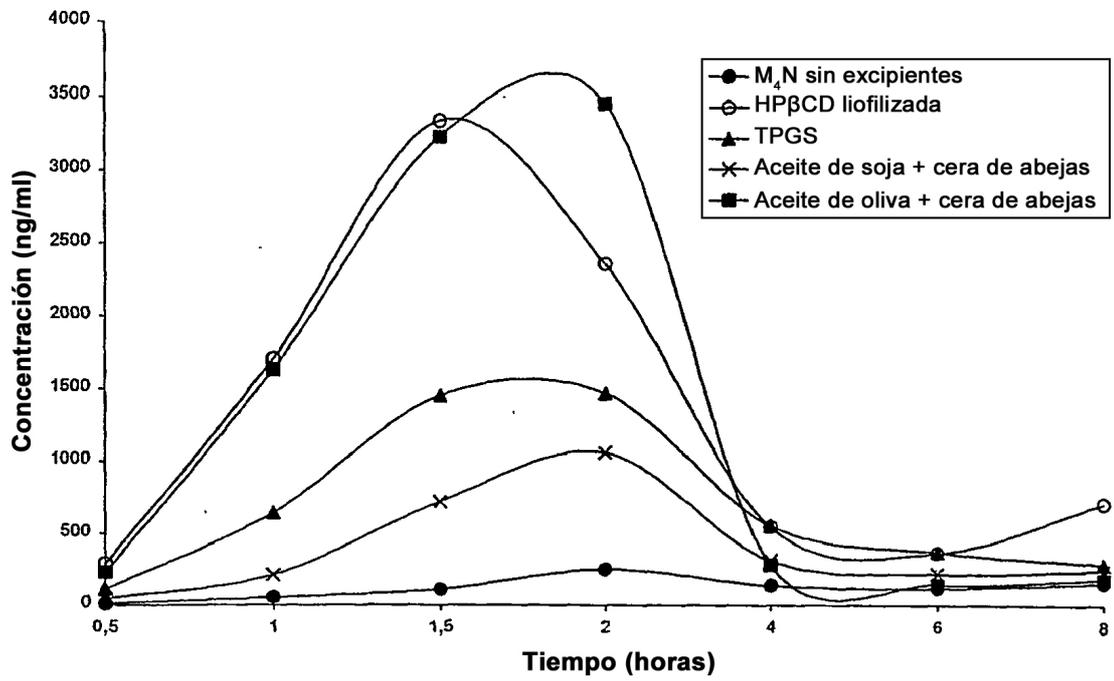


FIG. 4

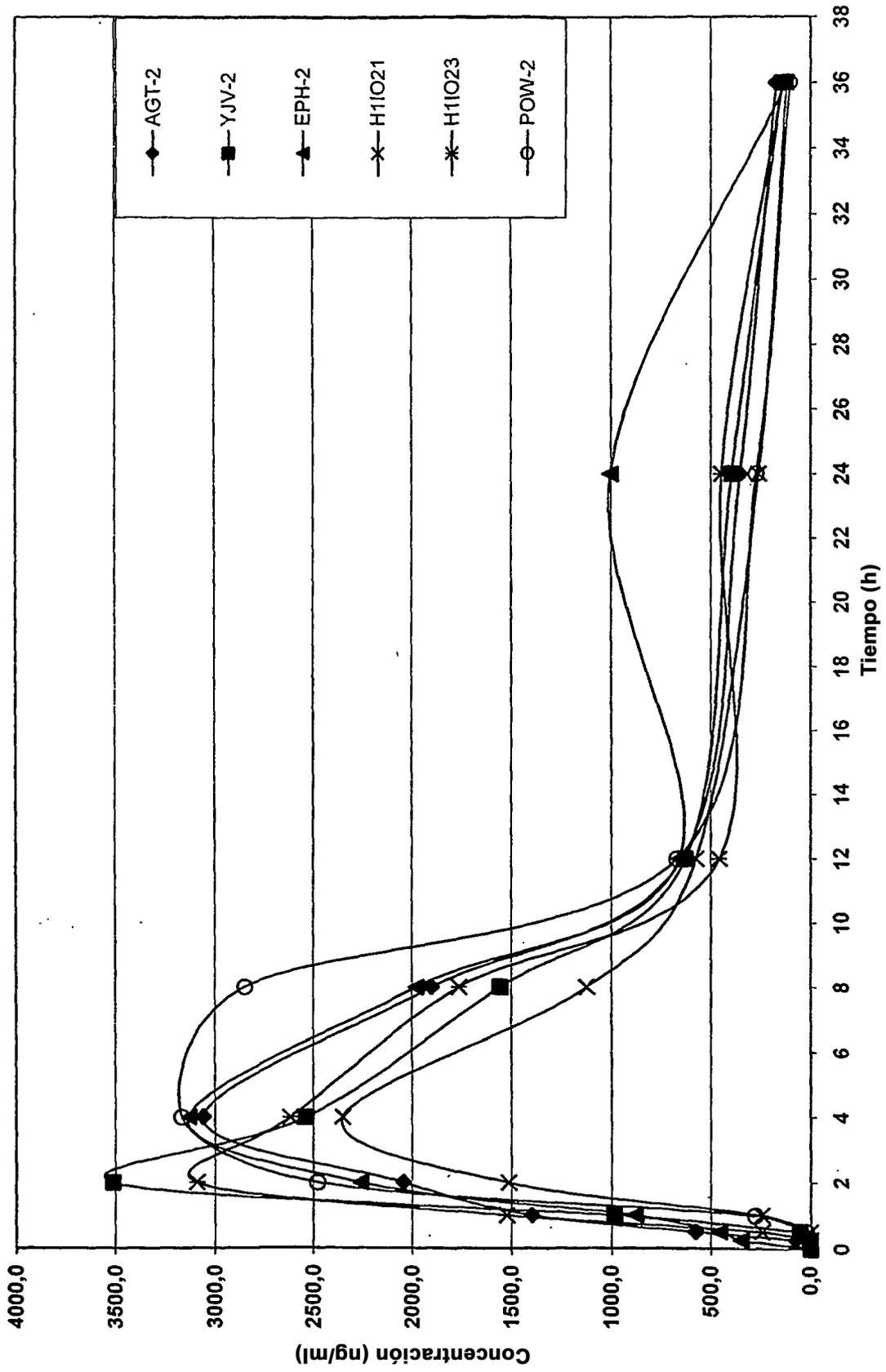


FIG. 5A

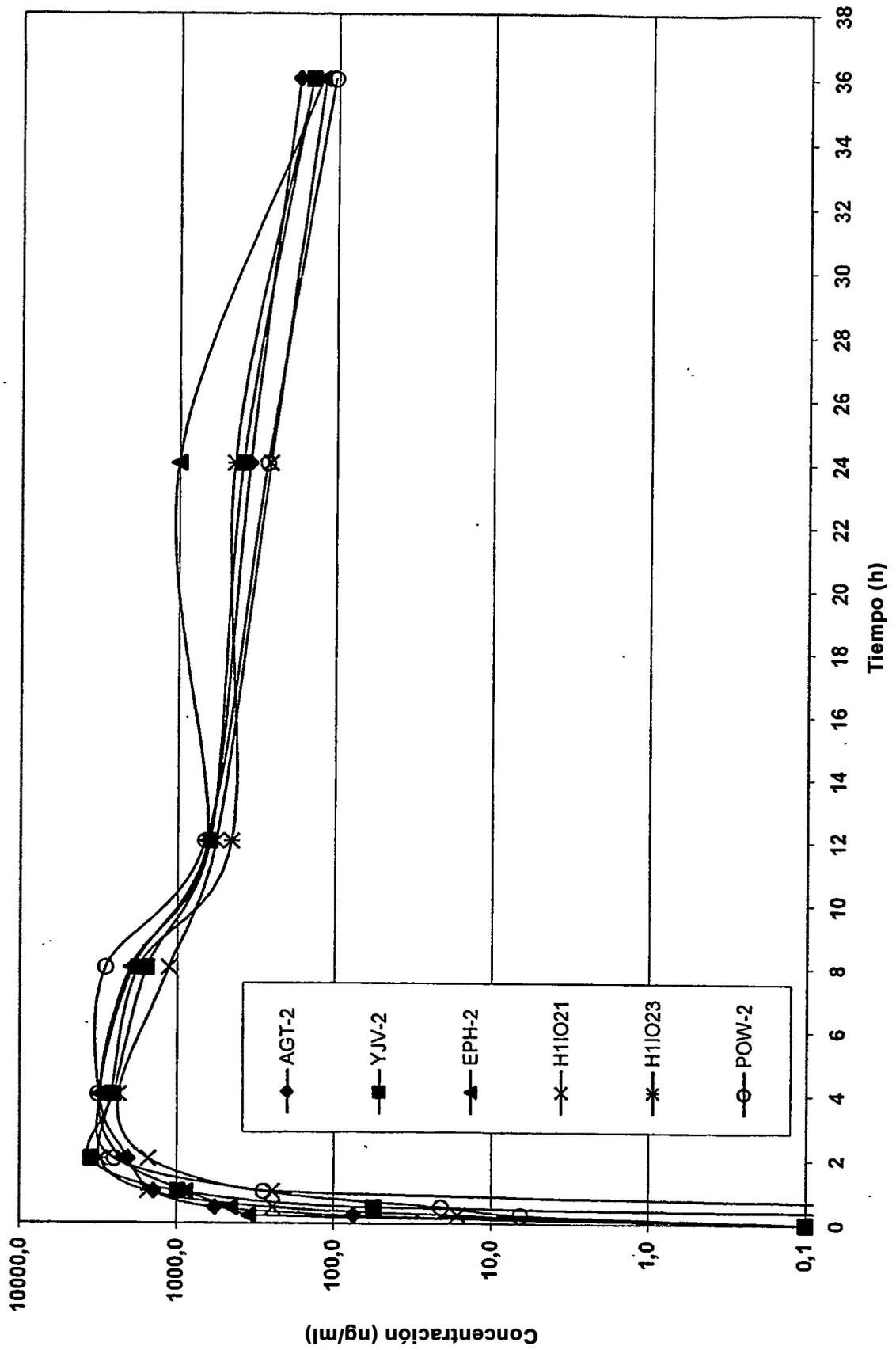


FIG. 5B

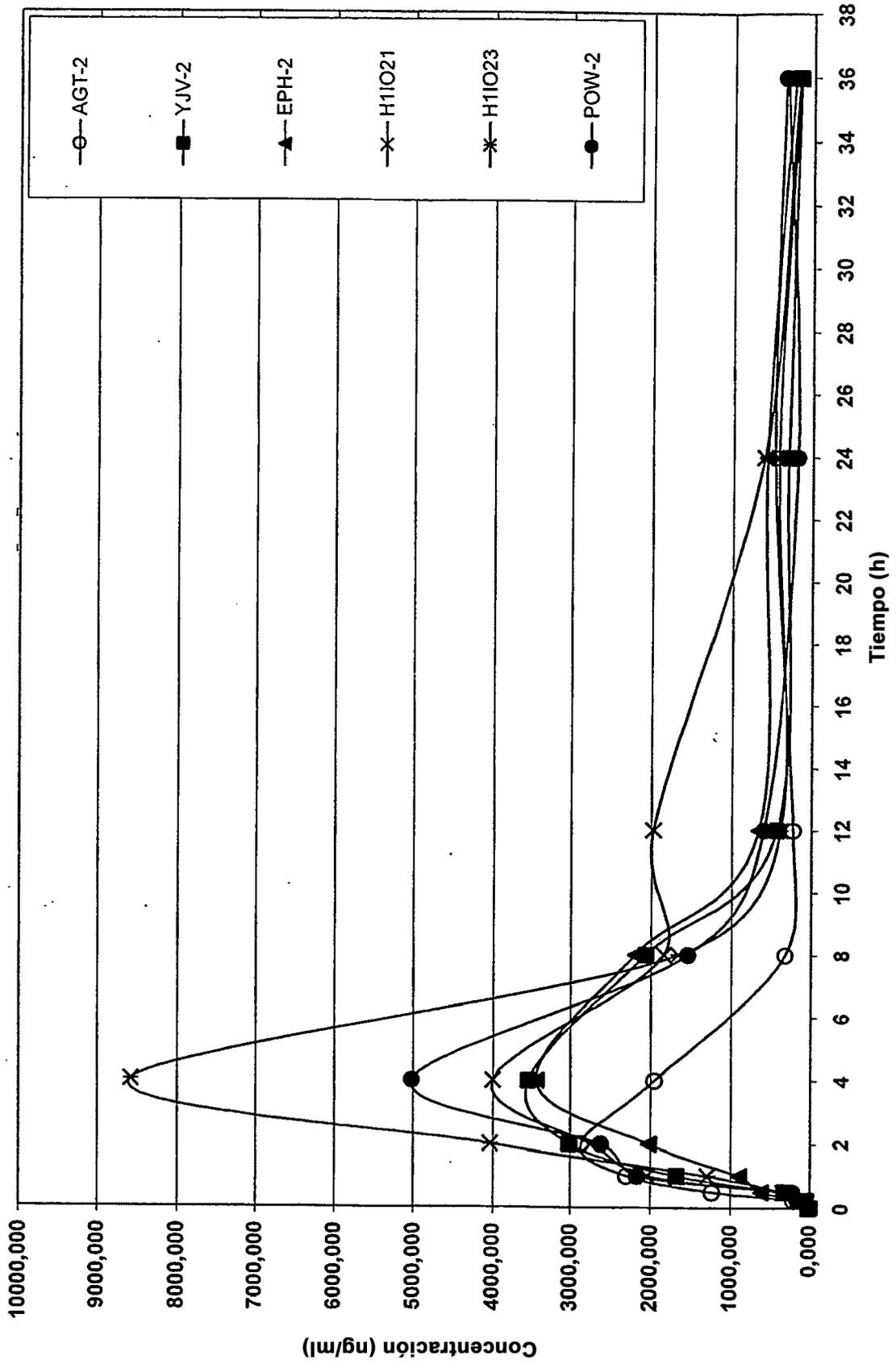


FIG. 6A

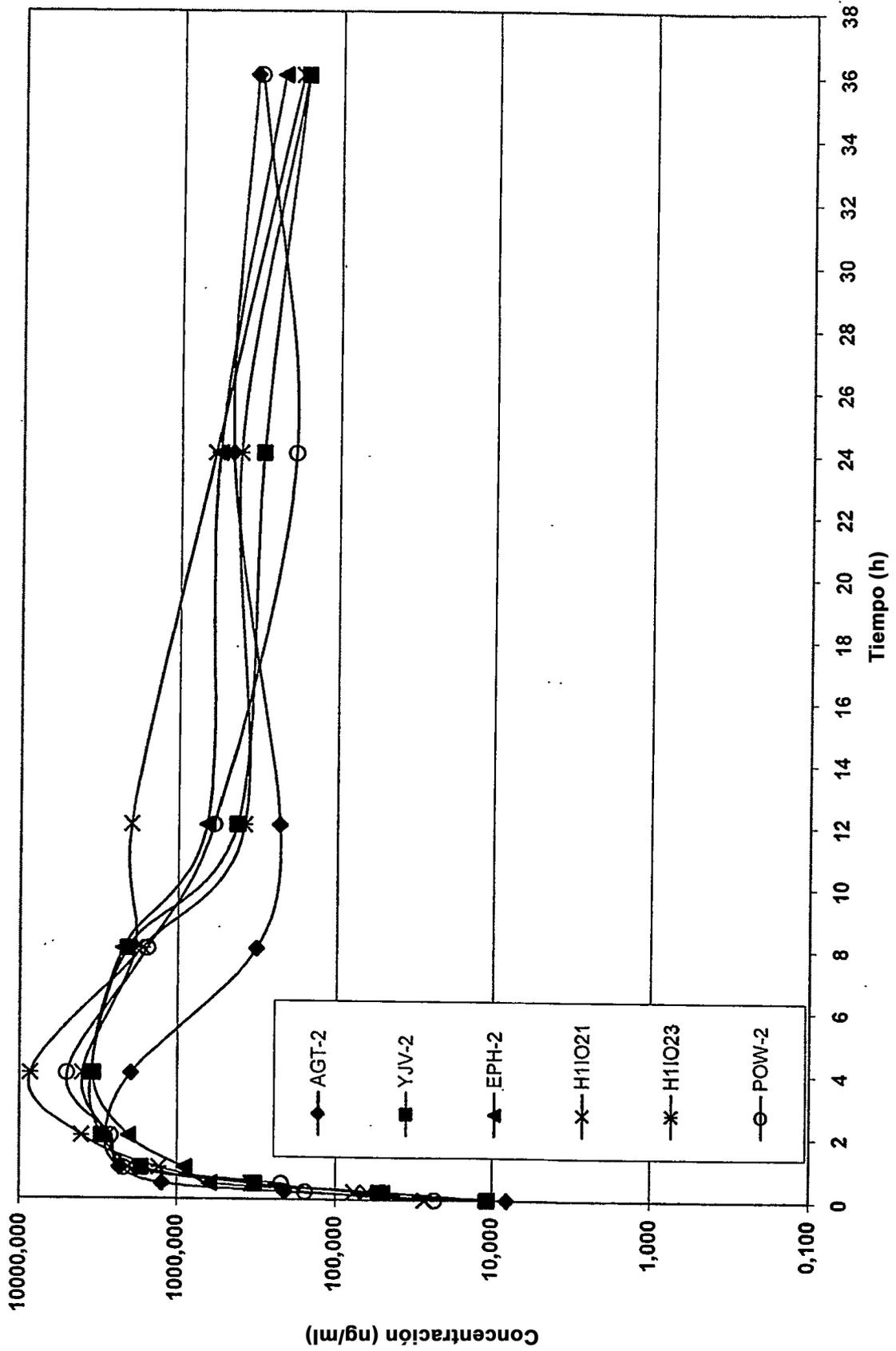


FIG. 6B

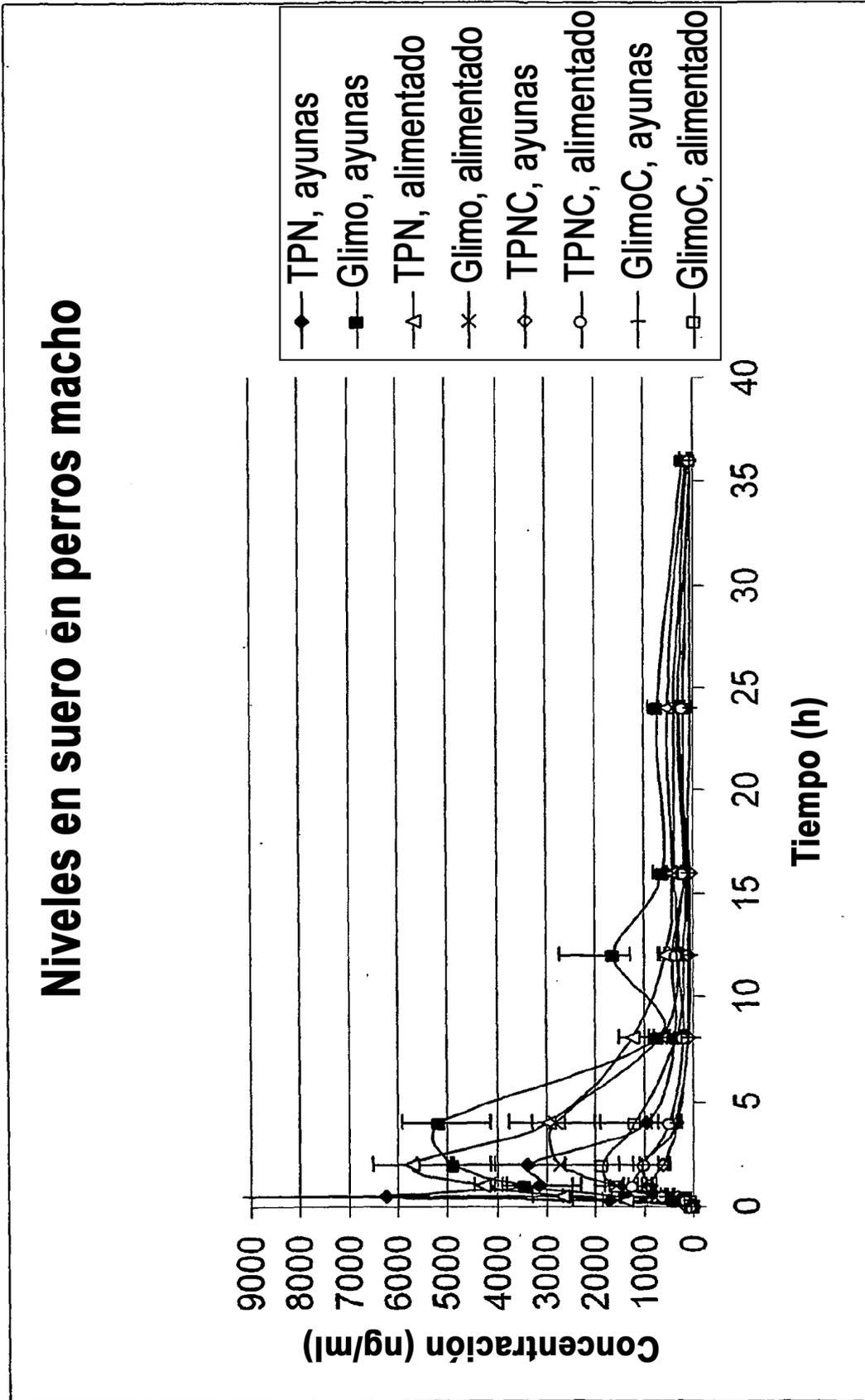


FIG. 7A

Niveles en suero en perros macho tras una única dosis oral de 75 mg/kg (escala log)

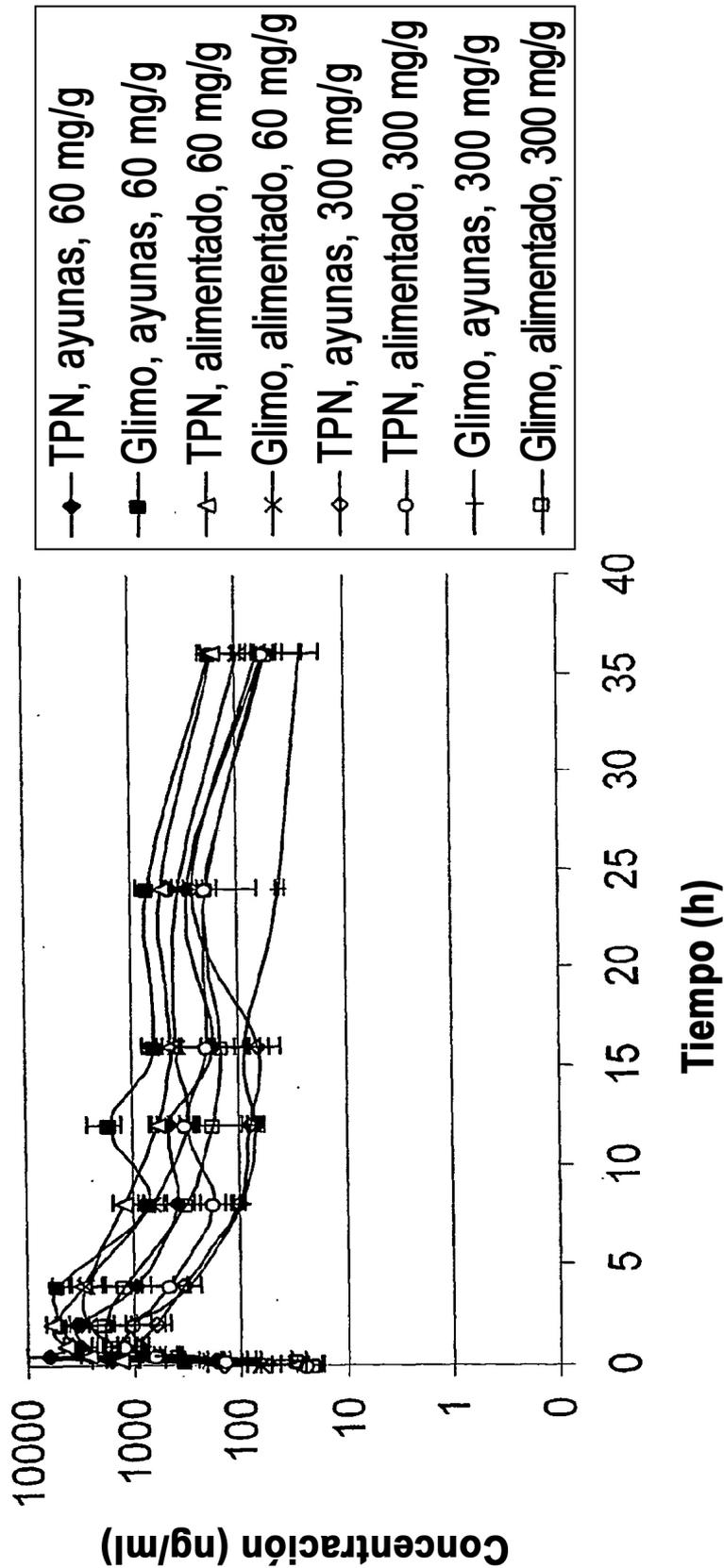


FIG. 7B

Niveles en suero en perros hembra

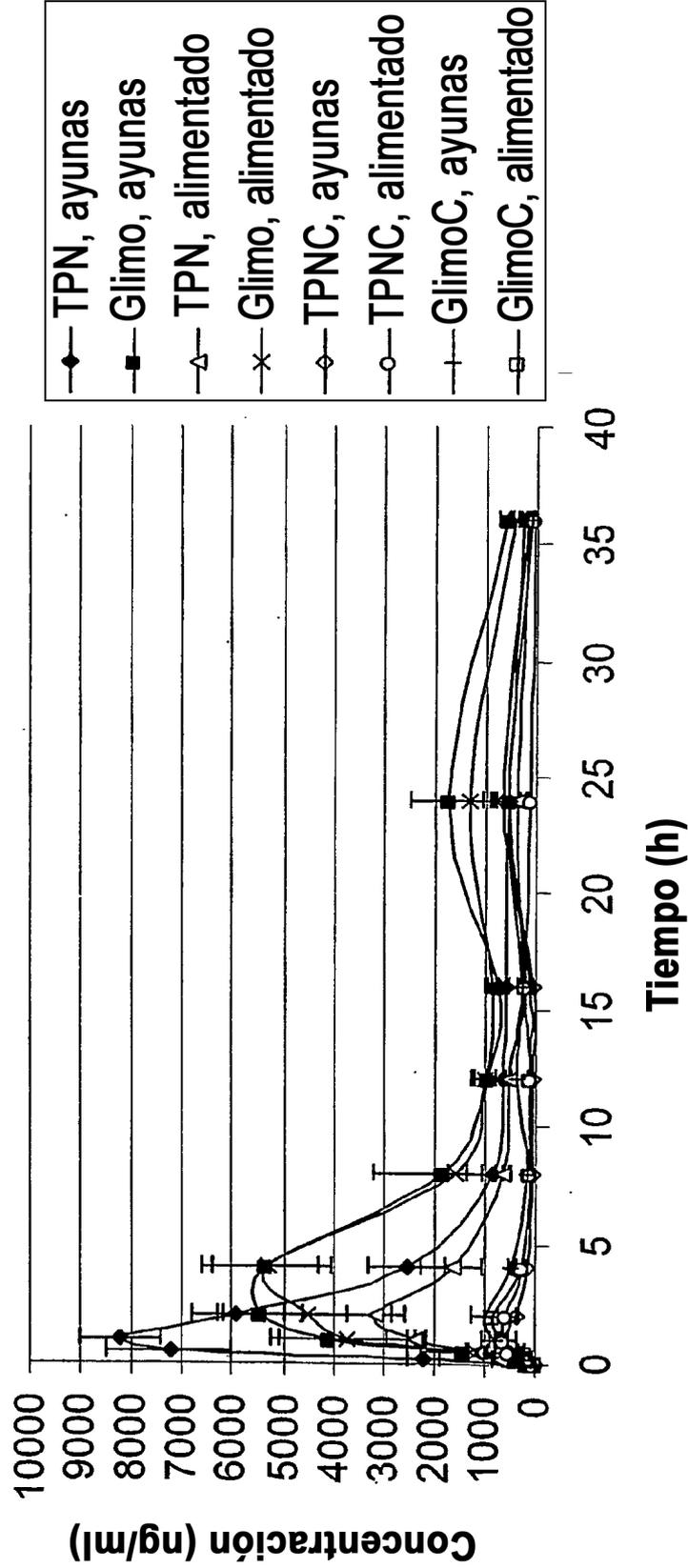


FIG. 8A

**Niveles en suero en perros hembra
tras una única dosis oral de 75 mg/kg (escala log)**

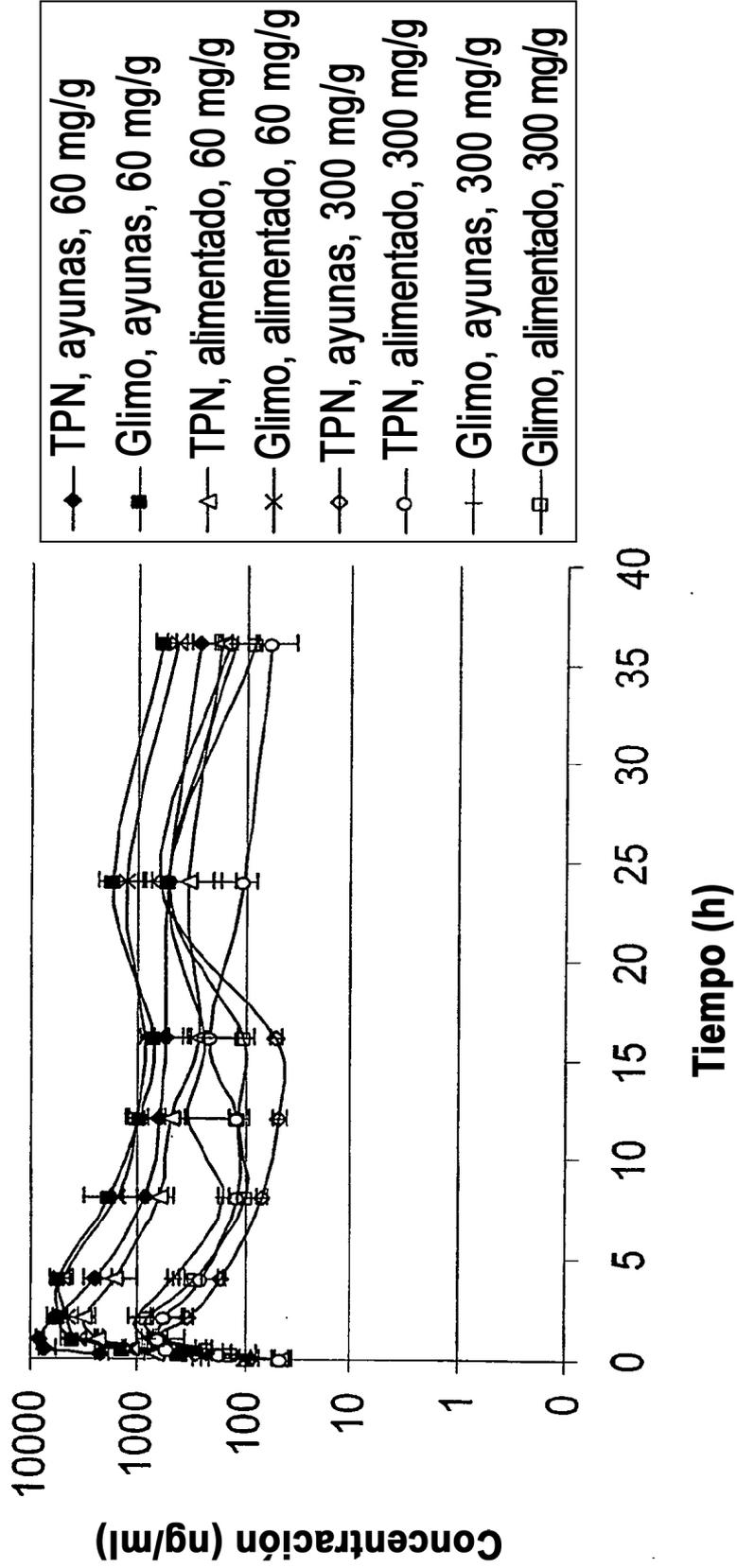


FIG. 8B