



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 369 674**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/185 (2006.01)

A61K 31/215 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 9/28 (2006.01)

A61P 5/16 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07723634 .7**

(96) Fecha de presentación : **27.03.2007**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2004168**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

(54) Título: **Composición farmacéutica oral estable que contiene agonistas de receptor de hormonas tiroideas.**

(30) Prioridad: **28.03.2006 GB 0606212**

(73) Titular/es: **Karo Bio AB**
Novum
141 57 Huddinge, SE
Bristol-Myers Squibb Company

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2011

(72) Inventor/es: **Garg, Neeraj;**
Rao, Venkatramana M.;
Gandhi, Rajesh, B.;
Washburn, William N.;
Koehler, Konrad y
Malm, Johan

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2011

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 369 674 T3

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

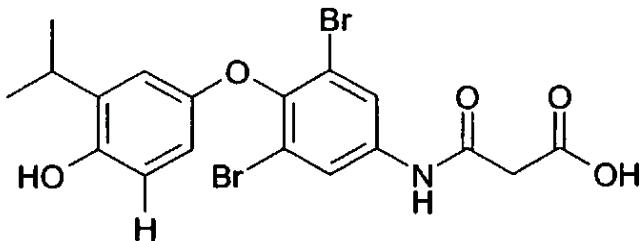
DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica oral estable que contiene agonistas de receptor de hormonas tiroideas

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas. En particular, aunque no exclusivamente, hace referencia a estrategias de formulación para estabilizar los ingredientes farmacéuticamente activos de 5 composiciones farmacéuticas.

Para muchos agentes farmacológicamente activos, se prefiere la vía oral de administración. Sin embargo, con el fin de que tales agentes alcancen la corriente sanguínea del paciente, ellos deben exponerse usualmente a los contenidos de al menos la parte superior del tracto gastrointestinal (es decir, estómago e intestino delgado). Ciertos 10 agentes son sensibles al ambiente ácido del estómago. Tales sensibilidad da como resultado normalmente hidrólisis mediada por ácidos del agente. Se sabe proporcionar composiciones que contienen tales agentes hidrolíticamente sensibles con un revestimiento entérico. Un revestimiento tal comprende generalmente un polímero ácido que está sustancialmente no cargado y es insoluble a pH bajo (es decir en el estómago), pero está ionizado y es más soluble a valores de pH más altos (es decir al pasar dentro del intestino delgado).

El compuesto 1A que tiene la siguiente estructura:



15

Compuesto 1A

se describe en el documento WO 01/60784 (nombre IUPAC: ácido 3-[[3,5-dibromo-4-[4-hidroxi-3-(1-metiletil)-fenoxi]-fenil]-amino]-3-oxopropanoico). El compuesto 1A y una serie de compuestos relacionados se describen como 20 agonistas de receptores de hormonas tiroideas, en particular, del receptor TR β . Tales compuestos deberían ser útiles en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con disfunción metabólica o que es dependiente de la expresión de un gen regulado por triyodotironina (T₃). Tales enfermedades incluyen, por ejemplo, obesidad, hipercolesterolemia, aterosclerosis, arritmias cardíacas, depresión, osteoporosis, hipotiroidismo, bocio, cáncer de tiroides así como glaucoma e insuficiencia cardiaca congestiva.

A la hora de realizar el trabajo de desarrollo de formulación con compuesto 1A, los autores de la presente invención encontraron inesperadamente que estaba teniendo lugar en el compuesto una transformación indeseable. Se estaba 25 produciendo un producto de reacción contenido un grupo nitróxido (-NO₂) en la posición *ortho* con respecto al grupo hidroxilo sobre el anillo fenólico (es decir el anillo a mano izquierda según se representa anteriormente). En la investigación, se encontró que este producto de reacción tenía propiedades alteradas comparado con el compuesto 1A no transformado, incluyendo, sorprendentemente, el potencial para genotoxicidad. Después de examen adicional, 30 se ha encontrado que el producto de reacción era capaz de producirse *in vivo* después de la administración oral. Los autores de la presente invención por lo tanto intentaron conseguir investigar el procedimiento que conduce a la producción del producto de reacción nitrado con el fin de inhibir su formación tras la administración oral.

Se sabe (por ejemplo a partir de Oldrieve y cols., Chem. Res. Toxicol. 1998, 11, 1574), que determinados 35 compuestos flavonoides son capaces de inhibir la nitración de tirosina, o la formación de productos de desaminación de bases a partir de bases del ADN, que tiene lugar en condiciones ácidas en presencia de nitrato. La nitración de ácido hidroxifenilacético y de proteínas en presencia de nitrato y peróxido de hidrógeno en saliva humana *in vitro* ha demostrado ser capaz de inhibición por una especie reductora (Takahama y cols. Arch. Biol. Oral. 2003, 48, 679). Estas revelaciones no permiten a la persona experta predecir, sin embargo, si tales reacciones de nitración pueden 40 tener lugar en otros compuestos, tales como los agonistas de receptores de hormonas tiroideas bien diferenciadas estructuralmente exemplificadas por el compuesto 1A. Además, no darán ninguna indicación de que tales reacciones puedan ser de significancia *in vivo* y no hay ninguna sugerencia para predecir las propiedades potenciales (por ejemplo genotoxicidad) de tales productos de reacción nitrados.

La técnica anterior no revela ni sugiere que los compuestos de unión a receptor de hormonas tiroideas tales como compuesto 1A puedan convertirse en productos de reacción potencialmente tóxicos en administración oral, ni como tal conversión puede ocurrir, ni como un problema tal puede tratarse.

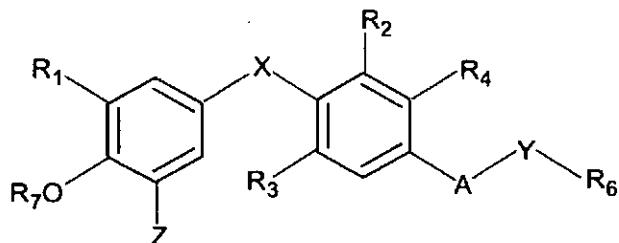
45 Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar composiciones farmacéuticas en las que el problema anterior de nitración de ciertos compuestos de unión al receptor de hormonas tiroideas tras la administración oral

esté atenuado.

De acuerdo con ello, un primer aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica adecuada para administración oral, comprendiendo:

- (i) un compuesto de Fórmula I:

5



Fórmula I

en la que:

Z es H o un grupo alternativo capaz de estar sustituido con NO_2 por medio de una reacción de nitración basada en el nitrito;

10 R₁ se seleccionó a partir de hidrógeno, halógeno, trifluorometilo, o alquilo de 1 a 6 carbonos o cicloalquilo de 3 a 7 carbonos;

X es oxígeno (-O-), azufre (-S-), carbonilo (-CO-), metileno (-CH₂-), o -NH-;

R₂ y R₃ son el mismo o diferentes y son hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 carbonos o cicloalquilo de 3 a 6 carbonos, siendo al menos uno de R₂ y R₃ distinto de hidrógeno;

15 R₄ es hidrógeno o alquilo inferior;

A es oxígeno (-O-), metileno (-CH₂-), -CONR₅-, -NR₅-, o -NR₅CO-;

R₅ es H o alquilo inferior;

R₆ es ácido carboxílico (-CO₂H), o un éster del mismo;

20 Y es - (CH₂)_n, donde n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 y en el que uno o más de los grupos CH₂ puede(n) estar opcionalmente sustituido(s) con halógeno, o Y es -C=C-, lo que puede estar *cis* o *trans*; y

R₇ es hidrógeno, o un grupo alcanoílo o aroílo, u otro grupo capaz de bioconversión para generar la estructura de fenol libre (en la que R₇ = H);

incluyendo todos los estereoisómeros de la misma, o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable de la misma;

25 (ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y

- (iii) un revestimiento entérico.

Los compuestos de Fórmula I son particularmente útiles como agonistas de receptor de hormonas tiroideas. En particular, muchos de tales compuestos muestran actividad potenciada en el receptor TR β (más que en el TR α).

La composición de este primer aspecto de la invención se basa en el sorprendente hallazgo de los autores de la 30 presente invención, como un resultado de las investigaciones mencionadas anteriormente, de que el producto de reacción nitro del compuesto 1A se forma tras la administración oral por medio de una reacción de nitración basada en nitrito. La reacción de nitración basada en nitrito requiere un pH moderadamente bajo (alrededor de 2) con el fin de avanzar. Proporcionando la composición con un revestimiento entérico (es decir uno que permanezca intacto en el estómago ácido y sólo se disuelva al pasar la composición dentro del intestino delgado, donde el pH está mas cerca de ser neutro), la reacción de nitración está significativamente inhibida. La presencia del revestimiento entérico evita la exposición del compuesto farmacológicamente activo de Fórmula I al medio ácido del estómago, evitando de este modo que el reactivo de nitrito se forme en la proximidad de dicho compuesto activo. La consecuencia del revestimiento entérico es por lo tanto que la reacción de nitración en administración oral de un compuesto de Fórmula I está atenuada. Se debería enfatizar de que la motivación de los autores de la presente invención para

entender e intentar para atenuar la reacción de nitración fue la producción inesperada de un producto de reacción nitrado de compuesto 1A durante el trabajo de desarrollo de la formulación. Una reacción de nitración tal tiene lugar también en otros compuestos de fórmula (I) incluyendo por ejemplo el compuesto GC-1 mostrado más adelante. A menos que este producto de reacción nitrado se haya detectado, no habría razón para determinar su genotoxicidad potencial. Sin conocimiento de toxicidad potencial (u otras características indeseables) en un producto de reacción tal, no habría, por supuesto, ningún incentivo para intentar evitar su formación.

La posibilidad de aplicar la presente invención no está limitada a la estabilización de compuesto 1A. Más bien, composiciones de acuerdo con este primer aspecto de la invención deberían experimentar todos un grado de estabilización en virtud de la atenuación de la reacción de nitración que es propensa a ocurrir en la administración oral. La nitración de cualquier compuesto de Fórmula I puede conducir a alteraciones en los perfiles farmacológicos y/o toxicológicos de compuesto, o puede afectar igualmente sus propiedades farmacocinéticas. Los productos de reacción nitro de tales compuestos pueden ser potencialmente genotóxicos. En ciertos casos, las reacciones adicionales en medios ácidos (por ejemplo liberación de anilina, que es potencialmente genotóxica en sí misma), pueden evitarse también. Además, las reacciones de nitración en el anillo no principal (es decir, a mano derecha, como se representa anteriormente) también pueden ocurrir a pH bajo por medio de sustitución aromática electrofílica. El recubrimiento entérico inhibirá o evitará también la formación de estos productos de reacción de nitrógeno. En cualquier caso, la capacidad para controlar y/o evitar tales modificaciones químicas de compuestos de Fórmula I será generalmente una herramienta útil para el formulador.

Las composiciones de acuerdo con el primer aspecto de la invención permiten que los compuestos de Fórmula I sólo se liberen a partir de la composición una vez ha pasado del estómago al intestino, punto en el que los revestimientos entéricos empiezan a disolverse y/o llegan a ser permeables. Puesto que el pH en el intestino no está lo suficientemente bajo, sin embargo, para que la nitración basada en nitrito tenga lugar en algún grado significativo, la nitración de los compuestos de Fórmula I en la administración oral está significativamente atenuada.

El término "alcanoilo" como se emplea en el presente documento solo o como parte de otro grupo es alquilo unido a un grupo carbonilo. El término "aroilo" como se emplea en el presente documento solo o como parte de otro grupo es arilo unido a un grupo carbonilo. A menos que se indique otra cosa, el término "alquilo" o "alq" como se emplea en el presente documento solo o como parte de otro grupo incluye tanto hidrocarburos de cadena lineal como hidrocarburos de cadena ramificada, que contienen 1 a 12 carbonos en la cadena normal, preferentemente 1 a 4 carbonos (en cuyo caso el término "alquilo inferior" puede utilizarse), tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, o isobutilo, pentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetilpentilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo. El término "arilo" como se emplea en el presente documento o como parte de otro grupo hace referencia a grupos aromáticos monocíclicos y bicíclicos que contienen 6 a 10 carbonos en la parte de anillo (tales como fenilo o naftilo incluyendo 1-naftilo y 2-naftilo) y pueden estar opcionalmente sustituidos con átomos de carbono disponibles con 1, 2 ó 3 grupos seleccionados a partir de hidrógeno, halo, alquilo, haloalquilo, alcoxí, haloalcoxí, alquenilo, trifluorometilo, trifluorometoxi, alquinilo, hidroxi, amino, nitro, ciano y/o carboxilo o éster alquílico de los mismos. A menos que se indique otra cosa, el término "cicloalquilo" como se emplea en el presente documento solo o como parte de otro grupo incluye grupos hidrocarburo cíclicos saturados o grupos hidrocarburo cíclicos parcialmente insaturados (que contienen 1 ó 2 dobles enlaces), conteniendo un anillo y un total de 3 a 7 carbonos, preferentemente 3 a 6 carbonos, formando el anillo, lo que incluye ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclopentenilo y ciclohexenilo. El término "halógeno" o "halo" como se usa en el presente documento sólo o como parte de otro grupo hace referencia a cloro, bromo, flúor y yodo así como a CF_3 , con cloro o bromo prefiriéndose.

El grupo alternativo capaz de estar sustituido con NO_2 por medio de una reacción de nitración basada en el nitrito puede estar seleccionado por ejemplo a partir de halo (por ejemplo yodo, cloro, bromo o flúor, con el primero preferido) y pseudo halógenos (por ejemplo SCN, OCN, NCS, NCO y N_3).

El revestimiento entérico se forma preferentemente usando cualquier polímero comercialmente disponible producido para un propósito tal. Como ejemplos de tales polímeros, se pueden mencionar aquellos aquellos basados en acrilatos, metacrilatos o copolímeros de los mismos (tales como de polímeros de revestimiento entérico comercializados con el nombre Eudragit® por Degussa/Roehm), ftalato acetato de polivinilo, ftalato acetato de celulosa, succinato acetato de hidroxipropilmetyl celulosa, ftalato de hidroxipropilmetylcelulosa, succinato acetato de hidroximetilcelulosa y carboximetiletilcelulosa. En una realización particular, el revestimiento entérico comprende un copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo. Los monómeros constituyentes de un copolímero tal pueden estar presentes en la proporción 1:1. El revestimiento entérico también contiene preferentemente un componente deslizante, tal como talco. Un plastificante puede incluirse también ventajosamente. Un plastificante adecuado es citrato de trietilo.

La composición revestida entéricamente se formula preferentemente de tal forma que el 5% o menos, más preferentemente sustancialmente nada, del compuesto de Fórmula I se libera en al menos una hora, más preferentemente dos horas, lo más preferentemente tres horas, cuando la liberación se mide en un aparato de disolución USP II bien en 900 ml o bien en 500 ml de fluido gástrico simulado o bien en HCl 0,1 N a 37°C con una velocidad de agitación de 50 revoluciones por minuto. En realizaciones preferidas, al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95% y lo más preferentemente sustancialmente

todo el compuesto de Fórmula I se libera, preferentemente en el plazo de 1 hora, más preferentemente en el plazo de 45 minutos, cuando se lleva a cabo la medida en medio tamponado a pH 6,8 (por ejemplo fluido intestinal simulado de pH 6,8).

- 5 En algunas circunstancias, puede ser preferible para un revestimiento inerte proporcionarse entre esa parte de la composición que contiene el compuesto de Fórmula I y el revestimiento entérico (iii). Los revestimientos entéricos están típicamente compuestos de polímeros ácidos y así, por su propia naturaleza tienen el potencial de cambios deletéreos en ciertos ingredientes activos. Un revestimiento inerte interpuesto (realizado a partir de, por ejemplo, un derivado de celulosa, tal como hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetylcelulosa) tiende a inhibir tales interacciones.
- 10 El revestimiento inerte debería, por supuesto, ser soluble (o de lo contrario dispersable) en los medios intestinales con el fin de permitir liberarse al compuesto de Fórmula I.

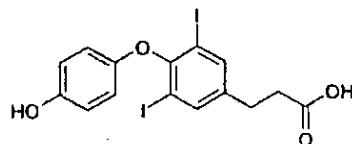
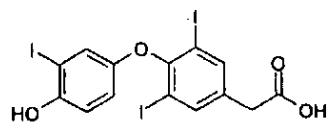
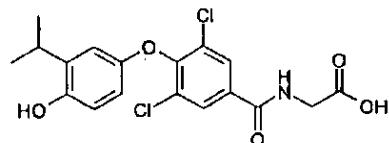
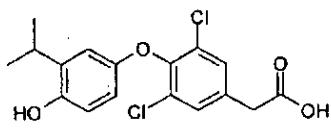
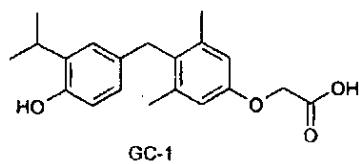
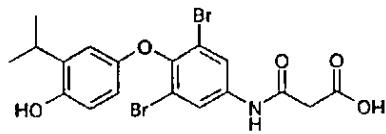
El término 'revestimiento entérico' como se usa en el presente documento pretende incluir revestimientos aplicados a una composición/forma de dosificación (por ejemplo un comprimido) una vez que la forma de dosificación está esencialmente completa y aquellos aplicados en fases intermedias de elaboración de forma de dosificación. Así, se incluyen composiciones en las que el compuesto de Fórmula I se formula con excipientes en gránulos que se dotan de revestimiento entérico después, antes de procesamiento adicional, tal como compresión en comprimidos o carga en cápsulas, por ejemplo en cápsulas de gelatina. Igualmente, una aproximación tal como aquella descrita en el documento WO 00/22909, aunque menos preferida, puede ser adecuada para la preparación de composiciones de acuerdo con el primer aspecto de la invención para ciertos compuestos de Fórmula I. En esta aproximación, los complejos entre ingredientes farmacológicamente activos y ácidos carboxílicos relativamente hidrófobos (por ejemplo ácidos carboxílicos alifáticos C₉ a C₃₀) se preparan por co-precipitación a partir de solución por ajuste de pH.

20 En ciertos compuestos de Fórmula I, X es oxígeno o -CH₂- . Alternativamente o además, A puede ser -NH-, -O-, -CH₂- o -CONR₅- . En algunos compuestos preferidos de Fórmula I, R₁ es isopropilo, yodo o H. Además o alternativamente, puede preferirse que R₂ y R₃ sean cada uno independientemente halógeno o alquilo. En un caso tal, R₂ y R₃ son preferentemente cada uno independientemente Cl, Br, I o metilo. En ciertas realizaciones preferidas, R₂ = R₃. R₂ = R₃ = Br o Cl se prefieren especialmente.

En compuestos de Fórmula I, R₄ es preferentemente H o metilo, con H particularmente preferido.

En determinados compuestos de Fórmula I, Y es -(CH₂)_n- y n es 1 ó 2. Alternativamente o además, A puede ser -NR₅CO-, con R₅ siendo H. En compuestos particularmente preferidos de Fórmula I, Y es -(CH₂)_n- con n = 1, A es NHCO o CONH y R₆ es COOH, o una sal o éster de COOH correspondiente.

- 30 El compuesto (i) puede, en realizaciones seleccionadas de la presente invención, tener una fórmula seleccionada a partir de las siguientes:



TRIAC

DITPA

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable de la misma.

Como se entendería por la persona experta, la reacción de nitración descrita anteriormente conduciría a la introducción de un grupo nitróxido en la posición más inferior del anillo bencénico a mano izquierda según se representa

en las estructuras anteriores, u *ortho* con respecto al OH. De acuerdo con ello, mientras que en la mayoría de los casos el grupo sustituido sería H, se contemplan grupos alternativos capaces de sustituirse por medio de una reacción de nitración basada en el nitrito, por ejemplo un grupo yodo *ortho* con respecto al grupo hidroxilo fenol. Los autores de la presente invención han mostrado que esto es una reacción fácil, aunque más lenta que el reemplazamiento de hidrógeno.

Cuando un compuesto de Fórmula I está presente en forma de un éster, se prefiere un éster alquílico del mismo. Cuando un compuesto de Fórmula I está presente en forma de una sal farmacéuticamente aceptable, tales sales pueden incluir, cuando el compuesto tiene al menos un centro básico, sales de adición de ácidos, por ejemplo con ácidos inorgánicos fuertes, tales como ácidos minerales, por ejemplo ácido sulfúrico, ácido fosfórico o un ácido hidrohálico, con ácidos carboxílicos orgánicos fuertes, tales como ácidos alcanocarboxílicos de 1 a 14 átomos de carbono que están insustituidos o sustituidos, por ejemplo, por halógeno, por ejemplo ácido acético, tales como ácidos dicarboxílicos saturados o insaturados, por ejemplo ácido oxálico, malónico, succínico, maleico, fumárico, ftálico o tereftálico, tales como ácidos hidroxicarboxílicos, por ejemplo ácido ascórbico, glicólico, láctico, mágico, tartárico o cítrico, tales como aminoácidos, (por ejemplo ácido aspártico o ácido glutámico o lisina o arginina), o ácido benzoico, o con ácidos sulfónicos orgánicos, tales como ácidos alquilsulfónicos (C_1-C_4) o arilsulfónicos que están insustituidos o sustituidos, por ejemplo por halógeno, por ejemplo ácido metanosulfónico o ácido p-toluenosulfónico.

Se pueden formar también sales de adición de ácidos correspondientes que tienen, si se desea, un centro básico presente adicionalmente.

Cuando el compuesto de Fórmula I tiene al menos un grupo ácido (por ejemplo COOH) ello puede formar también sales con bases. Sales con bases adecuadas son, por ejemplo, sales metálicas, tales como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo sales de sodio, potasio o magnesio, o sales con amoniaco o una amina orgánica, tales como morfolina, tiomorfolina, piperidina, pirrolidina, una mono, di o tri-alquilamina inferior, por ejemplo etilamina, terc-butilamina, dietilamina, diisopropilamina, trietilamina, tributilamina o dimetil-propilamina, o una mono, di o trihidroxialquilamina inferior, por ejemplo mono, di o trietanolamina. Se pueden formar además las sales internas correspondientes.

Las sales preferidas de los compuestos de Fórmula I que incluyen un grupo básico incluyen monoclorhidrato, hidrogenosulfato, metanosulfonato, fosfato o nitrato. Las sales preferidas de los compuestos de Fórmula I que incluyen un grupo ácido incluyen sales de sodio, potasio y magnesio y aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos (i) pueden por supuesto estar solvatados si se desea, por ejemplo se pueden usar hidratos en la presente invención.

En ciertas realizaciones del primer aspecto de la invención, la composición incluye también un antioxidante. Tales realizaciones están basadas en un hallazgo inesperado de los autores de la presente invención, como resultado de las investigaciones mencionadas anteriormente, que el producto de reacción nitro del compuesto 1A se forma después de la administración oral por medio de una reacción basada en nitrito que está mediada por radicales libres. También se ha determinado por los autores de la presente invención que el compuesto GC-1 de éter no biarílico, también descrito anteriormente, llega a estar nitrado fácilmente en condiciones fisiológicamente relevantes. La incorporación del antioxidante dentro de la composición del primer aspecto de la invención inhibe la formación de los radicales libres y/o desoxida radicales libres que se forman, con la consecuencia de que cualquier reacción de nitración que tenga lugar a pesar del recubrimiento entérico está atenuada.

El antioxidante es preferentemente soluble en agua. Tales antioxidantes incluyen ácido ascórbico, ácido fumárico, ácido mágico, ácido propiónico, o una sal de cualquiera de los ácidos citados, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, bisulfito de sodio, sulfito de sodio y metabisulfito de sodio. Un antioxidante preferido es ácido ascórbico o es sal sódica, que se ha encontrado que tiene efectos inhibidores particularmente significativos en la reacción de nitración.

Alternativamente, el antioxidante puede ser insoluble en agua. Un antioxidante tal se puede seleccionar a partir de α-tocoferol, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, oleato de etilo y galato de propilo.

Aunque no es esencial, puede ser preferible para el compuesto (i) y el antioxidante (ii) estar mezclados sustancialmente homogéneamente. Esto ayuda a asegurar que, después de cualquier contacto del compuesto (i) con nitrito (y/o con ácido nitroso, y/o cualesquiera especies de radicales libres que contengan nitrógeno y que contengan oxígeno), el antioxidante es más probable que esté en la proximidad de tal contacto y que así sea capaz de atenuar mejor cualquier reacción de nitración que pueda ocurrir.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica adecuada para administración oral, comprendiendo:

- (i) un compuesto de Fórmula I o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe anteriormente;

- (ii) al menos un antioxidante; y
- (iii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En realizaciones preferidas del segundo aspecto de la invención, la composición es una composición sólida. Las características preferidas de Fórmula I según se describen en relación con el primer aspecto de la invención también se aplican en conexión con el segundo aspecto (y aquellos otros aspectos descritos más adelante, según sea apropiado).

La composición del segundo aspecto de la invención preferentemente incluye también un revestimiento entérico. El revestimiento entérico puede ser como se describe anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

La presente invención además proporciona, en un tercer aspecto, un procedimiento de establecer una composición farmacéutica adecuada para administración oral, comprendiendo la composición farmacéutica:

- (i) un compuesto de Fórmula I o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo como se describe anteriormente;
- (ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable;

el procedimiento que comprende proporcionar la composición con un revestimiento entérico.

En un aspecto adicional, la invención proporciona, en una composición farmacéutica adecuada para administración oral que contiene un compuesto de Fórmula I o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo según se define anteriormente, el uso de un revestimiento entérico o un antioxidante o tanto un revestimiento entérico como un antioxidante para la reducción o prevención de nitración de dicho compuesto.

La presente invención también proporciona una composición de acuerdo con la invención, para usar en la terapia.

La presente invención también proporciona el uso de una composición de acuerdo con la invención en la preparación de un medicamento para evitar, inhibir o tratar una enfermedad seleccionada a partir de obesidad, hipercolesterolemia, dislipidemia, aterosclerosis, arritmias cardíacas, depresión, osteoporosis, hipotiroidismo, bocio, cáncer de tiroides así como glaucoma e insuficiencia cardíaca congestiva.

La invención encuentra utilidad en un procedimiento de evitar, inhibir o tratar una enfermedad asociada con disfunción del metabolismo, o que es dependiente de la expresión de un gen regulado por triyodotironina (T_3), implicando el procedimiento la administración de una composición de acuerdo con la invención a un sujeto en necesidad de tal prevención, inhibición o tratamiento.

En el uso y procedimiento descrito inmediatamente anteriormente, el medicamento o composición puede administrarse en un intervalo de dosificación desde 30 minutos hasta un mes. Más preferentemente, el intervalo de dosificación es desde uno hasta siete días, incluso más preferentemente uno a tres días. El intervalo de dosis del ser humano adulto típico para compuestos (i) sería alrededor de 1 μg a alrededor de 2000 μg por día. Para muchos compuestos (i), la dosis diaria sería menos de 300 μg . Preferentemente, la dosis de compuesto (i) es desde aproximadamente 1 μg a aproximadamente 200 μg por día, más preferentemente alrededor de 1 a alrededor de 100 μg por día. Por ejemplo, los compuestos (i) pueden administrarse en una dosis, dos dosis, tres dosis o cuatro dosis por día. Preferentemente, la cantidad de compuesto (i) por dosis unitaria de composición es desde 1 hasta 200 μg , más preferentemente 1 a 100 μg , más preferentemente 1, 5, 10, 20, 25 ó 50 μg . Por ejemplo, la cantidad de compuesto (i) por dosis unitaria puede ser desde 10 hasta 100, por ejemplo desde 20 hasta 80, normalmente desde 25 a 50, μg .

La composición de acuerdo con el primer o segundo aspecto de la invención también puede comprender un ingrediente farmacológicamente activo adicional seleccionado a partir de agentes hipolipídicos, agentes antidiabéticos, antidepresivos, inhibidores de la resorción ósea, supresores del apetito y/o agentes antiobesidad.

Los ingredientes farmacológicamente activos adicionales tienden a tener efectos aditivos o sinérgicos con los compuestos (i) tal como para potenciar los efectos metabólicos de los mismos.

En composiciones como se describen anteriormente que contienen un antioxidante, la cantidad de antioxidante puede variar a lo largo de un muy amplio intervalo. Preferentemente están presentes al menos 0,0001 mmol de antioxidante, por ejemplo 0,0005 mmol, más preferentemente al menos 0,01 mmol. La cantidad de antioxidante puede por ejemplo ser desde 0,0001 a 15 mmol, por ejemplo 0,0005 a 10 mmol, típicamente 0,01 a 4 mmol por dosis de composición.

Como se describirá en más detalle a continuación, el ser humano medio se traga alrededor de 0,1 mmol de nitrito salival por hora. La presencia de las cantidades anteriores de antioxidantes en la composición debería proporcionar un efecto regulador útil para el compuesto (i), incluso si la composición de la invención es residente en el estómago durante un periodo relativamente prolongado.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un medicamento de combinación adecuada para administración oral, comprendiendo:

(1) una primera composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe anteriormente; y

5 (2) una segunda composición farmacéutica que comprende al menos un antioxidante,

en las que cada una de las primera y segunda composiciones farmacéuticas contiene al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable y en las que la primera y la segunda composiciones farmacéuticas se pueden administrar simultáneamente, secuencialmente o por separado.

10 El medicamento de combinación de la presente invención toma ventaja del hecho de que, con el fin de efectuar la estabilización del compuesto (i), el antioxidante debería simplemente estar presente cuando el primero entra en contacto con ácido y una fuente de nitrito. Dado que las dos composiciones del medicamento de combinación se dan en tal proximidad temporal que hay solapamiento entre sus períodos de residencia en el estómago, el compuesto (i) debería disfrutar al menos un grado de estabilización frente a la reacción de nitración. Las composiciones, o al menos la primera composición, son preferentemente composiciones sólidas.

15 La invención se describirá ahora en más detalle por medio de ejemplo solo y con referencia a los dibujos adjuntos, de los que:

Figura 1 que muestra una serie de trazas de HPLC estándar del compuesto 1A en presencia de diversas concentraciones de su producto de reacción 5'-nitro; y

20 Figura 2 ilustra un procedimiento para elaborar comprimidos dotados de revestimiento entérico que contienen compuesto 1A.

Como se menciona anteriormente, durante el desarrollo del compuesto 1A, se determinó que la formación del producto de reacción 5'-nitro estuvo teniendo lugar por una ruta abiótica (es decir no enzimática). Se determinó que las propiedades toxicológicas del producto de reacción de nitro estaban alteradas en un grado relevante según se comparan con el compuesto parental. Fue por lo tanto importante determinar como estuvo teniendo lugar la reacción de nitración y se idearon aproximaciones para controlar o evitar esto *in vivo*.

Ejemplo 1 - Genotoxicidad de un producto de reacción de Compuesto 1A

1.1 Introducción

Durante el desarrollo de una formulación de cápsula de 25 µg de compuesto 1A, se observó una impureza previamente no detectada en varios lotes, la impureza varió desde 0,8 hasta 1,2% del compuesto original. Esta impureza se identificó como un análogo de nitro, referido más adelante como producto de reacción 1B.

Por lo tanto se identificó un potencial teórico para la formación *in vivo* de esta impureza/producto de reacción. Así, este producto de reacción teórico se probó en su actividad genotóxica en una batería estándar de estudios de la International Conference on Harmonisation (ICH).

Este ejemplo resume los estudios de genotoxicidad llevados a cabo con el producto de reacción 1B y se refiere a los hallazgos para exposiciones clínicas a esta impureza/producto de reacción.

1.2 Genotoxicidad

1.2.1 Producto de reacción 1B

1.2.1.1 Ensayo exploratorio de Ames

40 El producto de reacción 1B se puso a prueba en cultivos duplicados en presencia y ausencia de activación metabólica S-9. Los artículos de control positivo se probaron en cultivos duplicados y se prepararon en DMSO, con la excepción de azida de sodio, que se disolvió en agua. Los controles negativos (vehículo) se probaron en replicados de cinco cultivos.

45 El producto de reacción 1B mostró citotoxicidad para cada una de las cepas de *S. typhimurium* y *E. coli* probadas. La citotoxicidad que varía de mínima a marcada estuvo basada aparentemente en reducciones en el número de reverisiones promedio y/o en reducciones en la densidad del tamiz de fondo bacteriano. Cuando se comparan con los controles negativos, los valores de reverisiones de histidina+ se elevaron en los cultivos de cepa TA100 tratados con el producto de reacción 1B en presencia y en ausencia de activación S-9, respectivamente. Como se esperaba, se observaron incrementos significativos en los números de reverisiones de histidina+ y triptófano+ en los cultivos tratados con los compuestos de control positivo.

50 En conclusión, el producto de reacción 1B mostró una respuesta positiva en este estudio.

1.2.1.2 Estudio citogenético en linfocitos humanos primarios

Se llevó a cabo un estudio de propiedades citogenéticas *in vitro* investigando el potencial del producto de reacción 1B induciendo aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos cultivados. En base a resultados de citotoxicidad de hallazgos de intervalo, se seleccionaron concentraciones de 5 a 30 µg/ml para evaluación en la exposición de 24

5 horas sin activación de enzimas metabólicas y concentraciones de 2,5 a 20 µg/ml para la exposición de 5 horas con activación metabólica de hígado de rata (fracción S9) inducida con Aroclor 1254.

En la exposición de 5 horas al producto de reacción 1B en presencia de activación metabólica S-9, tuvo lugar un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. A la concentración máxima, 20 µg/ml, la frecuencia de aberraciones cromosómicas fue 10,5% comparada con 2,5% para el control de vehículo y la reducción en el índice mitótico fue de aproximadamente 51%.

10 En la exposición de 24 horas a producto de reacción 1B en ausencia de activación metabólica S-9, tuvo lugar un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas. En las concentraciones más elevadas evaluadas, 40 µg/ml, la frecuencia de aberraciones cromosómicas fue 7,5% comparada con 2,5% para el control de vehículo con una reducción en el índice mitótico de aproximadamente 48%.

15 Como se esperaba, los controles positivos en cada ensayo indujeron incrementos estadísticamente significativos en las frecuencias de metafases dañadas. Así, se demostró la validez de este ensayo.

En conclusión, el producto de reacción 1B fue clastogénico dividiendo linfocitos humanos cuando se probó a las concentraciones máximas recomendadas por las directrices internacionales para estudios citogenéticos *in vitro*.

1.2.1.3 Estudio de micronúcleos orales en ratones

20 El producto de reacción 1B se evaluó en el ensayo de micronúcleos de la médula ósea de ratón determinando su potencial genotóxico *in vivo*. Se dieron a grupos de ratones tres dosis diarias consecutivas orales de 1000, 1500 o 2000 mg/kg de producto de reacción 1B (es decir hasta el nivel de dosis máximo requerido por las directrices reguladoras internacionales en ICH y OECD). Las muestras de médula ósea se recogieron de todos los animales 25 aproximadamente 24 horas tras la última dosis para evaluación de eritrocitos policromáticos multinucleados (MN-PCE).

No murió ningún animal durante el estudio y no se observaron signos clínicos relacionados con fármacos. No se observó ninguna toxicidad para médula ósea de fémur según se midió por decrecimientos significativos en eritrocitos policromáticos (PCE). Las frecuencias de MN-PCE se incrementaron estadísticamente a 1000 y 1500 mg/kg.

En conclusión, no se encontraron respuestas positivas dependientes de dosis en ratones.

30 1.3 Exposición clínica al producto de reacción 1B

Después de la administración de dosis orales únicas de compuesto 1A a voluntarios humanos, el producto de reacción 1B pudo detectarse en plasma. De forma similar, en un ensayo en el que sujetos recibieron dosis diarias de compuesto 1A durante dos semanas, el producto de reacción 1B pudo detectarse en varios sujetos.

35 En conclusión, tras la dosificación del compuesto 1A en seres humanos, el producto de reacción 1B de nitro potencialmente mutágeno pudo detectarse en plasma. Éste es el caso incluso si la dosificación se lleva a cabo durante un periodo relativamente corto (por ejemplo 14 días, como anteriormente). Las genotoxinas potenciales son típicamente no dependientes de dosis en sus efectos mutagénicos y así la presencia de incluso niveles bajos del producto de reacción 1B es de relevancia clínica. Además, los compuestos de Fórmula I se deberían dar típicamente 40 durante un periodo de tiempo largo y así la prevención de que se formen los productos de reacción de nitro es de primordial importancia si los efectos genotóxicos potenciales que resultan de acumulación de los productos de reacción son a evitarse.

1.4 Resumen y Conclusión

La impureza/el producto de reacción de compuesto 1A, producto de reacción 1B, se encontró que induce 45 aberraciones cromosómicas en linfocitos periféricos humanos *in vitro* y micronúcleos no dependientes de dosis en estudio de micronúcleos de ratones *in vivo*.

Además, el producto de reacción 1B podría detectarse en plasma humano tras dosificación a corto plazo de compuesto 1A. De acuerdo con ello, está claro que la prevención de la formación del producto de reacción de nitro sería de beneficio significativo, tanto porque las genotoxinas potenciales pueden ejercer efectos genotóxicos a concentraciones muy bajas como porque los compuestos de Fórmula I, tales como compuesto 1A se darán generalmente crónicamente.

Ejemplo 2 - Nitrato y nitrito - Fuentes y mecanismos de nitración

2.1 Introducción

Una fuente posible de nitración es la ruta del nitrito no clásica. Esta ruta se comunicó primero por Uemura y col. (1978, J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 9, 1076). La ruta del nitrito puede avanzar a pH moderadamente bajo (alrededor de 2) y es tolerante de agua, en contraste con la ruta del nitrato. La ruta del nitrito conduce a la producción de especies de radicales libres capaces de reaccionar con compuestos que contienen benceno hidroxilado, (Beake y cols. (1992) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 10, 1653):

Los autores de la presente invención consideraron que era probable que esta ruta sea la ruta principal para nitración de compuestos de Fórmula I administrados oralmente en el estómago e intestino.

Se ha estimado la ingesta diaria promedio de nitrato y nitrito a partir de fuentes distintas de los aditivos alimentarios. (T. Hambridge, WHO Food Additives Series: 50, Nitrate and Nitrite).

Hasta el punto en que están implicadas las fuentes endógenas de nitrito, se sabe que el nitrato se produce a partir del nitrato en la saliva por la acción de la nitrato reductasa oral (Benjamin (2000) Ann. Zootech. 49, 207). Esto da como resultado una concentración de alrededor de nitrito 200 μM en la saliva. El ser humano medio se traga alrededor de 500 ml de saliva por hora. Esto da como resultado la ingestión de alrededor de 2,4 mmol (110 mg) de nitrito por día. Esta cantidad asciende a aproximadamente 1,6 mg/kg/día de nitrito (para un adulto medio que pese 70 kg).

2.2. Estudio de nitración *in vivo*

En experimentos llevados a cabo *in vivo* en ratas, se ha encontrado que, en la administración de compuesto 1A conjuntamente con una solución de nitrato y de nitrito (54 mg y 4 mg, respectivamente, por rata), alrededor del 6% de la dosis administrada de compuesto 1A se nitró.

2.3. Antioxidantes

Como se expone anteriormente, se planteó como hipótesis que el mecanismo de nitración del compuesto 1A (y así otros compuestos que contienen benceno hidroxilados, tales como aquellos de Fórmula I) estuviera mediado por medio de nitrito y así por medio de radicales libres. De acuerdo con ello, se consideró que la reacción de nitración podría inhibirse por medio de desoxidantes/antioxidantes de radicales libres.

En general, cualquier antioxidante puede usarse de acuerdo con la presente invención. Los antioxidantes "verdaderos" son aquellos que bloquean las reacciones en cadena mediadas por los radicales libres (donando un electrón individual a las especies radicales). Un ejemplo de un antioxidante verdadero tal es hidroxitolueno butilado (BHT). Otros ejemplos de tales especies incluyen los antioxidantes fenólicos, tales como ácido ferúlico, rutina, catecina, epicatecina, epigalocatecina, apicatec-ingalato y epigalocatecingalato. Muchas de tales especies se dan en la naturaleza, por ejemplo antioxidantes de tipo flavonoide o antioxidantes de tipo transestilbeno. Los agentes reductores son especies que tienen un potencial redox más bajo que el compuesto que ellos están siendo empleados para proteger, y/o pueden actuar como señuelos de nitración. Una ejemplo de un agente que actúa de este modo es ácido ascórbico. Además, ciertos agentes son "sinergistas de antioxidantes". Estos agentes potencian los efectos de antioxidantes y pueden incluirse en composiciones de la presente invención; un ejemplo es edetato de sodio.

Los antioxidantes también pueden agruparse de acuerdo con sus características de solubilidad. Los antioxidantes solubles en agua incluyen ácido ascórbico (o su sal sódica), ácido fumárico, ácido málico, monotioglicerol, metabisulfito de potasio ($\text{KO}_3\text{S-SO}_2\text{K}$), ácido propiónico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), bisulfito de sodio (NaHSO_3) y sulfito de sodio (Na_2SO_3). Los antioxidantes solubles en agua incluyen alfa-tocoferol, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), oleato de etilo y galato de propilo.

2.4. La reacción de nitración y su inhibición

Se sabe que L-tirosina puede convertirse a un producto de reacción nitro en el que el grupo NO_2 está sustituido *ortho* con respecto al grupo hidroxilo de anillo. El procedimiento experimental para determinar el grado de nitración de L-tirosina se usa determinando la nitración de compuesto 1A y la inhibición de la misma por antioxidantes seleccionados. Se conoce el procedimiento experimental para L-tirosina (1998, Chem. Res. Toxicol., 11, 1578). Brevemente, soluciones de compuesto 1A (50 μM) se expusieron a soluciones de NaNO_3 (2500 μM) y/o NaNO_2 (diversas concentraciones) a diversos valores de pH, a 37°C y en la presencia o ausencia de tampón fosfato. La reacción de nitración conduce a la formación del producto de reacción de 5'-nitro de compuesto 1A. Este producto de reacción puede detectarse y cuantificarse usando HPLC, teniendo el producto de reacción un tiempo de retención reducido (según las condiciones usadas) comparado con el compuesto parental. Los inhibidores de antioxidantes se añadieron después a soluciones de prueba que contenían NaNO_2 y 1A y se repitieron las pruebas de nitración.

Figura 1 muestra una serie de chromatogramas de HPLC estándar de 1A (50 μM) en la presencia de producto de reacción 1B 50 nM a producto de reacción 1B 50 μM . El análisis fue por HPLC-EM/EM, con las siguientes condiciones:

Condiciones de HPLC

Instrumentos: Waters Alliance 2795 LC

Precolumna: Precolumna de Waters Sentry, Simetría C₁₈ 3,5 µm, 2,1 x 10 mm.

Columna: Simetría de Waters C₁₈ 3,5 µm, 2,1 x 10 mm.

5 Temperatura de columna: 45°C

Volumen de inyección: 5 µl

Temperatura del autocargador de muestras: 10°C

Caudal: 0,2 ml/min

Fase móvil:

10 A = acetato de amonio 10 mM (pH = 4,5 con ácido acético),

B = acetonitrilo

Gradiente:

Tiempo (min) µM	% de A	% de B	Caudal (ml/min)	Curva
0,00	90	10	0,2	lineal
1,00	0	100	0,2	lineal
2,00	0	100	0,2	lineal
2,10	90	10	0,2	lineal
4,00	90	10	0,2	lineal

15 **Condiciones de espectrometría de masas:**

Instrumentos: Modo Micromass Quattro micro API: ESI -

Experimento: MRM (monitorización de reacción múltiple)

Transiciones de MRM para compuesto 1A: m/z 486,0 > 399,9 (*t_R*= 3,47 min)

Transiciones de MRM para el producto de reacción 1B: m/z 531,0 > 444,8 (*t_R* = 3,91 min)

20 **Límite de cuantificación (LOQ):**

LOQ para compuesto 1A en RMN es 10 nM en acetonitrilo al 50%:agua al 50%.

LOQ para producto de reacción 1B en MRM es 1 nM en acetonitrilo al 50%:agua al 50%.

25 Puede verse claramente que el producto de reacción tiene un tiempo de retención reducido en las condiciones usadas, con el compuesto 1A parental eluyendo a alrededor de 3,5 minutos y el producto de reacción eluyendo a alrededor de 4 minutos.

En incubación de 1A con diversas concentraciones de NaNO₂ y/o NaNO₃, se obtuvieron los resultados de la Tabla 1.

Tabla 1: Nitración de compuesto 1A en presencia de nitrito y/o nitrato y en diversas condiciones de pH.

1A (µM)	NaNO ₃ (µM)	NaNO ₂ (µM)	Agente de Inhibición	pH	Tiempo (h)	Nitración (%)
50				2 (HCl)	24	0

50				2 (fosfato)	24	0
50				6,4	24	0
50				7,2	24	0
50	2500	100		2 (HCl)	4	8,4
50	2500	100		2 (fosfato)	4	9,63
50	2500	100		6,4	4	0,017
50	2500	100		7,2	4	0
50	2500			2 (HCl)	4	0
50	2500			2 (fosfato)	4	0
50	2500			6,4	4	0
50		100		2 (HCl)	4	98,6
50		100		2 (fosfato)	4	4,27
50		100		6,4	4	0,013
50		100		7,2	4	0

Se pueden sacar varias conclusiones sobre la base de estos datos. Primera, se demostró claramente que nitrito solo, en condiciones de acidez apropiadas, es suficiente para causar nitración significativa del compuesto 1A. Como se demuestra por el control negativo (hileras 1 a 4), no se observó ningún resultado de nitración cuando el nitrito y el nitrato estaban ausentes. Segunda, la presencia del tampón fosfato puede conducir realmente a una inhibición significativa de la reacción basada en nitrito, teniendo lugar la reacción en un grado mucho mayor en solución de HCl pH 2 que en tampón de pH 2. Tercera, el nitrato a pH 2 (HCl o tampón) no es capaz de conducir a nitración medible de compuesto 1A. Cuarta, el nitrato parece inhibir la reacción basada en nitrito en un grado significativo (más de un orden de magnitud; véanse figuras en letra negrita).

Estos datos confirman así que la reacción de nitración observada con compuestos que contienen benceno hidroxilados, tales como aquellos de Fórmula I (por ejemplo compuesto 1A), cuando se administran oralmente, está mediada por nitrito más que por nitrato. Los datos demuestran claramente también la importancia de un ambiente ácido para la reacción de nitración. Las composiciones revestidas entéricas de la presente invención reducen o evitan el acceso de medios ácidos a los ingredientes farmacológicamente activos contenidos en ellas. De acuerdo con ello, una aproximación de formulación tal es capaz de reducir significativamente la reacción de nitración que ocurriría de lo contrario.

Además de agentes de inhibición de antioxidantes seleccionados para compuesto 1A en presencia de nitrito, se lograron los resultados de la Tabla 2. La cantidad de antioxidante usado estuvo generalmente alrededor de 10-20 veces la cantidad de compuesto 1A.

Tabla 2: Inhibición de nitración del compuesto 1A en presencia de nitrito por medio de agentes inhibidores antioxidantes.

1A (μM)	$\text{NaNO}_2(\mu\text{M})$	Agente inhibición	depH	Tiempo (horas)	Nitración (%)
50	100		2 (HCl)	4	98,6
50	100		6,4	24	0,02
50	400		6,4	24	0,12
50	800		6,4	24	0,21
50	100	BHT	2 (HCl)	24	0,02
50	100	Ascorbato de sodio	2 (HCl)	4	0,00

(continuación)					
50	100	Ascorbato de sodio	2 (fosfato)	4	0,00
50	100	Ascorbato de sodio	6,4	4	0,00
50	100	Ascorbato de sodio	7,2	4	0,00
50	100	Bisulfito de sodio	2 (HCl)	0	0,77
50	100	Bisulfito de sodio	2 (fosfato)	0	0,11
50	100	Bisulfito de sodio	2 (HCl)	2	0,11
50	100	Bisulfito de sodio	2 (fosfato)	2	0,16
1A (μ M)	NaNO ₂ (μ M)	Agente de inhibición	pH	Tiempo (horas)	Nitración (%)
50	100	Bisulfito de sodio	6,4 (NaAc)	2	0
50	100	Bisulfito de sodio	6,4 (fosfato)	2	0
50	100	Bisulfito de sodio	2 (HCl)	2	0,11
50	100	Bisulfito de sodio	2 (fosfato)	4	0,17
50	100	Bisulfito de sodio	6,4 (NaAc)	4	0
50	100	Bisulfito de sodio	6,4 (fosfato)	4	0
50	100	Catecina	2 (HCl)	4	0,01
50	100	Catecina	2 (fosfato)	4	0,01
50	100	Catecina	6,4 (NaAc)	4	0
50	100	Catecina	6,4 (fosfato)	4	0
50	100	Catecina	2 (HCl)	24	0,02
50	100	Catecina	2 (fosfato)	24	0
50	100	Catecina	6,4 (NaAc)	24	0
50	100	Catecina	6,4 (fosfato)	24	0

Los datos de la Tabla 2 permiten que se saque un número de conclusiones significativas. Esta claro que, a menos que el nitrito se acidifique, no tiene lugar ninguna nitración o tiene lugar nitración insignificante del compuesto 1A, incluso cuando la concentración de nitrito se incrementa hasta ocho veces. De forma más importante, se vio que, en condiciones de pH y de concentración de nitrito que se encuentran conduciendo a una casi total conversión del compuesto de prueba a su producto de reacción de nitró, la presencia de BHT (insoluble en agua) o ascorbato (soluble en agua) conduce a inhibición esencialmente completa de la nitración mediada por nitrito (véanse figuras en letra negrita).

En general, por lo tanto, los datos comunicados en el presente documento ilustran claramente que el nitrito (NO_2) y no el nitrato (NO_3) es la fuente probable de la nitración *in vivo* observada en los compuestos que contienen benceno hidroxilados, tales como aquellos de Fórmula I (por ejemplo compuesto 1A). Esta nitración mediada por nitrito continúa por medio de un mecanismo de radicales libres y sólo tiene lugar en un grado relevante en medios acidificados. La incorporación de un antioxidante en una composición que contiene el compuesto que contiene benceno hidroxilado inhibe esta reacción de nitración en un grado significativo. Además o alternativamente, la protección de la composición por medio de un recubrimiento entérico evitará que el nitrito acidificado entre en contacto con el compuesto que contiene benceno hidroxilado y así proporciona una estrategia potente estabilizando el compuesto contra nitración.

Ejemplo 3 - Una formulación dotada de revestimiento entérico de Compuesto 1A

3.1. Medidas de tamaño de partículas de Compuesto 1A antes y después de molienda.

Como el compuesto 1A no molido contenía una gran proporción de partículas mayores de aproximadamente 100 µm, que afectarán la uniformidad del contenido de un comprimido, el compuesto 1A se molvió. Se usó un Retsch MM 2000 para moler 2 x 2 g de compuesto 1A. Una partícula esférica de diámetro de 100 µm con una densidad de 1,5 g/cm³ tiene una masa de aproximadamente 1 µg.

- 5 La distribución del tamaño de las partículas se midió con un Malvern MasterSizer 2000, es decir con técnica de difracción de láser. La muestra de polvo se dispersa en Tween 20 y agua.

Compuesto no molido 1A: Las medidas revelaron diámetros de mediana, d(0,5), de 101 y 103 µm. Los cuartiles del 90%, d(0,9), fueron 158 y 159 µm.

- 10 *Compuesto molido 1A:* Después de molienda d(0,5) fue 20 µm y d(0,9) fue 85 µm. Ésta fue una distribución del tamaño de las partículas aceptable.

3.2 Formula de comprimido

El producto medicinal fabricado fue un comprimido blanco, circular (diámetro 7 mm), convexo, revestido de película entérica de dos concentraciones, 50 y 300 µg de compuesto 1A (en adelante en el presente documento "1A") por comprimido. La composición completa del producto medicinal se proporciona en la tabla 3.1 a continuación.

15 Tabla 3.1: Composición de comprimidos de 1A dotados de revestimiento entérico

Ingrediente	Cantidad, mg/unidad	Cantidad, mg/unidad	Estándar
1A	0,050	0,300	
Manitol	54,6	54,6	Ph. Eur.
Celulosa, microcristalina	83,65	83,4	Ph. Eur.
Hipromelosa	0,3	0,3	Ph. Eur.
Estearato de magnesio	1,4	1,4	Ph. Eur.
Agua, purificada*	15	15	Ph. Eur.
Dispersión al 30% de copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo (1:1)	25,0 (7,5**)	25,0 (7,5**)	Ph. Eur.
Talco	3,75	3,75	Ph. Eur.
Citrato de trietilo	0,75	0,75	Ph. Eur.
Agua, purificada*	50,5	50,5	Ph. Eur.

* Se evapora durante el procedimiento de elaboración
** Cantidad de copolímero seco entre paréntesis

El peso objetivo de los comprimidos de núcleo era 140 mg y el peso objetivo de la película era 12 mg.

Fórmula por lotes

- 20 La fórmula por lotes (véase Tabla 3.2) para 50 µg/comprimido y 300 µg/comprimido se refiere a 6000 pcs (840 g) de comprimidos de núcleo durante la producción del comprimido y 5700 pcs (798 g) de comprimidos de núcleo durante el revestimiento.

Tabla 3.2: Fórmula de lote de comprimidos de 1A dotados de revestimiento entérico

Ingrediente	Cantidad por lote (50 µg/comprimido), g	Cantidad por lote, (300 µg/comprimido), g	Estándar
1A	0,318*	1,908*	
Manitol	327,6	327,6	Ph. Eur.

(cont.)			
Celulosa, microcristalina	501,9	500,4	Ph. Eur.
Hipromelosa	1,8	1,8	Ph. Eur.
Estearato de magnesio	8,4	8,4	Ph. Eur.
Agua, purificada**	90	90	Ph. Eur.
Dispersión al 30 por ciento de copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo (1:1)	158,2 (47,4***)	158,2 (47,4***)	Ph. Eur.
Ingrediente	Cantidad por lote (50 µg/comprimido), g	Cantidad por lote, (300 µg/comprimido), g	Estándar
Talco	23,7	23,7	Ph. Eur.
Citrato de trietilo	4,7	4,7	Ph. Eur.
Agua, purificada**	320	320	Ph. Eur.

* Incluye exceso del 6% debido a pérdidas durante la producción de los comprimidos de núcleo
 ** Se evapora durante el procedimiento de fabricación
 *** Cantidad de copolímero seco entre paréntesis
 La cantidad de suspensión de revestimiento (de las cuatro últimas filas de la tabla) incluye una sobrecarga del 11% debida a pérdidas del procedimiento de revestimiento.

3.3 Elaboración

Un diagrama de flujo del procedimiento de elaboración de comprimidos de 1A dotados de revestimiento entérico se da en la Figura 2. Se fabricaron los comprimidos de núcleo con 50 µg y 300 µg de 1A. Los comprimidos de núcleo son una mezcla de un "granulado de base" (que contiene 1A), manitol, hipromelosa y estearato de magnesio. El "granulado de base" se fabrica suspendiendo 1A molido en una solución acuosa de hipromelosa y pulverizando la dispersión en MCC. Se usa sobrecarga del seis por ciento de 1A debido a pérdidas. Después de evaporar el agua, el producto seco se tamiza. La mezcla en polvo se comprime en comprimidos circulares, convexos de resistencia a aplastamiento adecuada y de tiempo de desintegración adecuado. El peso de comprimido es de 140 mg y el diámetro de 7 mm.

Los comprimidos de núcleo se revisten obteniendo resistencia gástrica. El polímero es una dispersión de copolímero de ácido metacrílico acuoso-acrilato de etilo (Eudragit L30 D-55). Se añade talco como un deslizante a la dispersión de polímero y el citrato de trietilo funciona como plastificante.

La función de cada uno de los excipientes se proporciona en la tabla, a continuación.

15

Tabla 3.3: Función de excipientes

Ingrediente	Función
Manitol	Carga
Celulosa microcristalina	Carga, transportador para API, disgregante
Hipromelosa	Aglutinante
Estearato de magnesio	Lubricante
Agua, purificada*	Disolvente
Dispersión al 30 por ciento de copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo (1:1)	Polímero de revestimiento entérico
Talco	Deslizante

Citrato de trietilo	Plastificante
*Se evapora durante el procedimiento de elaboración	

3.4 Análisis de composición revestida entérica

Una aproximación adecuada evaluando el contenido y las impurezas etc. de los comprimidos dotados de revestimiento entérico es como sigue. El compuesto 1A se extrae de los comprimidos por agitación en un disolvente de muestra. Despues de centrifugación, eliminando partículas insolubles, la cantidad de 1A, de Sustancias

- 5 Relacionadas Individuales y de Sustancias Relacionadas Totales en el sobrenadante se pueden determinar usando las condiciones instrumentales descritas en la Tabla 3.4. La cantidad de 1A y de sus sustancias relacionadas se determinaron por medio de cromatografía en fase reversa y de detección por UV.

Tabla 3.4: Parámetros de procedimiento de HPLC y soluciones para comprimidos de 1A

Parámetros y soluciones del procedimiento			
Instrumento	Módulo de Separaciones de Waters Alliance con detector Waters 2487 UV o equipo de HPLC equivalente con bomba binaria y detector UV		
Columna	Waters Atlantis dC18, 150 x 2,1 mm, 3 µ		
Fase móvil A:	Ácido trifluoroacético al 0,05% en agua		
Fase móvil B:	Ácido trifluoroacético al 0,05% en acetonitrilo		
Disolvente de muestra	Fase móvil A/fase móvil B (50/50)		
Volumen de inyección	50 µl (comprimidos de 50 µg de 1A), 20 µl (comprimidos de 300 µg de 1A)		
Temperatura de la columna	25°C		
Caudal	0,3 ml/min		
Longitud de onda de detección	250 nm		
Tiempo de funcionamiento	60 min		
Programa de gradiente	Tiempo (min)	% de A	% de B
	0	80	20
	1	80	20
	51	10	90
	52	80	20
	60	80	20
Tiempos de retención típicos (en las condiciones de HPLC establecidas)	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Tiempo de retención relativo (RRT)
	1A	26,4	1,00
	producto de reacción 1B	34,0	1,29

- 10 Un ensayo de disolución se puede llevar a cabo como sigue. La disolución se divide en dos etapas: la primera etapa prueba la resistencia del revestimiento entérico y la segunda etapa prueba la velocidad de la disolución. La resistencia del revestimiento se pone a prueba en ácido clorhídrico 0,1 M durante 3 horas. La disolución se pone a prueba en tampón de fosfato de sodio 50 mM de pH 6,8 durante 1 hora. Las muestras retiradas se centrifugan eliminando las partículas insolubles antes del análisis.
- 15 La cantidad de 1A liberada por la composición puede determinarse por medio de cromatografía de fase reversa y detección por UV de acuerdo con la Tabla 3.5.

Tabla 3.5: Parámetros y soluciones del procedimiento de HPLC para prueba de disolución de comprimidos de 1A

Parámetros y soluciones del procedimiento							
Baño de disolución	Prolabo Dissolutest						
Aparato de disolución	Aparato modificado I (cesta) de acuerdo con USP. vasos de 100 ml						
Ajustes de baño de disolución	Velocidad de agitación	100 ± 2 rpm					
	Temperatura del baño	37,0 ± 0,5°C					
	Distancia de cesta a fondo de los vasos	10 ± 1 mm					
Instrumento	Módulo de Separaciones de Waters Alliance con detector Waters 2487 UV o equipo de HPLC equivalente con bomba binaria y detector de UV						
Columna	Waters Atlantis dC18, 150 x 2,1 mm, 3 µ						
Fase móvil A:	Ácido trifluoroacético al 0,05% en agua						
Fase móvil B:	Ácido trifluoroacético al 0,05% en acetonitrilo						
Medio de disolución	Fase ácida	HCl 0,1 M					
	Fase de tampón	Tampón de fosfato de sodio 50 mM de pH 6,8					
Volumen de inyección	Fase ácida	100 µl					
	Fase de tampón	100 µl (comprimidos de 50 µg de 1A), 15 µl (comprimidos de 300 µg de 1A)					
Temperatura de la columna	25°C						
Longitud de onda de detección de velocidad de flujo	0,3 ml/min 250 nm						
Tiempo de funcionamiento	60 min						
Programa de gradiente	Tiempo (min)	% de A		% de B			
	0	65		35			
	19	30		70			
	20	65		35			
	26	65		35			
Tiempos de retención típicos	Compuesto	Tiempo de Retención (min)					
	1A	13,2					

Se ha observado que la liberación del compuesto 1A fue indetectable después de la prueba de disolución HCl 0,1 M. Cuando la prueba de disolución se repitió en medios a pH 6,8, sin embargo, la disolución de los comprimidos y la

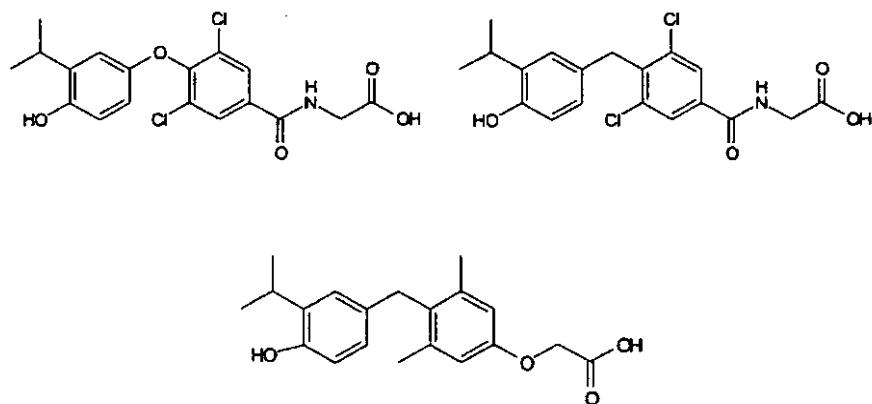
liberación del compuesto 1A estuvo virtualmente completa para cada comprimido puesto a prueba.

De acuerdo con ello, cuando se usan *in vivo*, tales composiciones revestidas entéricamente evitarán que los ingredientes activos estén expuestos, tras la administración oral, a un medio que contiene nitrito ácido en el estómago y evitarán o reducirán significativamente así la producción de productos de reacción potencialmente genotóxicos de tales ingredientes activos.

5

Ejemplo 4: Nitración de compuestos adicionales de Fórmula I.

Se llevaron a cabo pruebas en los compuestos adicionales siguientes de Fórmula I determinando la predisposición a la nitración:



- 10 Se ha encontrado que en todos los casos la exposición a soluciones de diversas concentraciones de nitrato y nitrito como en el Ejemplo 2.4 anterior da como resultado nitración.

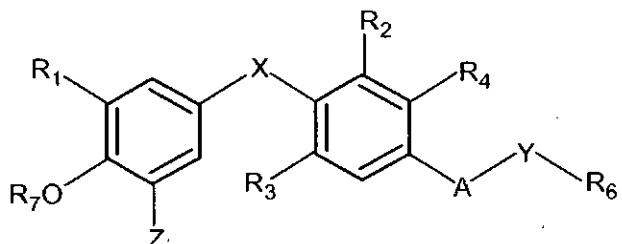
Ejemplo 5: Realización de pruebas clínicas

- 15 Se dieron dosificaciones clínicamente relevantes de compuesto IA a sujetos humanos en forma de una solución en una dosis individual. Se detectó producto de reacción nitrado en un número significativo de los sujetos. Cuando el compuesto se administró en forma de comprimidos dotados de revestimiento entérico, se observó una reducción drástica en el producto nitrado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica adecuada para administración oral, que comprende:

(i) un compuesto de Fórmula I:



5

Fórmula I

en la que:

Z es H o un grupo alternativo capaz de estar sustituido con NO_2 por medio de una reacción de nitración basada en el nitrito; R_1 se seleccionó a partir de hidrógeno, halógeno, trifluorometilo, o alquilo de 1 a 6 carbonos o cicloalquilo de 3 a 7 carbonos; X es oxígeno (-O-), azufre (-S-), carbonilo (-CO-), metileno (-CH₂-), o -NH-;

10

R_2 y R_3 son el mismo o diferentes y son hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 carbonos o cicloalquilo de 3 a 6 carbonos, siendo al menos uno de R_2 y R_3 distinto de hidrógeno; R_4 es hidrógeno o alquilo inferior;

A es oxígeno (-O-), metileno (-CH₂-), -CONR₅-, -NR₅-, o -NR₅CO-;

R_5 es H o alquilo inferior;

15

R_6 es ácido carboxílico (-CO₂H), o un éster del mismo;

Y es $-(\text{CH}_2)_n-$, en la que n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 y en el que uno o más de los grupos CH₂ puede(n) estar opcionalmente sustituido(s) con halógeno, o Y es -C=C-, lo que puede estar *cis* o *trans*; y

R_7 es hidrógeno, o un grupo alcanoílo o aroílo, u otro grupo capaz de bioconversión para generar la estructura

20

de fenol libre (en la que $R_7 = \text{H}$);

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

(ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable; y

(iii) un revestimiento entérico.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que:

25

X es oxígeno o -CH₂-;

A es -NH-, -O-, -CH₂- o -CONR₅-,

R_1 es H, yodo o isopropilo;

R_2 y R_3 son cada uno independientemente halógeno o alquilo.

R_4 es H o metilo;

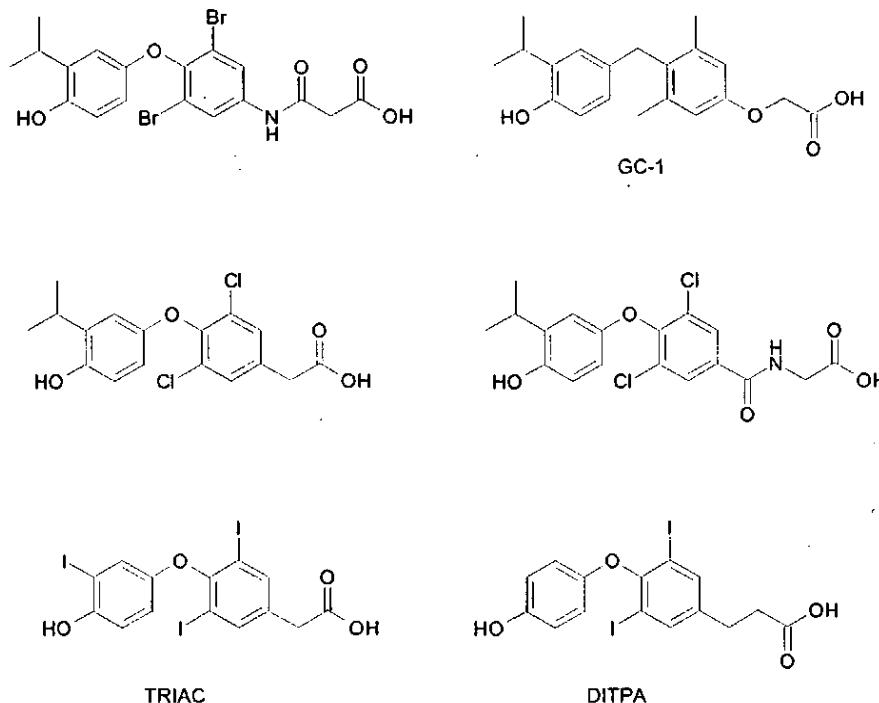
30

Y es $-(\text{CH}_2)_n-$ y n es 1 ó 2;

A es -NR₅CO- y R_5 es H; y

Z es H.

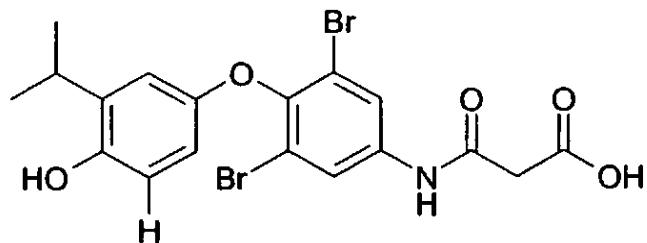
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el compuesto (i) se selecciona de



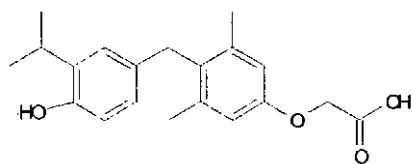
o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3 en la que el compuesto (i) es

5



o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo; o



10

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente en la que se proporciona un revestimiento inerte entre esa parte de la composición que contiene el compuesto (i) y el revestimiento entérico (iii).

6. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación en la que el revestimiento entérico comprende un polímero de acrilato, un polímero de metacrilato o un copolímero de acrilato-metacrilato.

5 7. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente que está en forma de un comprimido dotado de revestimiento entérico y que contiene los siguientes ingredientes: manitol, celulosa microcristalina, hipromelosa, estearato de magnesio, agua, copolímero de ácido metacrílico-acrilato de etilo (1:1), talco y citrato de trietilo.

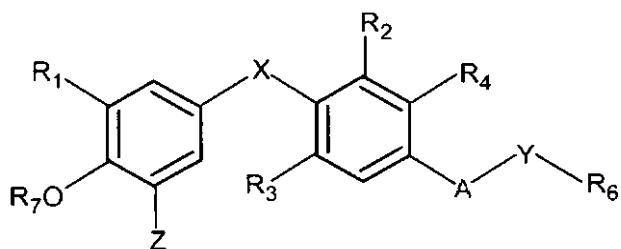
8. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el 5% o menos del compuesto de Fórmula I se libera en al menos una hora, cuando la liberación se mide en un aparato de USP II en 500 ml de fluido gástrico simulado o HCl 0,1 N a 37°C con velocidad de agitación de 50 revoluciones por minuto.

10 9. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que contiene también un antioxidante, preferentemente un antioxidante seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, ácido fumárico, ácido mágico, ácido propiónico, o una sal de cualquiera de los ácidos citados, monotioglicerol, metabisulfito de potasio, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, metabisulfito de sodio, α -tocoferol, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, oleato de etilo y galato de propilo.

15 10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9 en la que el compuesto (i) y el antioxidante están sustancialmente homogéneamente mezclados.

11. Una composición farmacéutica adecuada para administración oral, que comprende:

(i) un compuesto de Fórmula I:



20

Fórmula I

en la que:

25 Z es H o un grupo alternativo capaz de estar sustituido con NO_2 por medio de una reacción de nitración basada en el nitrato; R_1 se seleccionó de hidrógeno, halógeno, trifluorometilo, o alquilo de 1 a 6 carbonos o cicloalquilo de 3 a 7 carbonos; X es oxígeno (-O-), azufre (-S-), carbonilo (-CO-), metileno (-CH₂-), o -NH-;

R_2 y R_3 son el mismo o diferentes y son hidrógeno, halógeno, alquilo de 1 a 4 carbonos o cicloalquilo de 3 a 6 carbonos, siendo al menos uno de R_2 y R_3 distinto de hidrógeno; R_4 es hidrógeno o alquilo inferior;

A es oxígeno (-O-), metileno (-CH₂-), -CONR₅₋, -NR₅₋, o -NR₅CO-;

R_5 es H o alquilo inferior;

30

R_6 es ácido carboxílico, o un éster del mismo;

Y es - (CH₂)_n, donde n es 0, 1, 2, 3, 4 ó 5 y en el que uno o más de los grupos CH₂ puede(n) estar opcionalmente sustituido(s) con halógeno, o Y es -C=C-, lo que puede estar *cis* o *trans*; y

R_7 es hidrógeno, o un grupo alcanoilo o aroilo, u otro grupo capaz de bioconversión para generar la estructura de fenol libre (en la que $R_7 = H$);

35

o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo;

(ii) al menos un antioxidante; y

(iii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que el antioxidante está

presente en una cantidad desde 0,0001 a 15 mmol por dosis.

13. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación precedente comprendiendo también un ingrediente farmacológicamente activo seleccionado de agentes hipolipídicos, agentes antidiabéticos, antidepresivos, inhibidores de la resorción ósea, supresores del apetito y/o agentes antiobesidad.

5 14. Un procedimiento de estabilizar una composición farmacéutica adecuada para administración oral, comprendiendo la composición farmacéutica:

(i) un compuesto de Fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo; y

(ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable;

10 el procedimiento comprende proporcionar la composición con un revestimiento entérico.

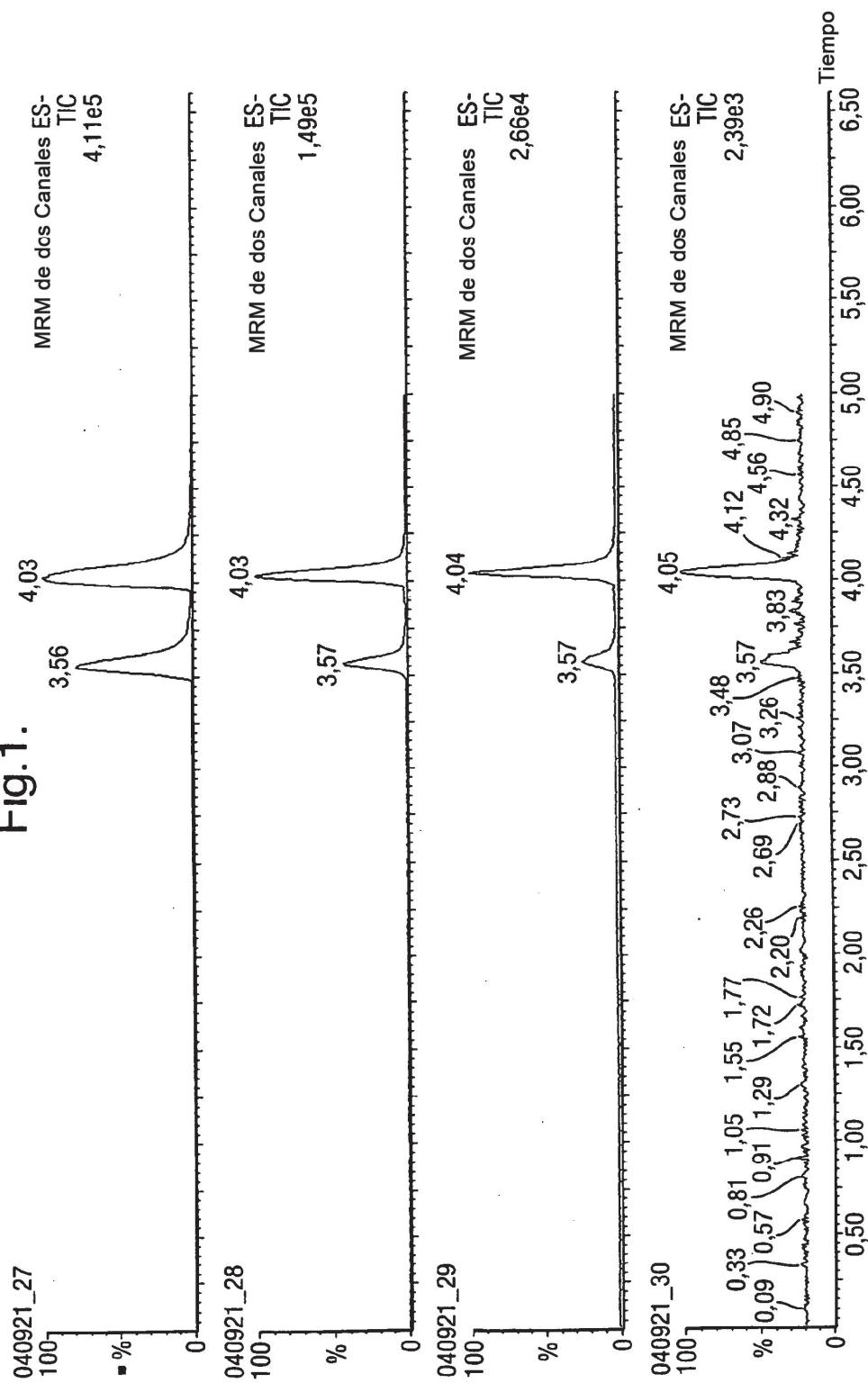
15. El uso de un revestimiento entérico o un antioxidante o tanto un revestimiento entérico como un antioxidante para la reducción o prevención de nitración de dicho compuesto en una composición farmacéutica adecuada para administración oral que contiene un compuesto de Fórmula I según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una sal o un éster farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 16. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en terapia.

17. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la preparación de un medicamento para evitar, inhibir o tratar una enfermedad seleccionada de obesidad, hipercolesterolemia, dislipidemia, aterosclerosis, arritmias cardíacas, depresión, osteoporosis, hipotiroidismo, bocio, cáncer de tiroides, glaucoma e insuficiencia cardíaca congestiva.

20

Fig. 1.



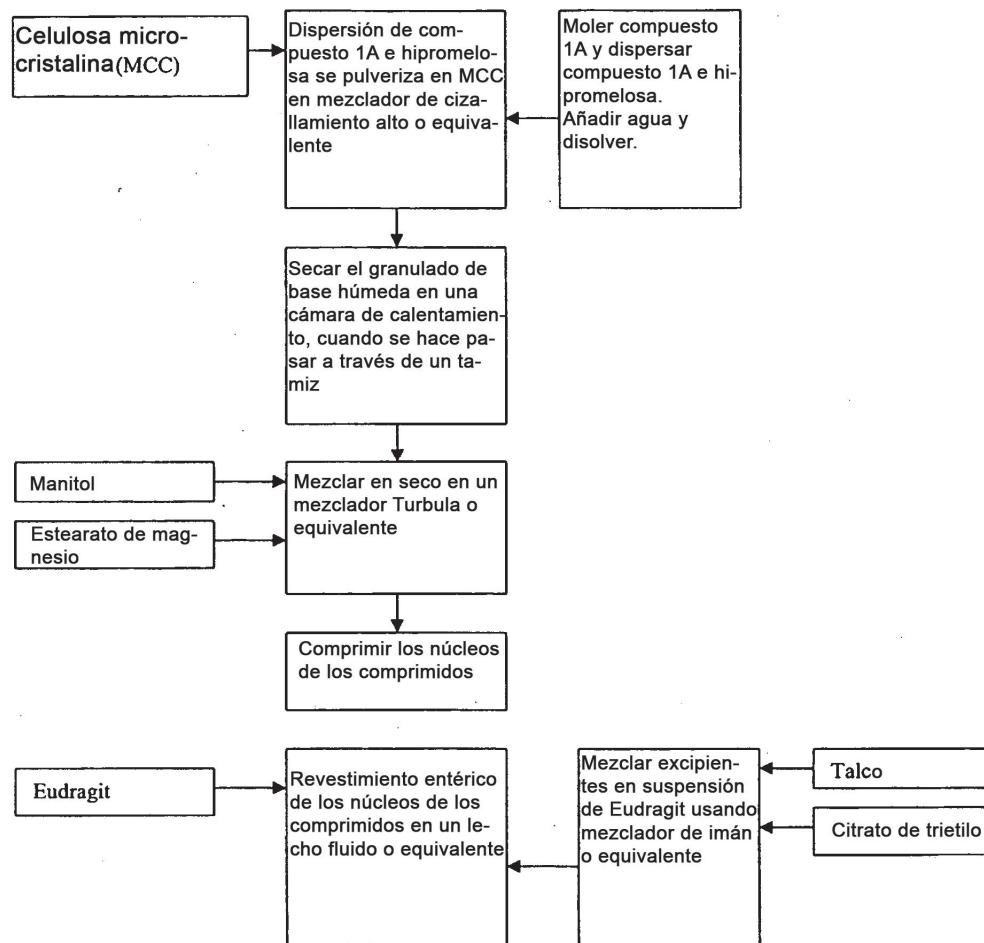


Figura 2