

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 746**

51 Int. Cl.:

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2008 E 08745614 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2012 EP 2139485**

54 Título: **Métodos de administración de tetrahidrobiopterina, composiciones asociadas y métodos de medición**

30 Prioridad:

11.04.2007 US 922821 P
08.01.2008 US 19753

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2013

73 Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 DIGITAL DRIVE
NOVATO, CA 94949, US

72 Inventor/es:

OPPENHEIMER, DANIEL, I.;
DORENBAUM, ALEJANDRO;
OKHAMAFE, AUGUSTUS;
FOEHR, ERIK;
CASTILLO, SIANNA y
KOSTEL, PAUL, JOHN

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 397 746 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

Métodos de administración de tetrahydrobiopterina, composiciones asociadas y métodos de medición

Referencia Cruzada con Solicitudes Relacionadas

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de las Solicitudes Provisionales Estadounidenses Nros. 60/922,821, presentada el 11 de Abril del 2007, y 61/019,753, presentada el 8 de Enero del 2008.

Antecedentes de la Invención

Campo de la Invención

La presente invención se dirige de manera general a composiciones para tratar trastornos que responden a BH4, y a composiciones para detectar y cuantificar biopterinas.

10 Antecedentes de la tecnología relacionada

15 La tetrahydrobiopterina (denominada en la presente invención como BH4) es una amina biogénica de la familia de pterina natural que es un cofactor para un número de enzimas diferentes, que incluyen hidroxilasa de fenilalanina (PAH), hidroxilasa de tirosina, hidroxilasa de triptófano y sintasa de óxido nítrico. Las pterinas están presentes en fluidos y tejidos fisiológicos en formas reducidas y oxidadas, sin embargo, únicamente la 5,6,7,8, tetrahydrobiopterina es biológicamente activa. Es una molécula quiral y el enantiómero 6R es conocido por ser el enantiómero biológicamente activo. Para una revisión detallada de la síntesis y trastornos de BH4, consultar la referencia Blau et al., 2001 (*Trastornos de tetrahydrobiopterina y aminos biogénicas relacionadas*. En: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B, eds. Bases Metabólicas y Moleculares de Enfermedad Heredada, 8ª edición, Nueva York: McGraw-Hill, 2001: 1275-1776).

20 Fiege et al., en su publicación *Genéticas y Metabolismo Molecular* 81:45-51 (2004), estudió la farmacocinética de la tetrahydrobiopterina administrada por vía oral (BH4), y sugirió una "variabilidad más bien grande de BH4 administrada por vía oral, probablemente debido a una diferente absorción en el intestino y/o al efecto del primer pasaje".

25 La patente US-A-4,550,109 muestra biopterinas lipoideas y tetrahydrobiopterinas que son solubles en aceite y que pueden ser formuladas como un producto farmacéutico con base en aceite para el tratamiento de la Fenilcetonuria, Parkinson, depresión, demencia senil, enfermedad de Alzheimer y enfermedades relacionadas con la deficiencia de biopterina.

El uso de tetrahydrobiopterina ha sido propuesto para tratar una variedad de diferentes estados de enfermedad, y existe la necesidad de métodos alternativos y mejorados para administrar este fármaco.

30 Resumen de la Invención

35 La presente invención hace referencia a 6R-(L-eritro)-5,6,7,8- tetrahydrobiopterina (BH4), o a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la hiperfenilalaninemia, de manera que mejore o maximice su biodisponibilidad por vía oral y/o mejore u optimice la consistencia de la biodisponibilidad por vía oral de una administración a la siguiente. Dichos usos pueden ser aplicados en el tratamiento de cualquier otro trastorno que responda a BH4, incluyendo enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, anemia y trastornos neuropsiquiátricos. Los usos de la presente invención permiten, de manera ventajosa, un mejor control de los síntomas clínicos, por ejemplo, fluctuación reducida en niveles de fenilalanina en plasma, presión sanguínea, niveles neurotransmisores, u otros parámetros clínicos.

40 Tal como se utiliza en la presente invención, BH4 hace referencia a 6R-(L-eritro)-5,6,7,8- tetrahydrobiopterina. El término BH4 tal como se utiliza en la presente invención, también debe comprenderse que significa, de manera opcional, una sal farmacéuticamente aceptable de 6R-(L-eritro)-5,6,7,7- tetrahydrobiopterina, a menos que el contexto lo indique de otra manera.

El alcance de la invención se encuentra limitado por las reivindicaciones anexas.

45 En un primer aspecto, la presente invención proporciona tetrahydrobiopterina (BH4) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, para su uso en el tratamiento de la hiperfenilalaninemia, en donde la BH4 o una sal de la misma, se administra por vía oral dentro de un periodo de 0 a 30 minutos después de una comida.

En un modo de realización a modo de ejemplo, se informa al paciente que la absorción de la tetrahidrobiopterina aumenta cuando se ingiere con alimentos, en comparación a cuando se ingiere sin alimentos. En algunos modos de realización, se informa al paciente de que la ingestión poco tiempo después de una comida, por ejemplo, una comida con alto contenido en grasa, o alto contenido calórico, da como resultado un incremento en cualquiera de uno, dos, tres o todos de los siguientes parámetros: concentración media en plasma, Cmax, AUC, AUC(0-t) y/o (AUC(inf)). En modos de realización a modo de ejemplo, al paciente se le informa de que la administración de BH4 con una comida con alto contenido en grasa incrementa Cmax y AUC en comparación con la administración de BH4 sin alimentos (en una condición en ayunas). En algunos modos de realización, el incremento relativo puede ser de al menos el 20% o el 30%, o más.

En modos de realización alternativos o adicionales a los modos de realización anteriores, el método para administrar tetrahidrobiopterina comprende informar al paciente que la absorción de tetrahidrobiopterina se incrementa cuando se ingiere como un comprimido intacto, en comparación a cuando se ingiere después de disolverse en un líquido. En algunos modos de realización, al paciente se le informa de que la ingestión de comprimidos intactos da como resultado un incremento en cualquiera de los siguientes parámetros: concentración media en plasma, la Cmax, el AUC, AUC(0-t) o AUC(inf). En realizaciones a modo de ejemplo, al paciente se le informa de que la administración de BH4 en la forma de un comprimido intacto incrementa la Cmax y el AUC, en comparación con la administración de BH4 después de disolverse en un líquido. En algunos modos de realización, el incremento relativo puede ser de al menos 20% o más.

Se pueden llevar a cabo cualquiera de los modos de realización anteriores, proporcionando o administrando tetrahidrobiopterina en un envase que contenga una etiqueta impresa que informe al paciente de los cambios en los parámetros de absorción descritos anteriormente.

La presente invención comprende el paso de proporcionar al paciente en necesidad de la misma, de una cantidad terapéuticamente efectiva de tetrahidrobiopterina. La cantidad terapéuticamente efectiva variará dependiendo de la condición a ser tratada, y puede determinarse fácilmente a través del médico que realiza el tratamiento, en base a mejoras en los síntomas clínicos deseados.

En un modo de realización a modo de ejemplo, dichos usos implican administrar BH4 en una forma disuelta, en donde la formulación se disuelve en un líquido que incluye, pero no se limita a, agua, jugo de naranja y jugo de manzana. Por lo tanto, BH4 puede ingerirse como un producto líquido o disolverse previamente a partir de una forma de dosificación sólida o semisólida antes de la ingestión. En un modo de realización adicional, la BH4 también puede disolverse en la cavidad oral a partir de una forma de dosificación sólida o semisólida antes de ingerir la solución disuelta.

En otra realización a modo de ejemplo, dichos usos implican administrar BH4 en una forma de dosificación sólida que incluye, pero no se limita a, comprimidos, cápsulas, caramelos, grageas, polvos y gránulos, o una forma semisólida, que incluye pero no se limita a un rociado oral en una gelatina, la cual se ingiere sin disolverse en un líquido que incluye, pero no se limita a, agua, jugo de naranja y jugo de manzana, antes de ingerirla.

En otro modo de realización, dichos usos implican administrar BH4, ya sea ingerido en forma de dosificación sólida o semisólida, o disuelto en un líquido, con alimentos, es decir, con una comida con un alto contenido en grasa o una comida con alto contenido en grasa y/o alto contenido calórico. La presente invención contempla además que la BH4, ya sea ingerido o disuelto, se administre en un momento específico que incluye pero no se limita a la mañana, el día, la noche, al mismo momento del día, con alimentos, por ejemplo, comida con alto contenido en grasa o una comida con alto contenido en grasa y/o alto contenido calórico, una o más veces al día. En una realización a modo de ejemplo, la BH4 se ingiere una vez al día como una forma de dosificación sólida justo después de las comidas. En un modo de realización preferente, la forma de dosificación sólida es un comprimido o una cápsula formulada. En más realizaciones a modo de ejemplo, la BH4 se ingiere dentro de un periodo de aproximadamente 0 a 30 minutos, o 5 a 20 minutos, de tomar una comida. Sin importar si se ingiere como una forma de dosificación sólida, forma de dosificación líquida o como una solución disuelta, la exposición *in vivo* (o biodisponibilidad) de la BH4 es mayor cuando se ingiere justo después de las comidas, en comparación con controles en ayunas.

La BH4 y el alimento pueden ser ingeridos al mismo tiempo, o bien la BH4 puede ser ingerida después del alimento. El período de tiempo entre el consumo del alimento y la toma de BH4, ya sea ingerido o disuelto, puede ser de al menos 5 minutos. Por ejemplo, BH4 puede administrarse 30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos o 5 minutos después de una comida.

En otro modo de realización, para algunos pacientes, por ejemplo adultos, los usos de la presente invención implican administrar un comprimido intacto, en lugar de disolver el comprimido en un líquido, con el objeto de mejorar su biodisponibilidad.

Se muestra un método para estabilizar la BH4 en el tracto intestinal de un paciente en la presente patente, disminuyendo el pH intestinal, por ejemplo utilizando polímeros de intercambio de protones. Los productos correspondientes que comprenden BH4 y excipientes de acidificación, tales como polímeros de intercambio de protones, también se contemplan.

- 5 Se muestra en la presente patente un método para incrementar el tiempo de residencia en el intestino de BH4, incluyendo, pero sin limitarse a, la disminución de la motilidad en el intestino utilizando un agente que ralentiza la motilidad intestinal, tal como un ácido graso y/o un éster de ácido graso de glicerol. Dichos agentes hidrofóbicos pueden incrementar la duración del tiempo que la BH4 permanece en el intestino, y puede incrementar la cantidad de BH4 que se absorbe. La duración de tiempo que BH4 permanece en el
- 10 intestino, cuando se formula con tal(es) agente(s), puede ser al menos una vez y media, al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, o al menos cinco veces mayor que la de una formulación de BH4 que no tenga dicho agente. Los ácidos grasos adecuados incluyen ácido oleico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido palmítico, ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido erucídico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido miristólico, y ácido palmitoleico. También se contempla para incrementar el
- 15 tiempo de residencia en el intestino para BH4, la inducción de la retención gástrica utilizando ácido algínico, y la bioadhesión utilizando polycarbofil. Se contemplan productos correspondientes que comprenden BH4 y agentes que ralentizan la motilidad intestinal.

- Se muestra en la presente patente un método para modificar la liberación de BH4 utilizando una formulación de liberación sostenida, tal como HPMC, carbómero, etc. Se contemplan productos correspondientes que son
- 20 formulaciones de liberación sostenida.

Se muestra en la presente patente una formulación líquida de tetrahidrobiopterina (BH4) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, incluyendo una solución acuosa de BH4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un antioxidante y un tampón de pH.

- Se muestra en la presente patente un método para elaborar una formulación líquida de tetrahidrobiopterina (BH4), o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, que incluye proporcionar una solución acuosa que contiene BH4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, agregar un antioxidante y un tampón de pH a la solución que contiene BH4, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, rociado de la solución acuosa que contiene BH4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, antes o después de la adición de un antioxidante y tampón de pH, con un gas inerte o dióxido de carbono, y sellar la solución
- 25 rociada que contiene BH4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, antioxidante y tampón de pH en un envase.

- También se revela en la presente patente un método mejorado para medir la BH4 utilizando espectrometría de masas en tándem y calculando la cantidad de biopterina reducida. Dichos métodos pueden proporcionar detección de BH4 para una sensibilidad de BH4 dentro del rango de 5 – 1000 ng/mL, con una precisión y exactitud tal como se ejemplifica mediante un coeficiente de variación (CV)% por debajo del 15% (20% en el
- 35 límite inferior de cuantificación, LLOQ). En una realización a modo de ejemplo, un método para la medición de BH4 utilizando HPLC (RP) acoplado con espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS), comprende los pasos de: (1) someter muestras de sangre, plasma, homogenados de tejido, u orina a oxidación; (2) someter las muestras oxidadas a yodometría; (3) pasar dichas muestras oxidadas a través de una columna de intercambio de iones; (4) medir la biopterina total y la oxidada en dichas muestras utilizando HPLC y una espectrometría de masas en tándem; y calcular la cantidad de biopterina reducida como la diferencia entre dichas biopterinas totales menos dicha forma oxidada. En un modo de realización, las muestras son tratadas con oxidación ácida, en donde el método comprende los pasos de (1) tratar dichas muestras con KCl, HCl o TCA; (2) someter las muestras oxidadas con ácido a yodometría; (3) pasar dichas muestras oxidadas a través
- 40 de una columna de intercambio de iones; (4) medir la biopterina total que comprende 6R-BH4, R-q-DHBP (la cual se reduce inmediatamente *in vivo* a 6R-BH4, de tal modo que la biopterina reducida medida se base principalmente en 6R-BH4), DHBP, y BP en las muestras utilizando HPLC y espectrometría de masas en tándem. En otro modo de realización, las muestras se tratan mediante oxidación alcalina, en donde el método comprende: (1) tratar dichas muestras con KI, I o NaOH; (2) someter dichas muestras oxidadas alcalinas a acidificación con HCl o TCA; (3) someter la yodometría de muestras oxidadas; (4) pasar dichas muestras a través de una columna de intercambio de iones; (5) medir la biopterina oxidada que comprende DHBP y BP utilizando HPLC y espectrometría de masas en tándem; y (6) calcular la cantidad de biopterina reducida (6R-BH4 + R-q-DHBP) como la diferencia entre las biopterinas totales menos la forma oxidada.
- 45
- 50

- Se muestra en la presente patente una solución de fase móvil para separación HPLC de fase inversa de dihidrobiopterina, biopterina y análogos de los mismos, incluyendo una solución acuosa que incluye metanol, acetato de sodio, ácido cítrico, EDTA, y 1,4-ditioeritritol. Se contempla de forma similar un método para separar dihidrobiopterina y biopterina, o análogos de los mismos, de una mezcla que contiene formas tanto de base como dihidro, que incluye llevar a cabo HPLC de fase inversa utilizando una fase móvil que comprende una solución acuosa que incluye metanol, acetato de sodio, ácido cítrico, EDTA, y 1,4-ditioeritritol, en una
- 55

mezcla que contiene dihidrobiopterina y biopterina, o un análogo de dihidrobiopterina y un análogo de biopterina.

Se muestra en la presente patente un método para cuantificar biopterinas en una mezcla de especies de biopterina, que incluye proporcionar una mezcla que comprende biopterina y al menos una entre dihidrobiopterina y biopterina o análogos de biopterina, y al menos una de entre dihidrobiopterina o tetrahydrobiopterina, separar las especies de biopterina en la mezcla de HPLC de fase inversa, y en el caso de tetrahydrobiopterina y análogos de la misma, llevar a cabo la detección electroquímica mediante la oxidación de la tetrahydrobiopterina y análogos de la misma presentes, por medio de un primer electrodo, a formas de dihidrobiopterina quinonoide, seguido de la reducción de las formas quinonoides nuevamente a la tetrahydrobiopterina y análogos de la misma presentes en un segundo electrodo, y medir la corriente generada mediante la reacción de reducción para determinar la concentración de especies, y/o en el caso de la dihidrobiopterina, análogos de la misma, la biopterina, o análogos de la misma, medir las especies mediante detección de fluorescencia después de la oxidación post-columna de especies de dihidrobiopterina a biopterina.

Para las composiciones y usos descritos en la presente patente, componentes preferentes, y rangos de composición de los mismos, pueden seleccionarse a partir de los diversos ejemplos que aquí se proporcionan.

Otras características y ventajas de la presente invención, resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 muestra un patrón de difracción de rayos-X en polvo, característico de la forma polimorfa cristalina B de 6R-(L-eritro)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterina.

La figura 2, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma A de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 3, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma F de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 4, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma J de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 5, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma K de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 6, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de hidrato C de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 7, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de hidrato D de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 8, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de hidrato E de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 9, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de hidrato H de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 10, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de hidrato O de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 11, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de solvato G de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 12, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de solvato I de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 13, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de solvato L de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahydrobiopterina.

La figura 14, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de solvato M de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La figura 15, es una gráfica del patrón de difracción de rayos-X característico mostrado por la forma de solvato N de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

5 La figura 16, es un diagrama de flujo para la medición de biopterina.

La figura 17, es un resumen de la validación del ensayo de biopterina.

La figura 18, es una tabla que muestra los parámetros farmacocinéticos de las biopterinas totales en plasma después de una administración única por vía oral de sapropterina (BH4) a ratas.

10 La figura 19, muestra la concentración de biopterina en plasma y la proporción de la forma reducida después de la administración de una dosis única de sapropterina (BH4) a ratas.

La figura 20, muestra la concentración de biopterina en plasma y la proporción de la forma reducida después de una administración de dosis única de sapropterina (BH4) a monos.

La figura 21, es una tabla que muestra los parámetros farmacodinámicos de las biopterinas totales en plasma después de la administración de una dosis única de sapropterina (BH4) a monos.

15 La figura 22, muestra el programa de eventos para la evaluación de seguridad.

La figura 23, muestra las concentraciones de media en plasma de BH₄ después de la administración por vía oral de 10 mg/kg de BH₄ como comprimidos disueltos e intactos bajo condiciones de ayuno, y comprimidos intactos bajo condiciones de alimentación a voluntarios sanos – ejes lineales.

20 La figura 24, muestra las concentraciones medias en plasma de BH₄ después de la administración por vía oral de 10 mg/kg de BH₄ como comprimidos disueltos e intactos bajo condiciones de ayuno, y comprimidos intactos bajo condiciones de alimentación a voluntarios sanos – ejes semi-logarítmicos.

La figura 25, muestra una tabla que resume los parámetros farmacocinéticos de BH₄ después de la administración por vía oral de 10 mg/kg de BH₄ como comprimidos disueltos e intactos bajo condiciones de ayuno, y comprimidos intactos bajo condiciones de alimentación a voluntarios sanos.

25 La figura 26, muestra una comparación estadística de parámetros farmacocinéticos para BH₄ después de la administración por vía oral de 10 mg/kg de BH₄ como comprimidos disueltos e intactos bajo condiciones de ayuno, y comprimidos intactos bajo condiciones de alimentación a voluntarios sanos.

30 La figura 27, muestra un estudio de estabilidad de BH₄, formulado con 5% de manitol en una solución acuosa, tanto antes como después de dos semanas almacenado a una temperatura de -20°C.

La figura 28, muestra un perfil de disolución de una formulación de cápsulas de BH₄, tanto antes como después de su almacenamiento durante 54 días a una temperatura de 40°C.

La figura 29, muestra un perfil de disolución de dos formulaciones de BH₄ – un comprimido bioadhesivo de BH₄ y gránulos bioadhesivos de BH₄.

35 La figura 30, muestra un perfil de disolución de diversas formulaciones de liberación sostenida de BH₄.

La figura 31, muestra un perfil de disolución de diversas formulaciones de liberación sostenida de BH₄.

La figura 32, muestra un diagrama esquemático de formulaciones de dosificación flotante de BH₄.

40 La figura 33, muestra un perfil de disolución de diversas formulaciones de dosificación flotante.

La figura 34, muestra un diagrama esquemático de formas de dosificación de generación de gas de BH₄.

La figura 35, muestra un perfil farmacocinético de diversas formulaciones BH4.

La figura 36, muestra un estudio de estabilidad de formulaciones de BH4 por vía intravenosa en un pH 4 durante 35 días.

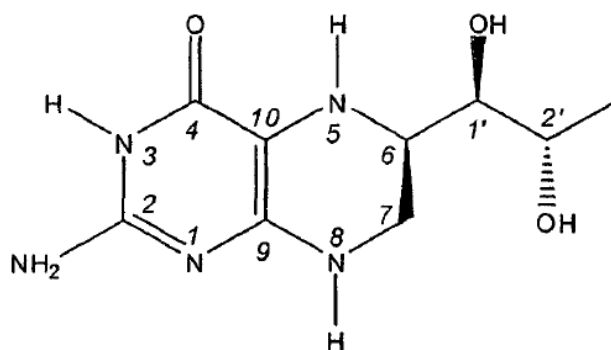
5 La figura 37, muestra un estudio de estabilidad de diversas formulaciones de BH4 por vía intravenosa durante 350 horas.

La figura 38, muestra un estudio de estabilidad de formulaciones de BH4 por vía intravenosa en diversas concentraciones de BH4.

Descripción de los modos de realización preferentes

10 La presente invención proporciona tetrahidrobiopterina (BH4) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de la hiperfenilalaninemia, en donde la BH4 o una sal de la misma, se administra por vía oral dentro de un periodo de 0 a 30 minutos después de una comida, o para el uso de la tetrahidrobiopterina (BH4) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma en la elaboración de un medicamento para tratar la hiperfenilalaninemia, en donde el medicamento es para su administración individual por vía oral dentro de un periodo de 0 a 30 minutos después de una comida. La presente invención
15 se basa en el descubrimiento de que la tetrahidrobiopterina (BH4) administrada por vía oral tiene una baja absorción gastrointestinal, la cual es un factor principal que contribuye a la baja biodisponibilidad de BH4.

La estructura química de 6R-(L-eritro)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) se muestra a continuación:



20 La tetrahidrobiopterina es un compuesto orgánico soluble en agua con una baja solubilidad de lípidos. En base a un análisis experimental in silico utilizando el software BioLoom (versión 1.5 de Biobyte Corp en Claremont, California), se determinó que el coeficiente de división de octanol-agua de BH4 era de -1.17. La penetración óptima de las membranas biológicas, tal como se aproxima mediante el coeficiente de reparto de octanol/agua, ocurre en aproximadamente un logaritmo P de una solubilidad lipídica 2 ó 100-x veces mayor. Aunque un ClogP bajo permite que este sustrato se solubilice fácilmente bajo condiciones fisiológicas, la capacidad del sustrato para penetrar las capas bilípidas dentro de las membranas biológicas se encuentra restringida, lo cual puede limitar la biodisponibilidad por vía oral.
25

Los estudios in vivo en ratas y monos descritos en la presente patente, muestran que únicamente del 8 al 11% de BH4 es absorbido en el intestino, siendo la mayor parte excretada en las heces cuando se compara con la administración por vía intravenosa de BH4 en dosis similares. Dicha variabilidad en la absorción de BH4, también fue mostrada en un estudio descrito en la presente invención sobre el efecto de los alimentos en la biodisponibilidad de BH4 en humanos sanos. Aunque la administración de BH4 en agua y jugo de naranja, bajo condiciones de ayuno, da como resultado concentraciones medias en plasma y valores de media comparables para Cmax y AUC(0-t), la administración de BH4 concurrente con una comida con alto contenido en grasa, o alto contenido calórico de cómo resultado un incremento significativo en las concentraciones medias en plasma y valores de media para Cmax y AUC(0-t) cuando BH se administró en agua.
30
35

Aunque existe una amplia literatura que describe la biodisponibilidad incrementada en condiciones de alimentación, este efecto de la alimentación se observa habitualmente con fármacos lipofílicos (es decir solubles en lípidos) insolubles en agua, y no de forma habitual con una sustancia activa soluble en agua de alto nivel, tal como BH4. La explicación usual para los incrementos en la biodisponibilidad bajo condiciones de alimentación para compuestos lipofílicos, es que los alimentos con alto contenido en grasa ayudan a
40

solubilizar el fármaco, ya que “elemento similar disuelve otro elemento similar” y esto los hace disponibles para su absorción. Otra explicación posible es que los alimentos con alto contenido en grasa estimulan la secreción de ácidos biliares, los cuales son biotensoactivos naturales que ayudan a solubilizar y emulsificar las grasas que comemos para ayudar a su digestión. Estos ácidos biliares también se considera que solubilizan las grasas de los compuestos insolubles en agua, haciéndolos, de esta forma, disponibles para su absorción. Sin embargo, la BH4 no necesita solubilización para ser absorbido, ya que su solubilidad es mayor a 1000 mg/ml y el compuesto es uno de los fármacos más solubles conocidos. Por consiguiente, el aumento de su biodisponibilidad mediante comidas con alto contenido en grasa, o alto contenido en energía no es consistente con dicho mecanismo conocido.

Sin embargo, la administración como una forma de dosificación sólida o semi-sólida y/o con un alimento con alto contenido en grasa, puede maximizar la biodisponibilidad, incrementando el tiempo de residencia de BH4 en los medios ácidos del estómago, y el tracto gastrointestinal superior (GIT) donde BH4 es químicamente estable. La estabilidad de BH4 disminuye con el pH en aumento y su vida media en una solución tampón con un pH 6.8, el cual es aproximadamente el pH del intestino delgado, es de aproximadamente 15 minutos. A un pH de 3.1, el cual se encuentra dentro del área del pH habitual del estómago en voluntarios comunes, la estabilidad de BH4 en una concentración de 1 mg/ml es de aproximadamente 3 horas. La estabilidad química de BH4 puede aumentar además cuando el pH del estómago cae por debajo de un pH 3.1. Por consiguiente, el tiempo de residencia prolongado en el estómago, proporciona el fármaco intacto a la pared del estómago para su absorción, mientras que el vaciado rápido hacia el intestino degrada la BH4, y por lo tanto no se encuentra disponible para ser absorbido.

Por lo tanto, para maximizar la biodisponibilidad por vía oral de BH4 en cada administración, la BH4 debe tomarse con alimentos, por ejemplo, alimentos con alto contenido en grasa o una comida con alto contenido en grasa y/o alto contenido calórico.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término “biodisponibilidad” hace referencia a la fracción de una dosis administrada de un fármaco que se introduce en la circulación sistémica. Si el fármaco se administrara por vía intravenosa, entonces su biodisponibilidad sería, teóricamente, del 100%. Sin embargo, si el fármaco se administrara por otras vías (tal como la vía oral), entonces su biodisponibilidad sería menor al 100% como resultado de, por ejemplo, una absorción incompleta en el tracto GI, su degradación o metabolismo previo a su absorción, y/o el efecto del primer paso hepático.

El término “comida con alto contenido en grasa” hace referencia, en general, a una comida de al menos aproximadamente 700 kcal, y al menos aproximadamente un 45% de grasa (porcentaje relativo de Kcal que son grasa), o, de manera alternativa, al menos aproximadamente 900 kcal y al menos aproximadamente un 50% de grasa. El término “alimento con alto contenido en grasa” hace referencia, en general, a un alimento que comprende al menos 20 g de grasa, o al menos 25, 30, 35, 40, 45, ó 50 g de grasa, y/o al menos aproximadamente un 45% o 50% de grasa. Una Guía de la FDA define una “comida con alto contenido en grasa”, como aproximadamente el 50% del contenido calórico total de la comida, mientras que una “comida con alto contenido calórico” es de aproximadamente 800 a 1000 calorías. La FDA recomienda una comida con alto contenido en grasa y alto contenido calórico como una comida de prueba para los estudios de biodisponibilidad con el efecto de alimentos y bioequivalencia de alimentación. Esta comida de prueba debe derivar aproximadamente 150, 250, y 500-600 calorías a partir de proteínas, carbohidratos y grasa, respectivamente. Una comida de prueba a modo de ejemplo, consiste en dos huevos fritos en mantequilla, dos tiras de beicon, cuatro onzas de patatas picadas y ocho onzas de leche entera. La sustitución es posible, si una cantidad similar de calorías precedentes de proteínas, carbohidratos y grasas tiene un volumen y viscosidad del alimento comparable (Guidance for Industry, Food-Effect Bioavailability and Fed Bioequivalence Studies, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Diciembre 2002).

En un primer aspecto, la presente invención proporciona tetrahidrobiopterina (BH4) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de la hiperfenilalaninemia, en donde la BH4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra por vía oral dentro de un periodo de 0 a 30 minutos después de una comida.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de tetrahidrobiopterina (BH4) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la elaboración de un medicamento para tratar la hiperfenilalaninemia, en donde el medicamento es para su administración individual por vía oral dentro de un periodo de 0 a 30 minutos después de una comida.

En algunos modos de realización, se informa al paciente de que la administración de tetrahidrobiopterina con alimentos tiene un efecto en la farmacocinética. En un modo de realización a modo de ejemplo, se informa al paciente de que la absorción de tetrahidrobiopterina se incrementa cuando se ingiere con un alimento, en comparación con cuando se ingiere sin alimentos. En algunos modos de realización, se informa al paciente de

que la ingestión poco después de una comida, por ejemplo, una comida con alto contenido en grasa, o alto contenido calórico, da como resultado un incremento en cualquiera de uno, dos, tres o todos los siguientes parámetros: concentración media en plasma, Cmax, AUC, AUC(0-t) y/o AUC(inf). En modos de realización a modo de ejemplo, se informa al paciente de que la administración de BH4 con una comida con alto contenido en grasa incrementa la Cmax y el AUC, en comparación con la administración de BH4 sin alimentos (en una condición de ayuno). En algunos modos de realización, el incremento relativo puede ser de, al menos, 20% o 30% o más.

En modos de realización alternativos, o adicionales a los modos de realización anteriores, se informa al paciente de que la absorción de tetrahidrobiopterina aumenta cuando se ingiere como un comprimido intacto en comparación a cuando se ingiere después de disolverse en un líquido. En algunos modos de realización, se informa al paciente de que la ingestión de comprimidos intactos da como resultado un incremento en cualquiera de los siguientes parámetros: concentración media en plasma, Cmax, AUC, AUC(0-t) o AUC(inf). En realizaciones a modo de ejemplo, se informa al paciente de que la administración de BH4 como un comprimido intacto aumenta la Cmax y el AUC en comparación con la administración de BH4 después de disolverse en un líquido. En algunos modos de realización, el aumento relativo puede ser de al menos 20% o más.

Cualquiera de los modos de realización anteriores puede llevarse a cabo proporcionando o administrando tetrahidrobiopterina en un envase que contenga una etiqueta impresa que informe al paciente del cambio en los parámetros de absorción descritos anteriormente.

La presente invención comprende el paso de proporcionar al paciente que necesita del mismo, una cantidad terapéuticamente efectiva de tetrahidrobiopterina. La cantidad terapéuticamente efectiva variará dependiendo de la condición a ser tratada, y puede ser determinada fácilmente por el médico que realiza el tratamiento en base a la mejoría en los síntomas clínicos deseados.

En una realización a modo de ejemplo, dichos usos implican administrar BH4 en una forma disuelta, en donde la formulación se disuelve en un líquido que incluye, pero no se limita a, agua, jugo de naranja, y jugo de manzana. Por lo tanto, la BH4 puede ser ingerida como un producto líquido o disuelto previamente a partir de una forma de dosificación sólida o semi-sólida previa a la ingestión. En un modo de realización adicional, la BH4 también puede disolverse en la cavidad oral a partir de una forma de dosificación sólida o semi-sólida antes de ingerir la solución disuelta.

Estas aproximaciones maximizan la tasa de absorción y la biodisponibilidad, asegurando que la BH4 sea disuelta completamente en la solución o fluidos biológicos antes de que se suministre a sus sitios de absorción, que son principalmente el estómago y el intestino. La disolución de ingredientes farmacéuticos activos o fármacos en la solución es un requisito previo para la absorción en la circulación sistémica (sangre y sistema linfático). Cuando las formas de dosificación sólida, tal como comprimidos y cápsulas, se administran por vía oral, van a través de una serie de pasos secuenciales tal como la desintegración en gránulos, desagregación en polvos y la disolución previa a la absorción en la circulación sistémica. Esta serie de pasos son derivados mediante la administración de formas de dosificación líquida, semi-sólida, y sólida de rápida disolución. Por lo tanto, la sustancia activa está disponible antes para su absorción, y debido a que no existe garantía de que la forma de dosificación sólida libere toda la sustancia activa contenida dentro de la misma antes de que transite a través de los sitios de absorción, las formulaciones en las que está presente la sustancia activa en forma disuelta, antes de que alcance los sitios de absorción, normalmente muestra la mayor biodisponibilidad.

Estas formas de dosificación reducen la variabilidad en niveles de sangre debido a que se elimina la desintegración y disolución *in vivo* de la forma de dosificación en humanos. La tasa de desintegración y disolución *in vivo* de una forma de dosificación sólida de BH4 dirigida para la liberación inmediata en el estómago, depende de la variabilidad de humano a humano en el pH del fluido gástrico - con alimento y sin alimento (ayuno) - y de la resistencia de la intensidad de agitación del estómago, tal como se determina mediante la resistencia de las tasas de motilidad gástrica y vaciamiento gástrico en el intestino delgado. Ya que las formas de dosificación líquida, semi-sólida, en grageas/caramelos, y sólidas de disolución rápida no tienen que ser sometidas a desintegración y disolución, sus niveles en sangre son menos variables que cuando BH4 se administra como forma de dosificación sólida de liberación inmediata (comprimidos y cápsulas).

En otra realización a modo de ejemplo, dichos usos implican administrar BH4 en una forma de dosificación sólida que incluye, pero no se limita a, comprimidos, cápsulas, caramelos, grageas, polvos y gránulos, o una forma semi-sólida, que incluye, pero no se limita a, un rociado oral en gelatina, que se mastica o se ingiere sin disolverse en un líquido, que incluye, pero no se limita a, agua, jugo de naranja y jugo de manzana, antes de ingerirse.

En otro modo de realización, tales usos implican administrar BH4, ya sea ingeridos como una forma de dosificación sólida o semi-sólida, o disueltos en un líquido, con alimentos, por ejemplo un alimento con alto contenido en grasa o una comida con alto contenido en grasa y/o alto contenido calórico. La presente invención contempla además que BH4, ya sea ingerido o disuelto, se administre en un momento específico que incluye, pero no se limita a, la mañana, día, noche, algún momento del día, con alimento, por ejemplo, un alimento con alto contenido en grasa o una comida con alto contenido en grasa y/o alto contenido calórico, una o más veces al día. En una realización a modo de ejemplo, BH4 se ingiere una vez al día como una forma de dosificación sólida justo después de las comidas. En un modo de realización preferente, la forma de dosificación sólida es un comprimido o cápsula formulada. En más realizaciones a modo de ejemplo, BH4 se ingiere dentro de un periodo de aproximadamente 0 a 60 minutos, aproximadamente 0 a 30, o 5 a 20 minutos de tomar una comida. Sin importar si se ingiere como una forma de dosificación sólida, forma de dosificación líquida o como una solución disuelta, la exposición *in vivo* (o biodisponibilidad) de BH4 es mayor cuando se ingiere justo después de las comidas, en comparación con controles en ayuno.

La BH4 y el alimento pueden ingerirse aproximadamente al mismo tiempo, o bien la BH4 puede ingerirse después de los alimentos. El período de tiempo entre el consumo de un alimento, por ejemplo, un alimento con alto contenido en grasa o una comida con alto contenido en grasa y/o alto contenido calórico, y tomando BH4 ya sea ingerido o disuelto, puede ser de al menos 5 minutos. BH4 se puede administrar 60 minutos, 30 minutos, 25 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 10 minutos, o 5 minutos después de la ingestión de una comida.

En otro modo de realización, para algunos pacientes, por ejemplo adultos, los usos de la presente invención implican administrar un comprimido intacto en lugar de disolver el comprimido en un líquido, con el objeto de mejorar la biodisponibilidad.

La administración de BH4 de acuerdo con la presente invención, da como resultado concentraciones medias en plasma y/o tasa de absorción gastrointestinal y/o valores de media para la C_{max} y/o AUC(0-t) y/o AUC (inf) que exceden los valores cuando BH4 se administra bajo condiciones de ayuno.

La administración de un comprimido disuelto, ya sea en agua o jugo de naranja, o un comprimido intacto después de una comida con alto contenido en grasa/ alto contenido calórico, dio como resultado un incremento en C_{max} y AUC, que se encuentra en un rango de aproximadamente un 30% (comprimido intacto) a un 80% (agua). La administración de BH4 en la forma de un comprimido intacto, después de una comida con alto contenido en grasa y alto contenido calórico, dio como resultado aproximadamente el 30% de aumento en el grado de absorción en comparación con la administración sin alimentos. La administración de BH4 como un comprimido intacto dio como resultado un aumento de aproximadamente el 20% en el grado de absorción, en comparación con la administración de comprimidos disueltos.

El término "concentración media de plasma" significa la media de las lecturas de la concentración en una serie de muestras en plasma.

"C_{max}" significa la concentración en plasma máxima observada.

"AUC" significa el área bajo la curva de concentración en plasma - tiempo.

"AUC_{0-t}" significa el área bajo la curva de concentración en plasma - tiempo, desde el tiempo 0 hasta el momento de la última concentración medible.

"AUC_(inf)" significa el área calculada bajo la curva de concentración en plasma - tiempo, desde el tiempo 0 hasta el infinito.

La "tasa de absorción gastrointestinal" de BH4, se estima a partir del área bajo la curva de aumento en la concentración de biopterina total en plasma (ΔC_p) - tiempo (ΔAUC) después de la administración de BH4 utilizando la siguiente fórmula:

Tasa de absorción (%) =

(ΔAUC después de dosis p.o. / ΔAUC después de dosis i.v.) X (dosis i.v./dosis p.o. x 100)

De manera preferente, se utiliza al menos el 99.5% de 6R-BH4 puro. Cualquier sal, incluyendo la sal de diclorhidrato, y cualquier forma cristalina de BH4 se puede utilizar de acuerdo con los métodos y composiciones de la presente invención. Se describen una variedad de sales y formas cristalinas en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2006/0040946, y/o la formulación sólida estable descrita en la Publicación Internacional No. WO 06/55511. Las diversas formas cristalinas pueden ser conformadas convenientemente en un comprimido, polvo, u otro sólido para su administración oral.

Se muestra en la presente patente un método para estabilizar BH4 disminuyendo el pH intestinal, utilizando polímeros de intercambio de protones. La BH4 se administra por vía oral a diario como una forma de dosificación sólida o líquida que comprende ingredientes inactivos que aumentan la estabilidad de BH4 más allá del estómago, mediante la disminución del pH del intestino, y evitando de esta forma que BH4 se oxide rápidamente. Ya que BH4 es más estable en un medio ácido que en un medio básico, los excipientes de acidificación/ ingredientes inactivos están incluidos en formulaciones de dosificación sólida (comprimidos, cápsulas, etc) de BH4, para disminuir el pH de los fluidos intestinales y de esta forma aumentar la estabilidad química. El área o ventana mayor del tracto gastrointestinal (GIT) disponible para absorción, optimiza la consistencia de absorción expandiendo la actual ventana de absorción limitada, considerada como limitada al estómago y el duodeno, hasta el intestino. Dichas formas de dosificación incluyen, pero no se limitan a, comprimidos efervescentes, polvos y gránulos (que serán re-suspendidos en líquidos antes de la administración) y materiales acidificantes. A diferencia de ácidos de moléculas pequeñas, los ácidos poliméricos voluminosos permanecen en el GIT durante más tiempo, y no son absorbidos por el GIT, aunque donan sus protones a los fluidos del GIT para disminuir el pH del entorno. Los ejemplos de excipientes/ ingredientes inactivos que comprenden la formulación son moléculas pequeñas de ácido carboxílico, tales como ácidos maleicos, fumáricos y cítricos o moléculas pequeñas inorgánicas tales como ácido fosfórico, ácido acético y sus formas de sal. Otros ejemplos son ácidos farmacéuticamente aceptable, tales como clases de ácido carboxílico polimérico, incluyendo ácidos polimetacrílicos, carbómeros, policarbofil, Eudragits, formas de ácido de croscarmelosa y ácido glicólico de almidón, etc. Las formulaciones también contienen excipientes adicionales para aumentar la estabilidad tal como antioxidantes (por ejemplo tioles tales como cisteína, cisteína de N-acetilo, etc; ácido ascórbico, metionina; etc.) y otros excipientes conocidos en el mercado para permitir su fabricación, y aumentar la calidad y atributos de rendimiento de la formulación.

Se muestra en la presente patente un método para incrementar el tiempo de residencia de BH4 en el intestino, que incluye, pero no se limita a, disminuir la motilidad del intestino utilizando un agente que tenga la capacidad de disminuir la motilidad en el intestino de BH4, tal como un ácido graso y/o éster de ácido graso de glicerol. Los ácidos grasos pueden incluir ácido oleico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido palmítico, ácido arquidoico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido erucídico, ácido mirístico, ácido laúrico, ácido miristólico, y ácido palmitólico. También contemplado para incrementar el tiempo de residencia en el intestino de BH4, se encuentra la inducción de retención gástrica utilizando ácido algínico, y bioadhesión utilizando policarbofil. En un modo de realización, las formas de dosificación de BH4 se administran como formulaciones flotantes por vía oral que flotan y liberan BH4 en un modo definido en el fluido gástrico, y son retenidos, durante más tiempo en el estómago debido a que son más resistentes al vaciamiento gástrico del estómago que formulaciones que no son flotantes o se disuelven rápidamente en el estómago. Esta aproximación del diseño está basada en la gastro-retención de la forma de dosificación a través del uso de un excipiente que genera gas dentro de la forma de dosificación, excipientes de baja densidad que convierten la forma de dosificación flotante en fluidos del GIT o una combinación de materiales de gas y de baja densidad en una forma de dosificación que permite la flotación de la forma de dosificación en los contenidos fluidos del GIT. La retención prolongada y la liberación de la forma de dosificación en el medio del estómago, en donde BH4 es más estable en sus fluidos ácidos, aumentará tanto el tiempo de residencia de la forma de dosificación en el estómago como la estabilidad de BH4, y por lo tanto vuelve BH4 disponible para una absorción en un período de tiempo más largo en el estómago y el duodeno, que una forma de dosificación de comprimido y cápsula estándar. Las formulaciones de BH4 comprenderán uno o más antioxidantes, excipientes conocidos en el campo para habilitar la fabricación y la desintegración/ disolución de la forma de dosificación sólida y excipientes adicionales que generan un gas o una mezcla de gas (por ejemplo, dióxido de carbono) ante el contacto de la formulación con un medio acuoso y/o fluidos del GIT. Resultan preferentes antioxidantes solubles en agua, por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, y tioles (cisteína, cisteína de N-acetilo y glutatona) o antioxidantes que se convierten a un antioxidante soluble del GIT, por ejemplo, palmitato de ascorbilo que se convierte a ácido ascórbico en el GIT. Los excipientes añadidos a la formulación incluyen carbonatos y bicarbonatos que reaccionan directamente con BH4 para formar dióxido de carbono y ácidos pequeños y poliméricos descritos anteriormente para reaccionar con los carbonatos y bicarbonatos para producir dióxido de carbono adicional, según se necesite.

Las formas de dosificación de BH4 pueden ser administradas de tal forma que se adhieran durante un período de tiempo prolongado a las superficies mucosas del GIT (es decir, formulación bioadhesiva), de manera preferente en, pero por ningún medio limitado a, el estómago, donde debido a la acidez de los fluidos gástricos, la BH4 es más estable que en el intestino. BH4 se libera en una forma controlada de la forma de dosificación bioadhesiva. La forma de dosificación sólida se encuentra diseñada para contener BH4, uno o más antioxidantes, excipientes conocidos en el área para permitir la fabricación de formas de dosificación de calidad y el control de desintegración/ disolución de la forma de dosificación y un aditivo bioadhesivo tal como policarbofil en su forma de ácido libre o como una forma de sal. Otros ácidos poliméricos tales como ácidos polimetacrílicos, carbómeros y derivados de celulosa, por ejemplo, HPMC, HPC, etc, pueden combinarse con o substituirse por el policarbofil. Los antioxidantes son preferentemente solubles, por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, cisteína, cisteína de N-acetilo y glutatona, o pueden convertirse a un antioxidante soluble tal como ácido ascórbico en el GIT, por ejemplo, palmitato de ascorbilo. En un modo de realización,

los componentes de la formulación se mezclan juntos y se fabrican como una forma de dosificación sólida, por ejemplo, comprimidos o cápsulas. Las formas de dosificación sólida pueden ser recubiertas de forma entérica para suministrar BH4 más allá del estómago en el intestino, y recubierta de forma no entérica diseñada para liberar BH4 en el estómago. En otro modo de realización, los componentes de la forma de dosificación sólida pueden ser subdivididos en diferentes porciones y se mezclan diferentes porciones por separado antes de que sean procesadas para formar formas de dosificación de capas múltiples. La forma de dosificación de capa múltiple puede contener el bioadhesivo y unos pocos excipientes en la capa externa de un comprimido, envueltos alrededor de otras capas que contienen BH4 (es decir, la región activa dentro de la envoltura de bioadhesivo) o como un tapón cilíndrico envuelto contenido en una cápsula en donde se ensamblan una o más de otras capas, bajo o dentro de la envoltura de bioadhesivo. De manera alternativa, el bioadhesivo y las otras capas en los tapones del comprimido o cápsula, pueden elaborarse en capas en una configuración bi o multicapa paralela. Estos diseños permiten que el bioadhesivo interactúe con la membrana del GI o la mucosa de la membrana del GI, para anclar la forma de dosificación a la membrana, ralentizando su tránsito a través del tracto GI e incrementando de esta forma el tiempo de residencia. Dichas formas de dosificación también pueden ser recubiertas de forma entérica. Aún otro modo de realización de la invención consiste en emplear ingredientes inactivos poliméricos (excipientes) con grupos funcionales que enlazan a la mucosa del GIT para retrasar el tránsito de la forma de dosificación a través del GIT. Las formas de dosificación de BH4 se formulan con excipientes de polímero tiolados (polímero-SH) tal como policarbofil-cisteína, ácido polipolimetacrílico-cisteína, carboximetilcelulosa-cisteína, derivados de quitosano-cisteína, etc. Estos polímeros tiolados confieren propiedades tanto de bioadhesivo como antioxidantes en la BH4, aumentando en forma considerable su absorción. Otros excipientes incluidos en estas formulaciones son antioxidantes y excipientes que ayudan al rendimiento y fabricación.

Aún en otro modo de realización, las formas de dosificación que contienen excipientes inactivos o ingredientes activos se utilizan para ralentizar la motilidad gástrica. Ralentizar el tránsito de la forma de dosificación BH4 a través del tracto GIT, incrementará el tiempo de residencia de la molécula y de esta forma permitirá que se absorba una mayor fracción de la dosis administrada. Considerados generalmente como seguros, los excipientes (GRAS) empleados en formulaciones orales para retrasar el vaciamiento gástrico y/o retrasar la motilidad intestinal, contienen preferentemente grasas dietéticas, tales como ácidos grasos, glicéridos de ácidos grasos y derivados de ácidos grasos, y glicéridos tales como Cremophor™ (derivados de aceite de ricino de polioxilo), etc. Los excipientes activos incluyen agentes que retrasan la motilidad en el intestino, tal como agentes anti-muscarínicos o anti-colinérgicos generales o selectivos (M₃).

Se muestra en la presente patente un método para modificar la liberación de BH4 utilizando una formulación de liberación sostenida, tal como HPMC, carbómero, etc. Este concepto comprende suministrar las formas de dosificación BH4 al tracto GI modificando o alterando la liberación de BH4 de liberación inmediata a liberación lenta, prolongada, controlada o programada. La liberación lenta, prolongada y controlada se logra utilizando excipientes conocidos en la técnica y la BH4 se protege dentro del sistema de administración de la degradación química a través de la presencia de potenciadores de la estabilidad, tales como anti-oxidantes. Dichos métodos pueden maximizar la biodisponibilidad, ya que la BH4 es estabilizada dentro de la formulación, y en el entorno que rodea la formulación, para permitir que la molécula activa sea absorbida intacta en la circulación sistémica, a medida que la formulación transita por la total longitud del GIT. Esta aproximación proporciona una mayor ventana del GIT para la absorción, y lo hace evitando la degradación de BH4 en el medio de pH más alto, de modo que BH4 esté disponible para ser absorbido. Los antioxidantes serán incluidos en la formulación para proteger al fármaco de la degradación en los fluidos intestinales, debido a un pH casi neutro de los fluidos intestinales. La administración lenta, prolongada y controlada también suministrará la BH4 a regiones de tensión de oxígeno de bajo nivel del GIT. La liberación programada se logra utilizando excipientes conocidos en la técnica tales como polímeros sensibles a pH que se disuelven únicamente cuando el pH alcanza un valor en donde el polímero es soluble.

En otro modo de realización, la presente invención contempla el recubrimiento entérico de la forma de dosificación de BH4 para confirmar si al incluir excipientes ácidos en una formulación de BH4, se incrementa de hecho la absorción de BH4, disminuyendo el pH del intestino y de esta forma estabilizando BH4 en el intestino para que sea disponible para su absorción. Por lo tanto, el recubrimiento entérico será utilizado para mantener los excipientes y el fármaco juntos en el sitio en donde se espera que el excipiente proteja la BH4. Si se permite que la forma de dosificación de BH4 se desintegre en el estómago, los excipientes ácidos pueden no vaciarse juntos en el estómago, y pueden no proporcionar protección.

El recubrimiento entérico protege compuestos susceptibles de degradación catalizada por ácidos en el estómago, de que se degraden por el ácido en el estómago. Los materiales de recubrimiento entérico evitan que el comprimido o cápsula libere el compuesto activo en el estómago debido a que los materiales de recubrimiento entéricos son insolubles en ácido. Una vez que la forma de dosificación recubierta entérica alcanza el intestino, donde el valor de pH varía de pH 5 a 8, los materiales se vuelven solubles y liberan la sustancia activa en el intestino. En contraste, las formulaciones de liberación sostenida se diseñan para liberar medicamentos en una longitud/área del GIT tan larga como sea posible. El recubrimiento de una formulación

de liberación sostenida para liberar solo pasada el área del estómago, puede ser necesario únicamente si los medicamentos contenidos son lábiles al ácido.

BH4 es altamente susceptible a la oxidación en solución acuosa y en soluciones de pH acuoso fisiológico (Davis, et al., Eur. J. Biochem. 173, 345-351 (1988); Kirsch, et al., J. Biol. Chem. 278, 24481-24490 (2003)).

La mayor parte de las determinaciones de la estabilidad BH4 han sido llevadas a cabo en soluciones neutras a levemente alcalinas con un pH de 7.4, para mimetizar el comportamiento probable de estabilidad de BH4 bajo una condición de pH de plasma fisiológico. Aunque la Solicitud de Patente Europea No. 1 757 293 A revela formulaciones líquidas o en jarabe, dichas formulaciones consisten en mezclas de polvo o granulaciones en estado sólido que requieren la reconstitución con agua antes de la ingestión oral. El presente aspecto de la invención contempla formulaciones líquidas no limitadas a polvos o granulaciones para su constitución. La presente invención también contempla formulaciones líquidas en compuesto con la capacidad de mantenerse estables a temperatura ambiente durante un período de tiempo suficiente para permitir el procesamiento en instalaciones de llenado de producto/terminado estériles que serán contenidas en ampollas, botellas o viales como un producto líquido, o contenidas en viales que serán secados por congelación en productos liofilizados.

Las formulaciones líquidas y liofilizadas para su reconstitución, también pueden administrarse a través del canal nasal, oftálmico y ótico para efectos terapéuticos. La formulación de un producto liofilizado requiere la disolución previa de BH4 en un líquido, preferentemente acuoso, y el procesamiento del producto líquido en una instalación estéril (es decir, generación de compuestos, filtración estéril y llenado de líquido filtrado estéril en viales antes de cargar los viales llenos en un liofilizador para su liofilización). El mantener la estabilidad de BH4 solubilizado durante el procesamiento estéril y evitar su degradación, son requisitos previos clave para fabricar un producto liofilizado que satisfaga la especificación de impurezas para el producto terminado de relleno. Por consiguiente, la composición del producto liofilizado contiene estabilizadores adecuados que minimizan o eliminan la degradación de BH4 durante el proceso de llenado de terminado. Las formulaciones descritas en la presente patente pueden estabilizar las soluciones de BH4 durante la fabricación de llenado/terminado estéril, un proceso que lleva un mínimo de seis horas, y también proporciona un producto comercialmente estable.

Las formulaciones incluyen BH4, preferentemente en una concentración que se encuentra en un rango de 0.1 mg/ml a 10 mg/ml. Debido a la alta solubilidad de BH4, las formulaciones con concentraciones de hasta aproximadamente 100 mg/ml, por ejemplo, también pueden ser preparadas. La elaboración y métodos para la composición relativa general aquí descritos, se pueden aplicar para elaborar soluciones altamente concentradas.

Las formulaciones líquidas de BH4 se formulan preferentemente en soluciones tampón con pH de 1 a 8, preferentemente soluciones tampón de pH 2 a 7. Los tampones de pH elegidos, son compuestos tampón con la capacidad de proporcionar una capacidad efecto tampón sustancial en un pH particular deseado, según se evalúa mediante lo cerca que se encuentre la constante o constantes de ionización del tampón al pH deseado de la formulación líquida. Por lo tanto, se pueden emplear cualquier compuesto tampón, siempre que una o más de las constantes de ionización del compuesto estén cercanas al pH deseado de la formulación. Los ejemplos de tampones que pueden ser empleados dentro del rango de pH de 1 a 8, comprenden diversos ácidos/bases, y sus ácidos/bases conjugados respectivos o sus formas de sal, incluyendo, pero sin limitarse a: ácido hidróclórico (pH 1 a- 2), ácido maleico (pH 1 - 3), ácido fosfórico (pH 1 - 3), ácido cítrico (pH 3 - 6), ácido acético (pH 4.7 $\pm$ 1.0), fosfato de sodio dibásico (pH 6 - 8), trometamina (TRIS, pH 8.3 $\pm$ 1.0), y similares.

Los rangos a modo de ejemplo para las formulaciones líquidas de BH4 se proporcionan en las tablas 1 y 2. Las soluciones formuladas o en compuesto se rociaron, de forma opcional, con un gas inerte (por ejemplo, argón o nitrógeno) o dióxido de carbono en el tanque de generación de compuestos y los envases primarios son, de manera preferente, sellados en un manto de gas inerte o dióxido de carbono para eliminar el oxígeno del espacio superior del envase. La formulación puede ser sellada hasta cualquier volumen para multiplicar las cantidades de componente a través de un factor de escala ascendente adecuado.

Tabla 1 Ejemplos generales de rangos de composición de una formulación con un pH bajo (por ejemplo, pH 4.0)

Componentes	Cantidad (mg)	% peso/volumen	Función
BH4	0.10- 100	0.01 - 10.00	Sustancia activa
L-cisteína	0.00 - 50.00	0.00-5.00	Antioxidante
Ácido ascórbico	0.00 - 500.00	0.00 - 50.00	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	0.00 - 300.00	0.00 - 30.00	Antioxidante
Ácido cítrico	0.26-19.87	0.03-1.99	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	2.57-192.75	0.26-19.27	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 ml	1.00 ml	Diluyente

Tabla 2 Ejemplos generales de rangos de composición de una formulación con pH neutro (por ejemplo, pH 7.0)

Componentes	Cantidad (mg)	% peso/volumen	Función
BH4	0.10- 100	0.01 -10.00	Sustancia activa
L-cisteína	0.00 - 50.00	0.00-5.00	Antioxidante
Ácido ascórbico	0.00 - 500.00	0.00 - 50.00	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	0.00 - 300.00	0.00 - 30.00	Antioxidante
Fosfato monobásico de sodio, monohidrato	0.50-11.02	0.05- 1.02	Agente tampón
Fosfato dibásico de sodio	0.44-17.80	0.04-1.78	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 ml	1.00 ml	Diluyente

Los antioxidantes empleados para las formulaciones líquidas son seleccionados, preferentemente, de uno o más compuestos a base de tiol (por ejemplo L-cisteína), ácido ascórbico y a base de sulfito (por ejemplo, metabisulfito de sodio). Las soluciones son rociadas, de manera preferente, con gases inertes o dióxido de carbono para expulsar oxígeno de las soluciones de BH4 y posteriormente sellarlas de manera hermética en ampollas, o viales herméticamente sellados y botellas, utilizando tapas metálicas tipo bebida de cerveza en un manto de gases inertes (por ejemplo, argón, nitrógeno), o en un gas no inerte tal como dióxido de carbono para evitar que se escapen los gases rociados que están en los espacios superiores del envase. Las formulaciones líquidas orales contienen, adicionalmente, en forma preferente, edulcorantes y saborizantes que mejoran el sabor de las formulaciones.

En un modo de realización, como una dosificación líquida, BH4 se estabiliza mediante antioxidantes y/o mediante rociado con gases no oxidantes, preferentemente esterilizados, tales como gases inertes (por ejemplo, nitrógeno, argón, helio, etc.) y/o un gas no inerte tal como dióxido de carbono para eliminar oxígeno molecular de la formulación. El producto se llena preferentemente bajo un manto de gases inertes para minimizar o prevenir que el oxígeno molecular se redisuelva en la formulación. El líquido se contiene en un envase (por ejemplo, viales, ampollas, etc), y se sella herméticamente para evitar que el oxígeno entre en el envase. En otro modo de realización, como una forma de dosificación sólida estéril para su administración por vía parenteral, se liofiliza una solución de BH4 y se reconstituye en la clínica antes de la administración. Aún en otro modo de realización, la sustancia de fármaco de polvo estéril de BH4 se empaqueta directamente en envases estériles (por ejemplo, viales, bolsas, botellas o ampollas) en una instalación de relleno de polvos secos estéril. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es una formulación en polvo seco de tetrahidrobiopterina (BH4) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su constitución en una solución acuosa, incluyendo una mezcla de polvo seco de BH4 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un antioxidante, y un tampón de pH.

Composiciones de Formulación Líquida Oral

Las formulaciones líquidas comprenden, además de los componentes empleados en las formulaciones líquidas e intravenosas generales, agentes edulcorantes y de saborización. Los edulcorantes y saborizadores se agregan en cantidades suficientes para producir dulzura y sabor aceptables. Las formulaciones líquidas

orales contienen uno o más estabilizadores. De manera opcional, contienen conservantes antimicrobianos. Son tampones preferentemente en un pH bajo, por ejemplo pH 1 - 4 y los agentes tampón son seleccionados para coincidir con el agente de saborización, aumentando de esta forma las propiedades organolépticas de la formulación líquida oral. Los ejemplos de tampones preferentes (ácidos y bases conjugadas) son: ácido cítrico, ácido tartárico, ácido málico en combinación con sus bases conjugadas o formas de sal.

Los ejemplos de edulcorantes incluyen azúcar (por ejemplo, sacarosa, glucosa, sorbitol, manitol, fructosa, etc.), edulcorantes sin azúcar intensos (por ejemplo, aspartame, acesulfame K, ciclamato, sacarina, sacaralosa, glicirrhizina, alitame, neotame, neohesperidina DC, taumatina, monelina, y similares).

Empaquetado de Envase Primario para Formulaciones Líquidas de BH4

Los envases de empaquetado primario, para formulaciones líquidas de BH4 son, preferentemente, impermeables al oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno y gases inertes. Después de introducir las formulaciones líquidas rociadas de BH4 en el envase primario, preferentemente bajo un manto de nitrógeno, los envases son sellados, preferentemente, de forma hermética para mantener el gas de rociado en el líquido y en el espacio superior del envase, y evitar la pérdida de gas de rociado y la introducción de oxígeno en el envase.

Los envases preferentes son ampollas herméticamente selladas, así como botellas y viales sellados de forma hermética con tapas metálicas tales como las empleadas en sellar botellas de bebidas de soda y cerveza. Durante su uso, las ampollas se abren cortándolas y se utilizan dentro de unas pocas horas, por ejemplo, aproximadamente 12 horas. Las ampollas pueden ser utilizadas para productos intravenosos y estériles para inyecciones. Los productos líquidos y liofilizados inyectables estériles también pueden ser empaquetados en viales sellados con un cierre de goma, los cuales se aseguran con una tapa de aluminio ondulada. Los antioxidantes en las formulaciones protegen el líquido y los productos liofilizados de una pérdida imperceptiblemente lenta del gas de rociado o de la introducción de oxígeno en el vial para la vida en almacenamiento del producto.

Las formulaciones líquidas de BH4, contenidas en botellas o viales para uso oral, se aseguran preferentemente de manera hermética con una tapa metálica de bebida o un tapón de goma asegurado con un cierre de aluminio ondulado. Las acanaladuras de las botellas o viales pueden encontrarse ranuradas para recibir un cierre de rosca. Cuando se elimina el sello hermético, se reemplaza con un cierre de rosca con o sin un cuentagotas. La presencia de antioxidantes en la formulación, puede permitir que la formulación con cierre de rosca sea estable para utilizarse durante al menos dos semanas, por ejemplo, después de que se haya roto el sello hermético.

I. Síntesis de tetrahidrobiopterina

Se conocen una variedad de métodos en la técnica para la síntesis de tetrahidrobiopterinas, precursores, derivados y análogos. Las Patentes Estadounidenses Nos. 5,698,408; 2,601,215; 3505329; 4,540,783; 4,550,109; 4,587,340; 4,595,752; 4,649,197; 4,665,182; 4,701,455; 4,713,454; 4,937,342; 5,037,981; 5,198,547; 5,350,851; 5,401,844; 5,698,408, solicitud Canadiense CA 2420374, solicitudes Europeas nos. EP 079 574, EP 191 335 y Publicación de Patente Japonesa de Suntory JP 4-082888, JP 59-021685 y JP 9-157270, así como la Publicación de Sugimoto y Matsuura, Bull. Chem. Soc. Japón, 48(12):3767-3768 (1975), Sugimoto y Matsuura, Bull. Chem. Soc. Japón, 52(1):181-183 (1979), Matsuura et al., Chem. Lett. (Japón), 735-738 (1984), Matsuura et al., Heterocycles, Vol. 23, No. 12, 3115-3120, 1985 y Whiteley et al., Anal Biochem. 137(2):394-6 (1984) describen cada uno métodos para elaborar dihidrobiopterinas, BH4 y derivados de los mismos que se pueden utilizar como composiciones para la presente invención.

[0082] La Publicación de Internacional No. WO2005049614, Patente Estadounidense No. 4,540,783, Patente Japonesa No. 59-021685, Schircks et al., Helv. Chim. Acta, 60: 211 (1977), Sugimoto et al., Bull. Chem. Soc. Jp, 52(1):181 (1979), Sugimoto et al., Bull. Chem. Soc. Jp, 48(12):3767 (1975), Visontini et al., Helv. Chim. Acta, 52:1225 (1969), y Matsuura et al., Chem. Lett., p 735 (1984), describen métodos para sintetizar BH4.

II. Formas Cristalinas de Sal de clorhidrato de 6R-tetrahidrobiopterina

El diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina existe en diferentes formas cristalinas, incluyendo formas polimórficas y solvatos, algunas de las cuales son más estables que otras.

Formas Polimórficas de Cristalinas de sal de Diclorhidrato de (6R) L-Tetrahidrobiopterina

Forma Polimorfa B

El polimorfo cristalino que se ha observado como el más estable es denominado en la presente invención como "forma B", o de manera alternativa, como "forma polimorfa B". Los resultados obtenidos durante la investigación y desarrollo del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina revelaron que existen varios sólidos cristalinos conocidos que han sido preparados, pero ninguno ha reconocido el polimorfismo y su efecto en la estabilidad de cristales de BH4.

El polimorfo B es un anhidrato ligeramente higroscópico con la estabilidad termodinámica más alta a una temperatura superior a 20°C. Además, la forma B puede ser procesada y manejada fácilmente debido a su estabilidad térmica, posibilidad de preparación mediante condiciones dirigidas, su morfología adecuada y tamaño de partícula. El punto de fusión se encuentra cercano a 260°C ($\Delta H_f > 140$ J/g), pero no se puede detectar un punto de fusión claro debido a la descomposición previa y durante la fusión. Estas propiedades excepcionales convierten la forma polimorfa B especialmente viable para su aplicación farmacéutica, la cual se prepara a temperaturas elevadas. El polimorfo B se puede obtener como un polvo fino con un tamaño de partícula que se puede encontrar en un rango de 0.2 μm a 500 μm .

La forma B muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X, expresado en valores-d (A) en: 8.7 (vs), 6.9 (w), 5.90 (vw), 5.63 (m), 5.07 (m), 4.76 (m), 4.40 (m), 4.15 (w), 4.00 (s), 3.95 (m), 3.52 (m), 3.44 (w), 3.32 (m), 3.23 (s), 3.17 (w), 3.11 (vs), 3.06 (w), 2.99 (w), 2.96 (w), 2.94 (m), 2.87 (w), 2.84 (s), 2.82 (m), 2.69 (w), 2.59 (w), 2.44 (w). La figura 1 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma B de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

Tal como se utiliza en la presente invención, las siguientes abreviaturas en paréntesis significan: (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte; (m) = intensidad media; (w) = intensidad débil; y (vw) = intensidad muy débil. Se muestra en la figura 1, un patrón de difracción de polvo de rayos X característico.

Se ha descubierto que otros polimorfos de BH4 tienen una estabilidad química y física satisfactoria para un manejo seguro durante la fabricación y formulación, además de proporcionar una alta estabilidad en almacenamiento en su forma pura o en formulaciones. Además, se ha descubierto que la forma B, y otros polimorfos de BH4 pueden prepararse en cantidades muy grandes (por ejemplo, escala de 100 kilos) y almacenarse durante un período de tiempo prolongado.

Todas las formas cristalinas (polimorfos, hidratos, y solvatos) incluyendo la forma cristalina B, se pueden utilizar para la preparación del polimorfo B más estable. El polimorfo B puede obtenerse mediante equilibrio de fases de suspensiones de formas amorfas y otras formas diferentes a la forma polimorfa B, tal como polimorfo A, en disolventes polares y no acuosos adecuados. Por lo tanto, las preparaciones farmacéuticas descritas en la presente patente hacen referencia a una preparación de la forma polimorfa B de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

Otras formas de BH4 pueden ser convertidas a la forma B, dispersando la otra forma de BH4 en un disolvente a temperatura ambiente, agitando la suspensión a temperaturas ambiente durante un tiempo suficiente para producir la forma polimorfa B, posteriormente aislando la forma cristalina B y eliminando el disolvente de la forma aislada B. Las temperaturas ambiente, tal como aquí se utilizan, significan temperaturas dentro del rango de 0°C a 60°C, preferentemente 15°C a 40°C. La temperatura aplicada puede cambiarse durante el tratamiento y agitación disminuyendo por etapas la temperatura o en forma continua. Los disolventes adecuados para la conversión de otras formas a la forma B, incluyen, pero no se limitan a, metanol, etanol, isopropanol, otros alcoholes C3- y C4-, ácido acético, acetonitrilo, tetrahidrofurano, éter metil-t-butílico, 1,4-dioxano, acetato de etilo, acetato de isopropilo, otros acetatos C3-C6, cetona de metil etilo y otras alquil-cetonas de metilo C3-C5. El tiempo para completar el equilibrio de fases puede ser de hasta 30 horas, y preferentemente hasta 20 horas o menos de 20 horas.

El polimorfo B también puede obtenerse mediante cristalización de mezclas de disolventes que contienen hasta aproximadamente 5% de agua, especialmente a partir de mezclas de etanol, ácido acético y agua. Se ha descubierto que la forma polimorfa B de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse mediante disolución, de manera opcional a temperaturas elevadas, preferentemente de una forma de energía sólida inferior a la de la forma B o de la forma B de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, en una mezcla de disolvente que comprende etanol, ácido acético y agua, la adición de semillas a la solución, enfriamiento de la suspensión obtenida y aislamiento de los cristales formados. La disolución se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o a una temperatura de hasta 70°C, preferentemente hasta 50°C. Se puede utilizar la mezcla de disolvente final para disolución o el material de partida puede ser disuelto primero en agua y los otros disolventes posteriormente pueden ser agregados ambos o un disolvente después del otro. La composición de la mezcla de disolvente puede comprender una proporción en volumen de agua: ácido acético: tetrahidrofurano de 1:3:2 a 1: 9: 4 y preferentemente 1:5:4. La solución se agita preferentemente. El enfriamiento puede significar temperaturas por debajo de -40°C a 0°C, preferentemente por debajo de 10°C a 30°C. Las semillas adecuadas son la forma polimorfa B de otro lote o

cristales que tienen morfología similar o idéntica. Después del aislamiento, la forma cristalina B puede lavarse con un no disolvente, tal como acetona o tetrahidrofurano, y secarse de una forma habitual.

El polimorfo B también puede ser obtenido mediante cristalización de soluciones acuosas a través de la adición de no disolventes tales como metanol, etanol y ácido acético. El procedimiento de cristalización y aislamiento puede llevarse a cabo convenientemente a temperatura ambiente sin enfriar la solución. Este proceso, por consiguiente, es muy adecuado para ser llevado a cabo a escalas industriales.

En un modo de realización de los métodos de las composiciones, y usos aquí descritos, se prepara una composición que incluye la forma polimorfa B de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina mediante disolución de una forma sólida, además de la forma B, o de la forma B de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en agua a temperaturas ambientes, agregando un no disolvente en una cantidad suficiente para formar una suspensión, agitando opcionalmente la suspensión durante cierto tiempo, y posteriormente procediendo al aislamiento de los cristales formados. La composición se modifica de forma adicional en una composición farmacéutica, tal como se describe más adelante.

La concentración de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en la solución acuosa puede ser de 10 a 80 por ciento en peso, más preferentemente de 20 a 60 por ciento en peso, en referencia a la solución. Los no disolventes preferentes (por ejemplo, disolventes útiles para preparar suspensiones de BH4) son metanol, etanol y ácido acético. El no disolvente puede agregarse a la solución acuosa. Más preferentemente, la solución acuosa se agrega al no disolvente. El tiempo de agitación después de la formación de la suspensión puede ser hasta 30 horas y, preferentemente, hasta 20 horas o menos de 20 horas. El aislamiento mediante filtración y secado se lleva a cabo de una forma conocida, tal como se describió anteriormente.

La forma polimorfa B es una forma cristalina muy estable, que puede ser filtrada fácilmente, secada y molida a tamaños de partícula deseados para formulaciones farmacéuticas. Estas propiedades excepcionales convierten la forma polimorfa B en especialmente viable para su aplicación farmacéutica.

Forma polimorfa A

Se ha descubierto que otro polimorfo cristalino de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma estable preferente de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica tal como aquí se describe, la cual será denominada en la presente invención como "forma A" o "polimorfo A". El polimorfo A es ligeramente higroscópico y adsorbe agua hasta un contenido de aproximadamente 3 por ciento en peso, el cual se libera continuamente a una temperatura entre 50°C y 200°C, cuando se calienta a una tasa de 10°C/minuto. El polimorfo A es un anhidrato higroscópico, que es una forma meta-estable con respecto a la forma B; sin embargo, es estable durante varios meses en condiciones ambientales si se mantiene en un envase herméticamente sellado. La forma A es especialmente adecuada como un intermediario y material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa A puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula media deseado que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm hasta aproximadamente 500 µm.

El polimorfo A muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) de: 15.5 (vs.), 12.0 (m), 6.7 (m), 6.5 (m), 6.3 (w), 6.1 (w), 5.96 (w), 5.49 (m), 4.89 (m), 3.79 (m), 3.70 (s), 3.48 (m), 3.45 (m), 3.33 (s), 3.26 (s), 3.22 (m), 3.18 (m), 3.08 (m), 3.02 (w), 2.95 (w), 2.87 (m), 2.79 (w), 2.70 (w). La figura 2 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma A de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

El polimorfo A muestra bandas de espectro Raman características expresadas en números de onda (cm⁻¹): 2934 (w), 2880 (w), 1692 (s), 1683 (m), 1577 (w), 1462 (m), 1360 (w), 1237 (w), 1108 (w), 1005 (vw), 881 (vw), 813 (vw), 717 (m), 687 (m), 673 (m), 659 (m), 550 (w), 530 (w), 492 (m), 371 (m), 258 (w), 207 (w), 101 (s), 87 (s) cm⁻¹.

La forma polimorfa A puede obtenerse mediante secado por congelación o eliminación de agua de las soluciones de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en agua. La forma polimorfa A de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse disolviendo el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a temperaturas ambiente en agua, (1) enfriando la solución a bajas temperaturas para solidificar la solución, y eliminando el agua bajo presión reducida, o (2) eliminando agua de dicha solución acuosa.

La forma cristalina A puede aislarse mediante filtración y posteriormente secarse para evaporar el agua absorbida del producto. Las condiciones y métodos de secado son conocidas y el secado del producto aislado o eliminación de agua de acuerdo con la variante (2) descrita en la presente patente, puede llevarse a cabo aplicando temperaturas elevadas, por ejemplo hasta 80°C, preferentemente dentro del rango de 30°C a 80 °C,

bajo vacío o temperaturas elevadas y vacío. Antes del aislamiento de un precipitado obtenido en la variante (2), la suspensión puede ser agitada durante un cierto tiempo para el equilibrio de fases. La concentración de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en la solución acuosa puede ser de 5 a 40 por ciento en peso, en referencia a la solución.

- 5 Resulta preferente un enfriamiento rápido para obtener soluciones sólidas como material de partida. Se aplica una presión reducida hasta que el disolvente se elimina completamente. El secado por congelación es una tecnología bien conocida en la técnica. El tiempo para completar la eliminación de disolvente depende del vacío aplicado, que puede ser de 0.01 a 1 mbar, del disolvente utilizado y de la temperatura de congelación.

- 10 La forma polimorfa A es estable a temperatura ambiente o por debajo de la temperatura ambiente, bajo condiciones sustancialmente libres de agua, lo cual se demuestra con pruebas de equilibrio de fases de suspensiones en el tetrahidrofurano o éter ter-butil metílico agitado durante cinco días y 18 horas respectivamente, bajo nitrógeno a temperatura ambiente. La filtración y el secado con aire a temperatura ambiente produce la forma polimorfa A no cambiada.

Forma polimorfa F

- 15 Se ha observado que otro polimorfo cristalino de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como la "forma F," o "polimorfo F". El polimorfo F es ligeramente higroscópico y adsorbe agua hasta un contenido de aproximadamente 3 por ciento en peso, que se libera continuamente a una temperatura entre 50°C y 200°C, cuando se calienta a una tasa de
20 10°C/minuto. El polimorfo F es una forma meta-estable y un anhidrato higroscópico, que es más estable que la forma A a temperaturas ambientales inferiores, y menos estable que la forma B a mayores temperaturas, y la forma F es especialmente adecuada, como un intermediario y como material de partida, para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa F se puede preparar como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula media deseada que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente
25 500 µm.

- El polimorfo F muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 17.1 (vs.), 12.1 (w), 8.6 (w), 7.0 (w), 6.5 (w), 6.4 (w), 5.92 (w), 5.72 (w), 5.11 (w), 4.92 (m), 4.86 (w), 4.68 (m), 4.41 (w), 4.12 (w), 3.88 (w), 3.83 (w), 3.70 (m), 3.64 (w), 3.55 (m), 3.49 (s), 3.46 (vs), 3.39 (s), 3.33 (m), 3.31 (m), 3.27 (m), 3.21 (m), 3.19 (m), 3.09 (m), 3.02 (m), y 2.96 (m) La figura 3
30 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma F de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

- El polimorfo F puede obtenerse mediante equilibrio de fases de suspensiones de la forma polimorfa A, en disolventes polares y no acuosos adecuados, los cuales disuelven escasamente las formas de energía inferior, especialmente alcoholes tales como metanol, etanol, propanol e isopropanol. La forma polimorfa F de
35 diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina también puede prepararse dispersando partículas de la forma sólida A de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en un disolvente no acuoso que disuelve escasamente dicho diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina por debajo de la temperatura ambiente, agitando la suspensión a dichas temperaturas durante un tiempo suficiente para producir la forma polimorfa F, aislando posteriormente la forma cristalina F y eliminando el disolvente de la forma de aislada F. La
40 eliminación del disolvente y el secado se pueden llevar a cabo bajo aire, aire seco o un gas de protección en seco tal como nitrógeno o gases nobles, y a o por debajo de la temperatura ambiente, por ejemplo a una temperatura por debajo de 0°C. La temperatura durante el equilibrio de fases es preferentemente de 5 a 15°C, y más preferentemente de aproximadamente 10°C.

Forma polimorfa J

- 45 Se ha descubierto que otro polimorfo cristalino de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, que será denominada en la presente invención como la "forma J," o "polimorfo J." El polimorfo J es ligeramente higroscópico y adsorbe agua cuando se maneja a la humedad del aire. El polimorfo J es una forma meta-estable y un anhidrato higroscópico, y puede transformarse nuevamente en la forma E que se
50 describe más adelante, a partir de la cual se obtiene al exponerse a condiciones de humedad relativamente altas, tales como el 75% de humedad relativa anterior. La forma J es especialmente adecuada como un intermediario y como material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa J puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula media deseado que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma J muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico, con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 14.6 (m), 6.6 (w), 6.4 (w), 5.47 (w), 4.84 (w), 3.29 (vs), y 3.21 (vs). La figura 4 es una gráfica del patrón de difracción de polvos de rayos X característico mostrado por la forma J de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

- 5 El polimorfo J puede obtenerse mediante deshidratación de la forma E a temperaturas moderadas bajo vacío. En particular, la forma polimorfa J de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse tomando la forma E y eliminando el agua de la forma E, tratando la forma E en un secador de vacío para obtener la forma J a temperaturas moderadas, lo cual puede significar una temperatura dentro del rango de 25 a 70°C, y más preferentemente de 30 a 50°C.

10 Forma polimorfa K

Se ha descubierto que otro polimorfo cristalino de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como "forma K", o "polimorfo K." El polimorfo K es ligeramente higroscópico y adsorbe agua hasta un contenido de aproximadamente 2.0 por ciento en peso, que se libera en forma continua a una temperatura entre 50°C y 100°C, cuando se calienta a una tasa de 10°C/minuto. El polimorfo K es una forma meta-estable y un anhidrato higroscópico, que es menos estable que la forma B a mayores temperaturas, y la forma K es especialmente adecuada como un intermediario y como material de partida para producir formas polimorfas estables, en particular la forma B. La forma polimorfa K puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula media deseada que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm hasta aproximadamente 500 µm.

La forma K muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 14.0 (s), 9.4 (w), 6.6 (w), 6.4 (w), 6.3 (w), 6.1 (w), 6.0 (w), 5.66 (w), 5.33 (w), 5.13 (vw), 4.73 (m), 4.64 (m), 4.48 (w), 4.32 (vw), 4.22 (w), 4.08 (w), 3.88 (w), 3.79 (w), 3.54 (m), 3.49 (vs), 3.39 (m), 3.33 (vs), 3.13 (s), 3.10 (m), 3.05 (m), 3.01 (m), 2.99 (m), y 2.90 (m). La figura 5 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma K de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

El polimorfo K puede ser obtenido mediante cristalización a partir de mezclas de disolventes polares que contienen pequeñas cantidades de agua y en la presencia de pequeñas cantidades de ácido ascórbico. Los disolventes para mezcla de disolventes pueden seleccionarse de entre ácido acético y un alcohol tal como metanol, etanol, n- o isopropanol. En particular, la forma polimorfa K de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse disolviendo diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en una mezcla de ácido acético y un alcohol o tetrahidrofurano que contenga pequeñas cantidades de agua y una pequeña cantidad de ácido ascórbico a temperaturas elevadas, disminuyendo la temperatura por debajo de la temperatura ambiente para cristalizar el diclorhidrato, aislando el precipitado y secando el precipitado aislado a temperatura elevada, de manera opcional bajo vacío. Los alcoholes adecuados son por ejemplo metanol, etanol, propanol y isopropanol, por lo cual resulta preferente el etanol. La proporción de ácido acético a alcohol o tetrahidrofurano puede ser de 2:1 a 1:2, y preferentemente aproximadamente 1:1. La disolución de diclorhidrato (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina se puede llevar a cabo en presencia de un contenido de agua superior, y más cantidad de la mezcla de anti-disolvente puede agregarse para obtener la precipitación completa. La cantidad de agua en la composición final puede ser de 0.5 a 5 por ciento en peso, y la cantidad de ácido ascórbico puede ser de 0.01 a 0.5 por ciento en peso, ambas en referencia a la mezcla de disolventes. La temperatura de disolución puede encontrarse dentro del rango de 30 a 100, y preferentemente 35 a 70°C, y la temperatura de secado puede encontrarse dentro del rango de 30 a 50°C. El precipitado puede ser lavado con alcohol tal como etanol después del aislamiento, por ejemplo filtración. El polimorfo K puede ser convertido fácilmente en la forma más estable B mediante equilibrio de fases, por ejemplo, en isopropanol y sembrando opcionalmente con los cristales de forma B a temperatura ambiente, tal como a temperaturas de 30 a 40°C.

Formas de Hidrato de Sal de Diclorhidrato de (6R) L-Tetrahidrobiopterina

Tal como se describe adicionalmente más adelante, se ha descubierto que el diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina existe como un número de hidratos cristalinos, los cuales serán descritos y definidos en la presente invención como las formas C, D, E, H, y O. Estas formas de hidratos son útiles como una forma estable de BH4 para las preparaciones farmacéuticas descritas en la presente patente, y en la preparación de composiciones que incluyen polimorfos cristalinos estables de BH4.

Forma de Hidrato C

Se ha descubierto que una forma cristalina de hidrato de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como "forma C" o "hidrato C". La forma de hidrato C es ligeramente higroscópica y tiene un contenido de agua de aproximadamente 5.5 por ciento en peso, lo cual indica que la forma C es un monohidrato. El hidrato C tiene un punto de fusión cercano a 94°C (ΔH_f es de aproximadamente 31 J/g) y la forma de hidrato C es especialmente adecuada como un intermediario y como material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa C puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula medio deseado que normalmente se encuentra en un rango de 1 μ m hasta aproximadamente 500 μ m.

La forma C muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico, con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 18.2 (m), 15.4 (w), 13.9 (vs), 10.4 (w), 9.6 (w), 9.1 (w), 8.8 (m), 8.2 (w), 8.0 (w), 6.8 (m), 6.5 (w), 6.05 (m), 5.77 (w), 5.64 (w), 5.44 (w), 5.19 (w), 4.89 (w), 4.76 (w), 4.70 (w), 4.41 (w), 4.25 (m), 4.00 (m), 3.88 (m), 3.80 (m), 3.59 (s), 3.50 (m), 3.44 (m), 3.37 (m), 3.26 (s), 3.19 (vs), 3.17 (s), 3.11 (m), 3.06 (m), 3.02 (m), 2.97 (vs), 2.93 (m), 2.89 (m), 2.83 (m), y 2.43 (m). La figura 6 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma de hidrato C de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de hidrato C puede ser obtenida mediante equilibrio de fases a temperaturas ambientes de una forma polimorfa tal como suspensión de polimorfo B en un no disolvente, el cual contiene agua en una cantidad preferentemente aproximadamente el 5 por ciento en peso, en referencia al disolvente. La forma de hidrato C del diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede ser preparada suspendiendo diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en un no disolvente tal como heptano, alcoholes C1-C4 tales como metanol, etanol, 1- ó 2-propanol, acetatos, tales como acetato de etilo, acetonitrilo, ácido acético o éteres tales como tetrahidrofurano, dioxano, éter ter-butil metílico, o mezclas binarias o ternarias de dichos no disolventes, para los cuales se agrega suficiente agua para formar un monohidrato, y agitando la suspensión a o por debajo de temperaturas ambiente (por ejemplo, temperatura de 0 a 30°C) durante un tiempo suficiente para formar un monohidrato. Suficiente agua, puede significar de 1 a 10 y preferentemente de 3 a 8 por ciento en peso de agua, en referencia a la cantidad de disolvente. Los sólidos pueden ser filtrados y secados en aire aproximadamente a temperatura ambiente. El sólido puede absorber parte de agua y por consiguiente poseer un mayor contenido de agua que el valor teórico de 5.5 por ciento en peso. La forma de hidrato C es inestable con respecto a las formas D y B, y se convierte fácilmente a la forma polimorfa B a temperaturas de aproximadamente 40°C en aire y humedad relativa inferior. La forma C puede ser transformada en el hidrato D más estable mediante equilibrio de suspensión a temperatura ambiente.

Forma de Hidrato D

Se ha descubierto que otra forma cristalina de hidrato de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como "forma D" o "hidrato D". La forma de hidrato D es ligeramente higroscópica y puede tener un contenido de agua de aproximadamente 5.0 a 7.0 por ciento en peso, lo cual sugiere que la forma D es un monohidrato. El hidrato D tiene un punto de fusión cercano a 153°C (ΔH_f es de aproximadamente 111 J/g), y tiene mucho mayor estabilidad que la forma C e incluso es estable cuando se expone a la humedad del aire a temperatura ambiente. La forma de hidrato D puede por consiguiente utilizarse para preparar formulaciones o como un intermediario y material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa D puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula media deseada que normalmente se encuentra en un rango de 1 μ m a aproximadamente 500 μ m.

La forma D muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 8.6 (s), 6.8 (w), 5.56 (m), 4.99 (m), 4.67 (s), 4.32 (m), 3.93 (vs), 3.88 (w), 3.64 (w), 3.41 (w), 3.25 (w), 3.17 (m), 3.05 (s), 2.94 (w), 2.92 (w), 2.88 (m), 2.85 (w), 2.80 (w), 2.79 (m), 2.68 (w), 2.65 (w), 2.52 (vw), 2.35 (w), 2.34 (w), 2.30 (w), y 2.29 (w). La figura 7 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma D de hidrato de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de hidrato D puede ser obtenida agregando aproximadamente a temperatura ambiente, soluciones acuosas concentradas de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a un exceso de un no disolvente tal como hexano, heptano, diclorometano, 1- o 2-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, ácido acético o éteres tales como tetrahidrofurano, dioxano, éter ter-butil metílico, o mezclas de dichos no disolventes, y agitando la suspensión a temperaturas ambiente. El sólido cristalino puede ser filtrado y posteriormente secado bajo nitrógeno seco a temperaturas ambiente. Un no disolvente preferente es isopropanol. La adición de la solución acuosa puede llevarse a cabo en forma de gotas para evitar la precipitación repentina. La forma de hidrato D de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, se puede preparar agregando a temperatura ambiente una solución acuosa concentrada de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina hasta un

exceso de un no disolvente y agitando la suspensión a temperaturas ambiente. El exceso de no disolvente puede significar una proporción del disolvente acuoso al no disolvente de 1:10 a 1:1000. La forma D contiene un pequeño exceso de agua, relacionado con el monohidrato, y se considera que es agua absorbida debido a la naturaleza ligeramente higroscópica de este hidrato cristalino. La forma de hidrato D se considera como la más estable de los hidratos conocidos a temperaturas ambientes, y una humedad relativa menor a 70%. La forma de hidrato D se puede utilizar para formulaciones preparadas bajo condiciones en donde este hidrato es estable. La temperatura ambiente puede encontrarse en un rango de 20 a 30°C.

Forma de Hidrato E

Se ha encontrado que otra forma cristalina de hidrato de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como "forma E" o "hidrato E". La forma de hidrato E tiene un contenido de agua de aproximadamente 10 a 14 por ciento en peso, lo cual sugiere que la forma E es un dihidrato. El hidrato E se forma a temperaturas debajo de temperatura ambiente. La forma de hidrato E es especialmente adecuada como un intermediario y material de partida para producir formas polimorfas estables. Es especialmente adecuado producir la forma J libre de agua al secarse bajo nitrógeno u opcionalmente bajo vacío. La forma E es no higroscópica y estable bajo humedades más bien relativamente altas, es decir, en humedades relativas por encima de aproximadamente 60% y hasta aproximadamente 85%. La forma polimorfa E se puede preparar como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula medio deseado que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma E muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 15.4 (s), 6.6 (w), 6.5 (w), 5.95 (vw), 5.61 (vw), 5.48 (w), 5.24 (w), 4.87 (w), 4.50 (vw), 4.27 (w), 3.94 (w), 3.78 (w), 3.69 (m), 3.60 (w), 3.33 (s), 3.26 (vs), 3.16 (w), 3.08 (m), 2.98 (w), 2.95 (m), 2.91 (w), 2.87 (m), 2.79 (w), 2.74 (w), 2.69 (w), y 2.62 (w). La figura 8 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado mediante la forma de hidrato E de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de hidrato E puede obtenerse agregando soluciones acuosas concentradas de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a un exceso de no disolvente enfriado a temperaturas de aproximadamente 10 a -10°C, y preferentemente entre 0 a 10°C, y agitando la suspensión a dichas temperaturas. El sólido cristalino puede ser filtrado y posteriormente secado bajo nitrógeno seco a temperaturas ambiente. No disolventes son por ejemplo sustancias tales como hexano, heptano, diclorometano, 1- ó 2-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, ácido acético o éteres tales como tetrahydrofurano, dioxano, éter ter-butil metílico o mezclas de dichos no disolventes. Un no disolvente preferente es isopropanol. La adición de la solución acuosa puede llevarse a cabo en forma de gotas para evitar una precipitación repentina. La forma de hidrato E de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse agregando soluciones acuosas concentradas de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a un exceso de un no disolvente, el cual se enfría a temperaturas de aproximadamente 10 a -10°C, y agitando la suspensión a temperaturas ambiente. El exceso de no disolvente puede significar una proporción del disolvente acuoso al no disolvente de 1:10 a 1:1000. Un no disolvente preferente es tetrahydrofurano. Otro proceso de preparación comprende exponer la forma polimorfa B a atmósfera de aire con una humedad relativa del 70 al 90%, preferentemente aproximadamente 80%. La forma de hidrato E se considera un dihidrato, por lo cual puede absorber cierta agua adicional. La forma polimorfa E puede ser transformada en el polimorfo J al secarse bajo vacío a temperaturas moderadas, lo cual puede significar entre 20°C y 50°C a presiones de entre 0 y 100 mbar. La forma E es especialmente adecuada para formulaciones en forma semi-sólidas debido a su estabilidad en humedades relativamente altas.

Forma de Hidrato H

Se ha descubierto que otra forma cristalina de hidrato de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como la "forma H" o "hidrato H". La forma de hidrato H tiene un contenido de agua de aproximadamente 5.0 a 7.0 por ciento en peso, lo cual sugiere que la forma H es un monohidrato higroscópico. La forma de hidrato H se forma a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente. La forma de hidrato H es especialmente adecuada como un intermediario y material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa H puede prepararse como un polvo sólido, con un rango de tamaño de partícula medio deseado que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma H muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 8.6 15.8 (vs), 10.3 (w), 8.0 (w), 6.6 (w), 6.07 (w), 4.81 (w), 4.30 (w), 3.87 (m), 3.60 (m), 3.27 (m), 3.21 (m), 3.13 (w), 3.05 (w), 2.96 (m), 2.89 (m), 2.82 (w), y 2.67 (m). La figura 9 es una

gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma de hidrato H de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de hidrato H puede ser obtenida disolviendo en temperaturas ambientes diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en una mezcla de ácido acético y agua, agregando posteriormente un no disolvente para precipitar un sólido cristalino, enfriando la suspensión obtenida y agitando la suspensión enfriada durante cierto tiempo. El sólido cristalino se filtra y posteriormente se seca bajo vacío a temperaturas ambientes. Los no disolventes son por ejemplo sustancias tales como hexano, heptano, diclorometano, 1- o 2-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, ácido acético o éteres tales como tetrahidrofurano, dioxano, éter ter-butil metílico o mezcla de dichos no disolventes. Un no disolvente preferente es tetrahidrofurano. La forma de hidrato H de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse disolviendo a temperaturas diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en una mezcla de ácido acético y una cantidad menor de agua a la del ácido acético, agregando un no disolvente y enfriando la suspensión obtenida a temperaturas dentro del rango de -10 a 10°C, y preferentemente -5 a 5°C, y agitando la suspensión a dicha temperatura durante un cierto tiempo. Cierta tiempo puede significar 1 a 20 horas. La proporción en peso de ácido acético a agua puede ser de 2:1 a 25:1, y preferentemente 5:1 a 15:1. La proporción en peso de ácido acético/agua al no disolvente puede ser de 1:2 a 1:5. La forma de hidrato H parece ser monohidrato con un exceso ligero de agua absorbida debido a su naturaleza higroscópica.

Forma de Hidrato O

Se ha descubierto que otra forma cristalina de hidrato de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como la "forma O" o "hidrato O". La forma de hidrato O se forma a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente. La forma de hidrato O es especialmente adecuada como un intermediario y material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa O puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula medio deseado que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma O muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 15.9 (w), 14.0 (w), 12.0 (w), 8.8 (m), 7.0 (w), 6.5 (w), 6.3 (m), 6.00 (w), 5.75 (w), 5.65 (m), 5.06 (m), 4.98 (m), 4.92 (m), 4.84 (w), 4.77 (w), 4.42 (w), 4.33 (w), 4.00 (m), 3.88 (m), 3.78 (w), 3.69 (s), 3.64 (s), 3.52 (vs), 3.49 (s), 3.46 (s), 3.42 (s), 3.32 (m), 3.27 (m), 3.23 (s), 3.18 (s), 3.15 (vs), 3.12 (m), 3.04 (vs), 2.95 (m), 2.81 (s), 2.72 (m), 2.67 (m), y 2.61 (m). La figura 10 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma de hidrato O de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de hidrato O puede prepararse mediante la exposición de la forma F polimorfa a una atmósfera de nitrógeno que contiene vapor de agua con una humedad relativa resultante de aproximadamente 52% durante aproximadamente 24 horas. El hecho de que la forma F, la cual es un anhidrato ligeramente higroscópico, puede utilizarse para preparar la forma O bajo una humedad relativa de 52%, sugiere que la forma O es un hidrato, el cual es más estable que la forma F bajo temperatura ambiente y condiciones de humedad.

Formas de Solvato de Sal de Diclorhidrato de (6R) L-Tetrahidrobiopterina

Tal como se describe más adelante en más detalle, se ha descubierto que diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina existe como un número de formas de solvato cristalinas que deben ser descritas y definidas en la presente invención como las formas G, I, L, M, y N. Estas formas de solvato son útiles como una forma estable de BH4 para las preparaciones farmacéuticas descritas en la presente patente y en la preparación de composiciones que incluyen polimorfos de cristales estables de BH4.

Forma de Solvato G

Se ha descubierto que una forma cristalina de solvato de etanol de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como "forma G", o "hidrato G". La forma de solvato de etanol G tiene un contenido de etanol de aproximadamente 8.0 a 12.5 por ciento en peso, lo cual sugiere que la forma G es un solvato de monoetanol higroscópico. La forma de solvato G se forma a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente. La forma G es especialmente adecuada como un intermediario y material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa G puede ser preparada como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula media deseado el cual se encuentra en un rango normalmente de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma G muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 14.5 (vs), 10.9 (w), 9.8 (w), 7.0 (w), 6.3 (w), 5.74 (w), 5.24 (vw), 5.04 (vw), 4.79 (w), 4.41 (w), 4.02 (w), 3.86 (w), 3.77 (w), 3.69 (w), 3.63 (m), 3.57 (m), 3.49 (m), 3.41 (m), 3.26 (m), 3.17 (m), 3.07 (m), 2.97 (m), 2.95 (m), 2.87 (w), y 2.61 (w). La figura 11 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma de solvato G de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de solvato de etanol G puede obtenerse mediante cristalización de diclorhidrato de L-eritro-tetrahidrobiopterina disolviendo agua y agregando un gran exceso de etanol, agitando la suspensión obtenida a o por debajo de temperaturas ambiente y secando el sólido aislado bajo aire o nitrógeno aproximadamente a temperatura ambiente. Aquí, un gran exceso de etanol significa una mezcla resultante de etanol y agua con menos del 10% agua, preferentemente aproximadamente 3 a 6%. La forma de etanolato G de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede prepararse disolviendo a temperatura ambiente hasta temperaturas de 75°C, diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina en agua o en una mezcla de agua y etanol, enfriando una solución calentada a temperatura ambiente y por debajo de 5 a 10°C, agregando opcionalmente 20 a 5°C para filtrar el sólido cristalino, color blanco y secar el sólido bajo aire o un gas de protección tal como etanol a temperaturas de aproximadamente temperatura ambiente. El proceso puede llevarse a cabo en una primera variante disolviendo diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina a temperatura ambiente en una cantidad inferior de agua y posteriormente agregando un exceso de etanol, y posteriormente agitando la suspensión obtenida durante un tiempo suficiente para el equilibrio de fases. En una segunda variante, diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina puede suspenderse en etanol, agregando opcionalmente una cantidad de agua inferior, y calentando la suspensión y disolviendo diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, enfriando la solución a temperaturas de aproximadamente 5 a 15°C, agregando etanol adicional a la suspensión, y posteriormente agitando la suspensión obtenida durante un tiempo suficiente para el equilibrio de fases.

Forma de Solvato I

Se ha descubierto que una forma cristalina de solvato de ácido acético de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como la "forma I" o "hidrato I". La forma de solvato de ácido acético I tiene un contenido de ácido acético de aproximadamente 12.7 por ciento en peso, lo cual sugiere que la forma I es un mono solvato de ácido acético higroscópico. La forma de solvato I se forma a temperaturas debajo de temperatura ambiente. La forma de solvato de ácido acético I es especialmente adecuada como un intermediario y material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa I puede ser preparada como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula media deseado el cual normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma I muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 14.5 (m), 14.0 (w), 11.0 (w), 7.0 (vw), 6.9 (vw), 6.2 (vw), 5.30 (w), 4.79 (w), 4.44 (w), 4.29 (w), 4.20 (vw), 4.02 (w), 3.84 (w), 3.80 (w), 3.67 (vs), 3.61 (m), 3.56 (w), 3.44 (m), 3.27 (w), 3.19 (w), 3.11(s), 3.00 (m), 2.94 (w), 2.87 (w), y 2.80 (w). La figura 12 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma de solvato I de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de solvato de ácido acético I puede obtenerse mediante disolución del diclorhidrato de L-eritro-tetrahidrobiopterina en una mezcla de ácido acético y agua a temperatura elevada, agregando ácido acético adicional a la solución, enfriando a una temperatura de aproximadamente 10°C, calentando posteriormente la suspensión formada aproximadamente a una temperatura de 15°C, y posteriormente agitando la suspensión obtenida durante un tiempo suficiente para el equilibrio de fases, el cual puede durar hasta al menos 3 días. El sólido cristalino posteriormente se filtra y seca bajo aire o un gas de protección, tal como nitrógeno en temperaturas cercanas a la temperatura ambiente.

Forma de Solvato L

Se ha descubierto que una forma de solvato de etanol/cristal de hidrato mezclada de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como la "forma L" o "hidrato L". La forma L puede contener 4% aunque hasta 13% etanol y de 0% a aproximadamente 6% de agua. La forma L puede ser transformada en la forma G cuando se trata en etanol a temperaturas de aproximadamente 0°C a 20°C. Además la forma L puede ser transformada en la forma B cuando se trata en un disolvente orgánico a temperaturas ambientes (10°C a 60°C). La forma polimorfa L puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula medio deseado que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma L muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 14.1 (vs), 10.4 (w), 9.5 (w), 9.0 (vw), 6.9 (w), 6.5 (w), 6.1 (w), 5.75 (w), 5.61

(w), 5.08 (w), 4.71 (w), 3.86 (w), 3.78 (w), 3.46 (m), 3.36 (m), 3.06 (w), 2.90 (w), y 2.82 (w). La figura 13 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado a través de la forma de solvato L de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma L puede obtenerse suspendiendo la forma de hidrato E a temperatura ambiente en etanol y agitando la suspensión a temperaturas de 0 a 10°C, preferentemente aproximadamente 5°C, durante un tiempo suficiente para el equilibrio de fases, el cual puede ser de 10 a 20 horas. El sólido obtenido posteriormente se filtra y se seca preferentemente bajo presión reducida a una temperatura de 30°C o bajo nitrógeno. El análisis mediante TG-FTIR sugiere que la forma L puede contener cantidades variables de etanol y agua, es decir, puede existir como un polimorfo (anhidrato), como un solvato/hidrato de etanol mezclado o incluso como un hidrato.

Forma de Solvato M

Se ha descubierto que una forma cristalina de solvato de etanol de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como "forma M" o "hidrato M". La forma M puede contener 4% hasta 13% de etanol, y 0% hasta aproximadamente 6% de agua, lo cual sugiere que la forma M es un solvato de etanol ligeramente higroscópico. La forma de solvato M se forma a temperatura ambiente. La forma M es especialmente adecuada como un intermediario y como material de partida para producir formas polimorfas estables, ya que la forma M puede ser transformada en forma G cuando se trata en etanol a temperaturas entre aproximadamente -10° a 15°C, y en la forma B cuando se trata en disolventes orgánicos tales como etanol, alcoholes C3 y C4, o éteres cíclicos tales como THF y dioxano. La forma polimorfa M puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula medio deseado que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma M muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 18.9 (s), 6.4 (m), 6.06 (w), 5.66 (w), 5.28 (w), 4.50 (w), 4.23 (w), y 3.22 (vs). La figura 14 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma de solvato M de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de solvato de etanol M puede obtenerse mediante la disolución del diclorhidrato de L-eritro-tetrahidrobiopterina en etanol y evaporación de la solución bajo nitrógeno a temperatura, es decir, entre 10°C y 40°C. La forma M también puede obtenerse secando la forma G bajo un flujo ligero de nitrógeno seco en un rango de aproximadamente 20 a 100 ml/min. Dependiendo del grado de secado bajo nitrógeno, la cantidad restante de etanol puede ser variable, es decir de aproximadamente 3% a 13%.

Forma de Solvato N

Se ha descubierto que otra forma cristalina de solvato de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina es una forma preferente estable de BH4 para utilizarse en una preparación farmacéutica descrita en la presente patente, la cual será denominada en la presente invención como la "forma N", o "hidrato N". La forma N puede contener en total hasta 10% de isopropanol y agua, lo cual sugiere que la forma N es un solvato de isopropanol ligeramente higroscópico. La forma N puede obtenerse a través de lavado de la forma D con isopropanol, y el posterior secado en vacío a, aproximadamente, una temperatura de 30°C. La forma N es especialmente adecuada como intermediario y como material de partida para producir formas polimorfas estables. La forma polimorfa N puede prepararse como un polvo sólido con un rango de tamaño de partícula media deseada que normalmente se encuentra en un rango de 1 µm a aproximadamente 500 µm.

La forma N muestra un patrón de difracción de polvos de rayos X característico con picos característicos expresados en valores-d (Å) en: 19.5 (m), 9.9 (w), 6.7 (w), 5.15 (w), 4.83(w), 3.91 (w), 3.56 (m), 3.33 (vs), 3.15 (w), 2.89 (w), 2.81 (w), 2.56 (w), y 2.36 (w). La figura 15 es una gráfica del patrón de difracción de rayos X característico mostrado por la forma de solvato N de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina.

La forma de isopropanol N puede obtenerse mediante la disolución de diclorhidrato de L-eritro-tetrahidrobiopterina en 4.0 ml de la mezcla de isopropanol y agua (mezclando la proporción de volumen por ejemplo 4:1). A esta solución se le agrega lentamente isopropanol (IPA, por ejemplo aproximadamente 4.0 ml) y la suspensión resultante se enfría a una temperatura de 0°C, y se agita durante varias horas (por ejemplo, aproximadamente 10 a 18 horas) a esta temperatura. La suspensión se filtra y el residuo sólido se lava con isopropanol a temperatura ambiente. El material cristalino obtenido se seca posteriormente a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20 a 30°C) y presión reducida (aproximadamente 2 a 10 mbar) durante varias horas (por ejemplo, aproximadamente 5 a 20 horas). TG-FTIR muestra una pérdida de peso de un 9.0% entre 25 a 200°C, lo cual se atribuye tanto al isopropanol como al agua. Este resultado sugiere que la

forma N existe ya sea en forma de un solvato de isopropanol, o en forma de un solvato/hidrato de isopropanol mezclado, o como una forma no solvatada que contiene una pequeña cantidad de agua.

Para la preparación de las formas polimorfas, pueden utilizarse técnicas de cristalización conocidas en la técnica, tal como la agitación de una suspensión (equilibrio en fase) precipitación, recristalización, evaporación, disolvente como métodos de absorción de agua o descomposición de solvatos. Las soluciones diluidas o saturadas o super-saturadas pueden ser utilizadas para cristalización, con o sin sembrado con agentes de nucleación adecuados. Las temperaturas de hasta 100°C pueden ser aplicadas para formar soluciones. Puede aplicarse enfriamiento para iniciar la cristalización y precipitación a una temperatura por debajo de -100°C, y preferentemente por debajo de -30°C. Se pueden utilizar polimorfos meta-estables o formas pseudo-polimorfas para preparar soluciones o suspensiones para la preparación de formas más estables y para lograr mayores concentraciones en las soluciones.

Se ha descubierto de manera sorprendente que la forma de hidrato D es la forma más estable bajo los hidratos y formas B y D, son especialmente adecuadas para ser utilizadas en formulaciones farmacéuticas. Las formas B y D presentan algunas ventajas, como una fabricación focalizada, buen manejo debido al tamaño y morfología conveniente del cristal, muy buena estabilidad bajo condiciones de producción de diversos tipos de formulación, estabilidad en almacenamiento, mayor solubilidad, y alta biodisponibilidad. Por consiguiente, un modo de realización de las composiciones y métodos aquí descritos es una composición farmacéutica que incluye la forma polimorfa B y/o forma de hidrato D de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina, y una sustancia portadora o diluyente farmacéuticamente aceptable.

III. Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones descritas en la presente patente se administran, preferentemente, como formulaciones orales. Las formulaciones orales son preferentemente formulaciones sólidas tales como cápsulas, comprimidos, píldoras y grageas, o formulaciones líquidas tales como suspensiones acuosas, elixires y jarabes. Las diversas formas de BH4 descritas en la presente patente pueden ser utilizadas directamente como polvo (partículas micronizadas), gránulos, suspensiones o soluciones, o pueden combinarse junto con otros ingredientes farmacéuticamente aceptables en adiciones de los componentes y dividirlos, de manera opcional, finamente, y posteriormente rellenando las cápsulas, compuestas por ejemplo de gelatina dura o suave, comprimidos de compresión, comprimidos, píldoras o grageas de compresión, o suspenderlas o disolverlas en sustancias portadoras para suspensiones, elixires y jarabes. Los recubrimientos pueden ser aplicados después de compresión para formar píldoras.

Los ingredientes farmacéuticamente aceptables son conocidos por los diversos tipos de formulaciones y pueden ser, por ejemplo, agentes aglutinantes tales como polímeros naturales o sintéticos, excipientes, lubricantes, tensoactivos, agentes de edulcoración o saborizantes, materiales de recubrimiento, conservantes, tintas, espesantes, adyuvantes, agentes anti-microbianos, antioxidantes y sustancias portadoras para los diversos tipos de formulación. La frase "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" hace referencia a entidades moleculares y composiciones que son aprobadas por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (U.S. Food and Drug Administration), o una agencia reguladora extranjera correspondiente para la administración a humanos. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "sustancia portadora farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todos los solvatos, medios de dispersión, recubrimientos, agentes anti-bacterianos, y anti-fúngicos, agentes de retraso de la absorción e isotónicos y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto cuando algún medio o agente convencional sea incompatible con la composición terapéutica, su uso en composiciones terapéuticas está contemplado. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

La cantidad inicial de (6R)-L-eritro-tetrahidrobiopterina utilizada para preparar la formulación puede ser, por ejemplo, dentro del rango de aproximadamente 30% en peso hasta aproximadamente 40% en peso de la formulación, o dentro del rango de aproximadamente 32% en peso hasta aproximadamente 35% en peso, o a aproximadamente 33% en peso. Las cantidades específicas de BH4 en la formulación contempladas en la presente invención incluyen 80 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, y 500 mg.

Los agentes aglutinantes ayudan a mantener una formulación sólida. En algunos casos, se utilizan agentes aglutinantes anhidro para conservar el estado anhidro de las formas polimórficas. En algunos casos, el agente aglutinante puede actuar como un agente de secado. Los agentes aglutinantes a modo de ejemplo incluyen fosfato de calcio dibásico anhidro y su monohidrato. Otros ejemplos no limitativos de agentes aglutinantes, útiles en la composición descrita en la presente patente, incluyen goma de tragacanto, acacia, almidón, gelatina, y polímeros degradables biológicos tales como homo- o co-poliésteres de ácidos dicarboxílicos, alquilenglicoles, polialquilenglicoles, y/o ácidos carboxílicos de hidroxilo alifático; ácidos carboxílicos; homo- o co-poliámidas de ácido dicarboxílico, diaminas de alquileno, y/o ácidos carboxílicos de amino alifático; copolímeros-poliámidas-poliéster correspondientes, polianhidros, poliorioésteres, polifosfaceno y

policarbonatos. Los polímeros degradables biológicos pueden ser lineales, ramificados o reticulados. Los ejemplos específicos son ácido poli-glicólico, ácido poli-láctico y poli-d,l-lactide/glucólido. Otros ejemplos de polímeros son polímeros solubles en agua tales como polioxaalquilenos (polioxaetileno, polioxapropileno y polímeros mezclados de los mismos, poli-acrilamidas y poli-acrilamidas hidroxialquiladas, ácido poli-maleico y ésteres o amidas de los mismos, ácido poli-acrílico y ésteres o amidas de los mismos, poli-vinilalcohol y ésteres o éteres de los mismos, poli-vinilimidazole, poli-vinilpirrolidona, y polímeros naturales tipo quitosano.

Los agentes de desintegración ayudan a la rápida desintegración de formulaciones sólidas absorbiendo agua y expandiéndola. Los agentes de desintegración a modo de ejemplo incluyen polivinilpirrolidona (PVP, por ejemplo, vendida bajo el nombre de POVIDONE), una forma reticulada de povidona (CPVP, por ejemplo, vendida bajo el nombre de CROSPVIDONE), una forma entrecruzada de carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC, por ejemplo, vendida bajo el nombre de AC-DI-SOL), otras celulosas modificadas, y almidón modificado. Los comprimidos formulados con CPVP mostraron una desintegración mucho más rápida que los comprimidos formulados con PVP.

Los antioxidantes pueden ser incluidos y ayudan a estabilizar el producto de tetrahidrobiopterina, especialmente después de la disolución. Las soluciones acuosas de pH bajo de API son más estables que las soluciones en un pH neutro o alto. Los antioxidantes se incluyen en una formulación descrita en la presente invención para evitar el deterioro por oxidación. Los antioxidantes generalmente pueden ser clasificados en 3 grupos.

El primer grupo es conocido como antioxidantes reales, e inhibe la oxidación mediante la reacción con radicales libres que bloquean la reacción en cadena. Los ejemplos incluyen antioxidantes fenólicos que incluyen hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ), 4-hidroximetil-2,6-di-tert-butilfenol (HMBP), y 2,4,5-trihidroxibutirofenona (THBP); alquilgalatos, incluyendo galato de propilo; ácido gálico; ácido nordihidroguaiarético; y tocoferoles; incluyendo alfa-tocoferol.

El segundo grupo, que consisten en agentes de reducción, tienen potenciales redox inferiores a los del fármaco los cuales están pensados para proteger, y por consiguiente se oxidan más fácilmente. Los agentes de reducción también actúan mediante reacción con radicales libres. Los ejemplos incluyen ácido ascórbico, ácido tioglucólico (TGA), palmitato de ascorbilo, sulfitos, incluyendo sales de potasio y sodio de ácido sulfuroso (por ejemplo sulfito de potasio, sulfito de sodio, metabisulfito de sodio y bisulfito de sodio), y tioglicerol.

El tercer grupo consiste en sinergistas antioxidantes que normalmente tienen un efecto antioxidante modesto por sí mismos, pero probablemente aumentan la acción de los antioxidantes en el primer o segundo grupo, haciéndolo reaccionar con iones de metales pesados que catalizan la oxidación. Los ejemplos de dichos sinergistas antioxidantes y agentes de quelación incluyen ácido cítrico, ácido málico, ácido edético y sus sales, lecitina y ácido tartárico.

Los antioxidantes ácidos a modo de ejemplo incluyen ácido ascórbico, ésteres de ácido graso de ácido ascórbico tal como palmitato de ascorbilo y estearato de ascorbilo, y sales de ácido ascórbico tales como ascorbato de sodio, calcio o potasio. Los antioxidantes no ácidos también se pueden utilizar en las formulaciones estables de comprimidos. Los ejemplos no limitativos de antioxidantes no ácidos incluyen beta-caroteno, alfa-tocoferol. Los aditivos ácidos pueden ser agregados para aumentar la estabilidad de la formulación de comprimidos, incluyendo ácido cítrico y ácido málico. Los anti-oxidantes de molécula pequeña incluyen pero no se limitan a tioles, por ejemplo cisteína, N-acetil cisteína, glutatona, etc., o polímeros tiolados (polímero-SH), por ejemplo policarbofil-cisteína, polimetacrílico-SH, carboxi metilcelulosa-cisteína, etc. o antioxidantes de molécula pequeña tales como ácido ascórbico, metionina, palmitato de ascorbilo, etc. Estos antioxidantes confieren estabilidad en la forma de dosificación durante el tránsito a través del GIT, en particular a medida que aumenta el pH del GIT con la distancia del estómago.

En un modo de realización, resulta preferente una combinación de al menos dos antioxidantes de agente de reducción. En otro modo de realización, resulta preferente una combinación de al menos dos antioxidantes de agente de reducción junto con un sinergista antioxidante ácido y/o agente de quelación.

Los lubricantes mejoran la estabilidad, dureza y uniformidad de las formulaciones sólidas. Los lubricantes a modo de ejemplo incluyen fumarato de estearilo y estearato de magnesio. Otros ejemplos no limitativos de lubricantes incluyen aceites, grasas, ceras, o sales de ácido graso naturales o sintéticos, tales como estearato de magnesio.

De manera opcional, las formulaciones estables de la presente invención también pueden comprender otros excipientes tales como manitol, hidroxipropil celulosa, celulosa microcristalina, u otros azúcares de no reducción tales como sacarosa, trehalosa, melezitosa, planteosa y rafinosa. Los azúcares de reducción

pueden reaccionar con BH4. Otros ejemplos no limitativos de excipientes útiles en una composición descrita en la presente patente, incluyen fosfatos tales como el fosfato de dicalcio.

Los tensoactivos, para su uso en una composición descrita en la presente patente, pueden ser aniónicos, anfotéricos o neutros. Los ejemplos no limitativos de tensoactivos útiles en una composición descrita en la presente patente, incluyen lecitina, fosfolípidos, sulfato de octilo, sulfato de decilo, sulfato de dodecilo, sulfato de tetradecilo, sulfato de hexadecilo y sulfato de octadecilo, oleato Na o caprato Na, ácidos 1-acilaminoetano-2-sulfónico, tal como ácido 1-octanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-decanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-dodecanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-tetradecanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-hexadecanoilaminoetano-2-sulfónico, y ácido 1-octadecanoilaminoetano-2-sulfónico, y ácido taurocólico y ácido taurodesoxicólico, ácidos biliares y sus sales tales como ácido cólico, ácido desoxicólico y glucocolatos de sodio, caprato de sodio o laurato de sodio, oleato de sodio, sulfato laurilo de sodio, sulfato cetilo de sodio, aceite de ricino sulfatado y dioctilsulfosuccinato de sodio, cocamidopropilbetaína y laurilbetaína, alcoholes grasos, colesterol, mono o diestearato de glicerol mono o dioleato de glicerol y mono o dipalmitato de glicerol, y estearato de polioxietileno.

Los ejemplos no limitativos de agentes edulcorantes útiles en una composición descrita en la presente patente, incluyen sacarosa, fructosa, lactosa o aspartame. Los ejemplos no limitativos de agentes saborizantes para su uso en una composición descrita en la presente patente, incluyen hierbabuena, aceite de wintergreen o sabores de frutas tales como sabor de cereza o naranja. Los ejemplos no limitativos de materiales de recubrimiento para utilizarse en una composición descrita en la presente patente incluyen gelatina, cera, laca, azúcar u otros polímeros degradables biológicos. Los ejemplos no limitativos de conservantes para utilizarse en una composición descrita en la presente patente, incluyen metilo o propilparabenos, ácido sórbico, clorobutanol, fenol y timerosal.

La forma BH4 también puede ser formulada como un comprimido o polvo efervescente, la cual se desintegra en un ambiente acuoso para proporcionar una solución para beber. También se pueden preparar formulaciones de liberación lenta, con el objeto de lograr una liberación controlada del agente activo en contacto con los fluidos corporales en el tracto gastrointestinal, y proporcionar un nivel constante y efectivo sustancial del agente activo en el plasma sanguíneo. La forma cristalina puede incrustarse para este propósito en una matriz polimérica de un polímero degradable biológico, un polímero soluble en agua o una mezcla de ambos, y opcionalmente tensoactivos adecuados. La incrustación puede significar dentro de este contexto, la incorporación de micropartículas en una matriz polimérica. Las formulaciones de liberación controlada también se obtienen a través de la encapsulación de micropartículas dispersas o microgotas emulsificadas a través de tecnologías de recubrimiento mediante dispersión o emulsión conocidas.

El BH4 utilizado en una composición descrita en la presente patente se formula preferentemente como una sal de diclorhidrato, sin embargo, se contempla que otras formas de sal de BH4 poseen la actividad biológica deseada, y en consecuencia, se pueden utilizar otras formas de sal de BH4. De manera específica, las sales de BH4 con ácidos inorgánicos u orgánicos son preferentes. Los ejemplos no limitativos de formas de sal BH4 alternativas incluyen sales de BH4 de ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido fumárico y ácido mandélico.

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables pueden formarse con metales o aminas, tal como metales alcalino térreos y alcalinos o aminas orgánicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos también pueden prepararse con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos para los expertos en la técnica e incluyen alcalinos, alcalino térreos, amonio y cationes de amonio cuaternario. Los carbonatos o carbonatos de hidrógeno también son posibles. Los ejemplos de metales utilizados como cationes son sodio, potasio, magnesio, amonio, calcio o férricos y similares. Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen isopropilamina, trimetilamina, histidina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dicitlohexilamina, etilendiamina, N metilglucamina y procaína.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptable incluyen sales de ácido inorgánicas u orgánicas. Los ejemplos de sales de ácido adecuadas incluyen clorhidratos, acetatos, citratos, salicilatos, nitratos o fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas son conocidas para los expertos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácidos mandélicos, ácido hidroclórico, ácido hidrobrómico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos carboxílicos, sulfónicos, sulfo o fosfo orgánicos o ácidos sulfámicos N substituidos, por ejemplo ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; y con aminoácidos tales como 20 alfa aminoácidos implicados en la síntesis de proteínas en la naturaleza, por ejemplo ácido glutámico o ácido aspártico, y también con ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, 2 hidroxietanosulfónico, ácido 1,2-disulfónico, ácido

bencenosulfónico, ácido 4 metilbencenosulfónico, ácido naftalen 2 sulfónico, ácido 1,5 disulfónico, 2 o 3 fosfoglicerato, fosfato de glucosa 6, ácido N-ciclohexilsulfámico (con la formación de ciclamatos) o con otros compuestos orgánicos de ácido, tales como ácido ascórbico.

Las formulaciones orales estables, a modo de ejemplo, contienen uno o más de los siguientes ingredientes adicionales que mejoran la estabilidad u otras características de la formulación: agente aglutinante, agente de desintegración, antioxidante ácido o lubricante o combinaciones de los mismos. Las formulaciones de comprimidos estables a modo de ejemplo, incluyen un agente aglutinante y un agente de desintegración, opcionalmente con un antioxidante ácido y opcionalmente incluyendo además un lubricante. Las concentraciones a modo de ejemplo del agente aglutinante se encuentran entre, aproximadamente, 1% en peso hasta aproximadamente 5% en peso, o entre aproximadamente 1.5 y 3% en peso; una proporción en peso, a modo de ejemplo, del agente aglutinante al BH4 está dentro del rango de aproximadamente 1:10 hasta aproximadamente 1:20. Las concentraciones a modo de ejemplo del agente de desintegración se encuentran entre aproximadamente 1% en peso hasta aproximadamente 20% en peso; una proporción en peso a modo de ejemplo del agente de desintegración a BH4 está dentro del rango de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:10. Las concentraciones a modo de ejemplo del antioxidante están de entre aproximadamente 1% en peso y aproximadamente 3% en peso; una proporción en peso a modo de ejemplo del antioxidante a BH4 está dentro del rango de aproximadamente 1:5 a 1:30. En un ejemplo, el ácido ascórbico es el antioxidante y se utiliza en una proporción con respecto a BH4 menor a 1:1, por ejemplo 1:2 o menos, o 1:10 o menos. Las concentraciones, a modo de ejemplo, del lubricante en una formulación de comprimido estable de la presente invención, están entre aproximadamente 0.1% en peso y aproximadamente 2% en peso; una proporción en peso a modo de ejemplo de lubricante a BH4 está dentro del rango de aproximadamente 1:25 a 1:65.

La formulación sólida estable puede incluir opcionalmente otros agentes terapéuticos adecuados para la condición que será tratada, por ejemplo, folatos, incluyendo precursores de folato, ácido fólico o derivados de folato; y/o arginina; y/o vitaminas tales como vitamina C y/o vitamina B2 (riboflavina) y/o vitamina B12; y/o precursores neurotransmisor tales como L-dopa o carbidopa; y/o 5-hidroxitriptófano.

Los folatos a modo de ejemplo, incluyendo precursores de folato, ácidos fólico o derivados de folato se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,011,040 y 6,544,994, incluyen ácido fólico (pteroilmonoglutamato), ácido hidrofólico, ácido tetrahidrofólico, ácido 5-metiltetrahidrofólico, ácido 5,10-metilenotetrahidrofólico, ácido 5,10-metentetrahidrofólico, ácido 5,10-formiminotetrahidrofólico, ácido 5-formiltetrahidrofólico (leucovorin), ácido 10-formiltetrahidrofólico, ácido 10-metiltetrahidrofólico, uno o más de los folilpoliglutamatos, compuestos en los cuales el anillo de pirazina de la porción de pterina del ácido fólico o de los folilpoliglutamatos se reduce para proporcionar dihidrofolatos o tetrahidrofolatos, o derivados de todos los compuestos anteriores en los cuales las posiciones N-5 o N-10 llevan una unidad de carbono en diversos niveles de oxidación, o sales farmacéuticamente compatibles, o una combinación de dos o más de los mismos. Los tetrahidrofolatos a modo de ejemplo incluyen ácido 5-formil-(6S)-tetrahidrofólico, ácido 5-metil-(6S)-tetrahidrofólico, ácido 5,10-metileno-(6R)-tetrahidrofólico, ácido 5,10-metenil-(6R)-tetrahidrofólico, ácido 10-formil-(6R)-tetrahidrofólico, ácido 5-formimino-(6S)-tetrahidrofólico o ácido (6S)-tetrahidrofólico, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Las sales a modo de ejemplo incluyen sales de sodio, potasio, calcio o amonio.

Las proporciones en peso relativas, a modo de ejemplo, de BH4 de los folatos a arginina, puede ser de aproximadamente 1:10:10 a aproximadamente 10:1:1.

Las formulaciones estables de la presente invención pueden ser proporcionadas, por ejemplo como comprimidos o píldoras o cápsulas en botellas HDPE proporcionadas con una cápsula o cavidad disecante; o en un empaquetado de burbuja de plástico de lámina sobre lámina, o en un empaquetado de burbuja de plástico que comprende una película de polímero transparente, si esto es comercialmente deseable.

IV. Tratamiento de enfermedades que responden a BH4

Hiperfenilalaninemia, trastornos neuropsicológicos o neuropsiquiátricos

Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para tratamientos y condiciones asociados con niveles elevados de fenilalanina o niveles disminuidos de tirosina o triptófano, los cuales pueden ser originados, por ejemplo, por actividad reducida de hidroxilasa de fenilalanina, hidroxilasa de tirosina o hidroxilasa de triptófano. Las condiciones asociadas con niveles de fenilalanina elevados incluyen específicamente fenilcetonuria tanto leve como clásica, y hiperfenilalaninemia tal como se describe en la presente invención, y las poblaciones de pacientes a modo de ejemplo incluyen los subgrupos de pacientes aquí descritos así como cualquier paciente que muestra niveles de fenilalanina superiores a los normales.

Las condiciones asociadas con niveles de tirosina o triptófano disminuidos incluyen deficiencia de neurotransmisores, trastornos neurológicos y psiquiátricos tales como enfermedad de Parkinson, distonia, degeneración espinocerebelar, dolor, fatiga, depresión, otros trastornos afectivos y esquizofrenia. La sobreproducción de NO mediante nNOS ha estado implicada en infartos cerebrales, dolores de cabeza por migraña, enfermedad de Alzheimer y con tolerancia y dependencia a morfina. La BH4 se puede administrar para cualquiera de estas condiciones. Otros trastornos neuropsiquiátricos, a modo de ejemplo, para los cuales BH4 puede ser administrada, incluyen enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno psicótico breve, trastorno ilusorio, trastorno psicótico compartido, trastorno psicótico debido a condición médica general, trastorno psicótico inducido por sustancias, otros trastornos psicóticos, disquinesia tardía, enfermedad de Machado-Joseph, degeneración espinocerebelar, ataxia cerebelar, distonia, síndrome de fatiga crónica, depresión aguda o crónica, síndrome de tensión crónica, fibromialgia, migraña, trastorno de hiperactividad por déficit de atención, trastorno bipolar y autismo.

Las formulaciones estables también pueden ser utilizadas para tratar pacientes que padecen de deficiencia de BH4, por ejemplo debido a un defecto en la trayectoria de su síntesis, incluyendo pero sin limitarse a distonia que responde a dopa (DRD), deficiencia de reductasa de sepiapterina (SR), o deficiencia de reductasa de dihidropteridina (DHPR).

Los sujetos adecuados para tratamiento con las formulaciones estables de la presente invención incluyen sujetos con una concentración elevada de Phe en plasma en la ausencia del terapéutico, por ejemplo mayor a 1800 $\mu\text{M/L}$, o mayor a 1600 μM , mayor a 1400 μM , mayor a 1200 μM , mayor a 1000 μM , mayor a 800 μM , o mayor a 600 μM , mayor a 420 μM , mayor a 300 μM , mayor a 200 μM , o mayor a 180 μM . PKU leve generalmente se clasifica como concentraciones en plasma Phe de hasta 600 $\mu\text{M/L}$, PKU moderado como concentraciones en plasma de Phe de entre 600 $\mu\text{M/L}$ hasta aproximadamente 1200 $\mu\text{M/L}$ y PKU clásico severo como concentraciones en plasma de Phe que son mayores a 1200 $\mu\text{M/L}$. El tratamiento preferente con las formulaciones estables solas o con dieta restringida en proteína disminuye la concentración de fenilalanina en plasma del sujeto a menos de 600 μM , o menos de 500 μM , o menos de 360 $\mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$, o menos de 200 μM , o menos de 100 μM . Otros sujetos adecuados incluyen sujetos diagnosticados como teniendo una actividad reducida de hidroxilasa de fenilalanina (PAH), fenilcetonuria atípica o maligna asociada con deficiencia de BH4, hiperfenilalaninemia asociada con trastorno hepático y hiperfenilalaninemia asociada con malaria. La actividad PHA reducida puede resultar de una mutación en la enzima PAH, por ejemplo, una mutación en el dominio catalítico de PAH o una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en F39L, L48S, 165T, R68S, A104D, S110C, D129G, E178G, V190A, P211T, R241C, R261Q, A300S, L308F, A313T, K320N, A373T, V388M E390G, A395P, P407S, y Y414C; o sujetos que son mujeres embarazadas, mujeres con edad para embarazarse que están contemplando el embarazo, o niños entre 0 y 3 años de edad, o 0-2, 0-1.5 ó 0-1; o sujetos diagnosticado como que no responden en 24 horas a una prueba de carga BH4 de dosis simple o a una prueba de carga de dosis múltiple, tal como una prueba de carga de 4 dosis o 7 días. Las poblaciones de pacientes a modo de ejemplo y pruebas de carga de BH4 a modo de ejemplo, se describen en la publicación internacional No. WO 2005/049000.

Las Patentes Estadounidenses Nos. 4,752,573; 4,758,571; 4,774,244; 4,920,122; 5,753,656; 5,922,713; 5,874,433; 5,945,452; 6,274,581; 6,410,535; 6,441,038; 6,544,994; y las Publicaciones de Patente Estadounidense US 20020187958; US 20020106645; US 2002/0076782; US 20030032616 describen cada una métodos para administrar composiciones BH4 para tratamientos no PKU. Cada una de estas patentes está incorporada a la presente invención como referencia, proporcionando una enseñanza general de los métodos para administrar composiciones BH4 conocidas para los expertos en la técnica, que pueden adaptarse para el tratamiento tal como aquí se describe.

Aunque varían las necesidades individuales, la determinación de rangos óptimos de cantidades efectivas de cada componente está dentro de las habilidades en la técnica. Las dosificaciones típicas de BH4 comprenden de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, lo cual normalmente será una cantidad de aproximadamente 5 (1 mg/kg x 5kg peso corporal) a 3000 mg/día (30mg/kg x 100kg peso corporal). Aunque se contemplan la administración diaria, continua, para HPA puede ser deseable finalizar la terapia BH4 cuando se reduzcan los síntomas de los niveles Phe a debajo de un cierto nivel de umbral. Por supuesto, la terapia puede ser reiniciada en el caso de que vuelvan a surgir niveles Phe. Las dosis adecuadas pueden ser confirmadas a través del uso de ensayos establecidos para determinar niveles en sangre de Phe junto con datos de respuesta a dosis relevantes.

En modos de realización a modo de ejemplo, se contemplan que los métodos de la presente invención proporcionen a un paciente que necesita del mismo, una dosis diaria de entre aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de BH4. Por supuesto, un experto en la técnica puede ajustar esta dosis hacia arriba o hacia abajo dependiendo de la eficacia que esté siendo lograda a través de la administración. La dosis diaria puede administrarse en una sola dosis o de manera alternativa puede administrarse en múltiples dosis en intervalos separados de manera conveniente. En modos de realización a modo de ejemplo, la dosis

diaria puede ser de 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 22 mg/kg, 24 mg/kg, 26 mg/kg, 28 mg/kg, 30 mg/kg, 32 mg/kg, 34 mg/kg, 36 mg/kg, 38 mg/kg, 40 mg/kg, 42 mg/kg, 44 mg/kg, 46 mg/kg, 48 mg/kg, 50 mg/kg, o más mg/kg.

5 *Regímenes de dosis baja*

En un método terapéutico de dosis baja de la presente invención, las dosis bajas, por ejemplo dosis de 0.1 a 5 mg/kg por día están contempladas, incluyendo dosis de 0.1 a 2 mg/kg, o 0.1 a 3 mg/kg, o 1 mg/kg a 5 mg/kg. Las dosis menores a 5 mg/kg por día son las preferentes. De acuerdo con la presente invención, dichas dosis se espera que proporcionen mejorías con puntos extremos de estudios relevantes, y se espera que los derivados BH4 tengan propiedades biológicas mejoradas relativas al BH4 natural en dichas dosis. En particular, la presente invención contempla que cualesquiera de las 1',2'-diacil-(6R,S)-5,6,7,8-tetrahidro-L-biopterinas o tetrahidrobiopterinas lipoides descritas en la presente patente muestran propiedades biológicas mejoradas en bajas dosis.

La presente invención también contempla de manera específica el uso de BH4, o un precursor o derivado del mismo, para tratar enfermedades que responden a BH4 en una dosis dentro del rango de 0.1 a 5 mg/kg de peso corporal/día, a través de cualquier vía de administración incluyendo pero sin limitarse a administración oral, en una dosis de una vez al día o múltiples dosis divididas (por ejemplo 2, 3 ó 4) por día, para una duración de al menos 1, 2, 3 ó 4 semanas o más, o 1, 2, 3, 4, 5, 6 meses o más. Las dosis a modo de ejemplo incluyen menos de 5 mg/kg/día, 4.5 mg/kg/día o menos, 4 mg/kg/día o menos, 3.5 mg/kg/día o menos, 3 mg/kg/día o menos, 2.5 mg/kg/día o menos, 2 mg/kg/día o menos, 1.5 mg/kg/día o menos, 1 mg/kg/día o menos, o 0.5 mg/kg/día o menos. Las dosis equivalentes por área de superficie corporal también están contempladas.

Para la persona con peso/área de superficie corporal media (por ejemplo 70 kg), la presente invención también contempla una dosis diaria total menor a 400 mg. Los ejemplos de dichas dosis diarias totales incluyen 360 mg/día, 350 mg/día, 300 mg/día, 280 mg/día, 210 mg/día, 180 mg/día, 175 mg/día, 150 mg/día, o 140 mg/día. Por ejemplo, 350 mg/día o 175 mg/día se pueden administrar fácilmente con una formulación de dosificación oral de 175 mg, una o dos veces al día. Otras dosis diarias totales a modo de ejemplo incluyen 320 mg/día o menos, 160 mg/día o menos, o 80 mg/día o menos. Dichas dosis se pueden administrar fácilmente con una formulación de dosificación oral de 45 ó 90 mg. Otras dosis diarias totales a modo de ejemplo incluyen 45, 90, 135, 180, 225, 270, 315 o 360 mg/día o menos, que se pueden administrar fácilmente con una formulación de dosificación oral de 45 o 90 mg. Aún otras dosis diarias totales a modo de ejemplo incluyen 60, 120, 180, 240, 300, o 360 mg/día, administrables fácilmente con una formulación de dosificación oral de 60 ó 120 mg. Otras dosis diarias totales a modo de ejemplo incluyen 70, 140, 210, 280, o 350 mg/día, administrables fácilmente con una formulación de dosis oral de 70 ó 140 mg. Las dosis diarias totales a modo de ejemplo también incluyen 55, 110, 165, 220, 275 ó 330 mg/día, fácilmente administrables con una formulación de dosis oral de 55 mg. Otras dosis diarias totales a modo de ejemplo incluyen 65, 130, 195, 260, o 325 mg/día, o 75, 150, 225, 300 o 375 mg/día, por ejemplo en formulaciones de dosificación de 65 mg o 75 mg.

Quedará entendido que la dosis adecuada de una composición de acuerdo con la presente invención dependerá de la edad, salud y peso del receptor, tipo de tratamiento concurrente, si existe, frecuencia de tratamiento, y la naturaleza del efecto deseado (es decir la cantidad de disminución en la concentración de Phe en plasma deseada). La frecuencia de dosificación también depende de efectos farmacodinámicos en niveles de Phe. Si el efecto dura 24 horas a partir de la dosis simple. Sin embargo, la dosis más preferente puede ser diseñada para el sujeto individual, tal como es comprendido y determinable por un experto en la técnica, sin experimentación indebida. Esto implica normalmente el ajuste de una dosis estándar, por ejemplo, reducción de la dosis si el paciente tiene un bajo peso corporal.

La frecuencia de dosificación BH4 dependerá de los parámetros farmacocinéticos del agente y las rutas de administración. La formulación farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración administración y la dosificación deseada. Ver por ejemplo la publicación de Remington's Pharmaceutical Sciences, dieciochoava edición (1990, Mack Publ. Co, Easton PA 18042) pp 1435 1712, incorporada a la presente invención como referencia. Dichas formulaciones pueden influenciar el estado físico, estabilidad, rango de liberación in vivo y rango de despeje de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración administración, se puede calcular una dosis adecuada de acuerdo con el peso corporal, áreas de superficie corporales o tamaño de órganos. El refinado adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosis de tratamiento adecuada se elabora de manera rutinaria a través de los expertos en la técnica, sin experimentación indebida, especialmente a la luz de la información de dosificación y ensayos aquí descritos, así como los datos farmacocinéticos observados en animales o en ensayos clínicos en humanos.

El régimen de dosificación final fue determinado por el médico tratante, considerando factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, actividad específica del fármaco, severidad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, condición, pero corporal, peso y dieta del paciente, la severidad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. Conforme se llevan a cabo estudios, surgirá información adicional con respecto a niveles de dosificación adecuados y duraciones de tratamiento para enfermedades y condiciones específicas.

V. Terapia de combinación

Ciertos métodos de la presente invención implican el uso combinado de las formulaciones estables de la presente invención y uno o más de otros agentes terapéuticos.

En dicha terapia de combinación, la administración de formulaciones estables de la presente invención puede ser concurrente con, o puede proceder o seguir la administración del segundo agente terapéutico, por ejemplo mediante intervalos que se encuentra en un rango de minutos a horas, siempre que ambos agentes tengan la capacidad de ejercer su efecto terapéutico en periodos de tiempo de superposición. Por lo tanto, la presente invención contempla las formulaciones estables de la presente invención para utilizarse con un segundo agente terapéutico. La presente invención también contempla el uso de un segundo agente terapéutico en la preparación de un medicamento para su administración con la tetrahidrobiopterina estable, precursor, derivado o formulaciones análogas de la presente invención.

La terapia con tetrahidropterina puede ser combinada con restricción de proteína en la dieta para efectuar un resultado terapéutico en pacientes con diversas formas de HPA. Por ejemplo, se puede administrar al sujeto la composición de BH4 y una composición de proteína médica de fenilalanina de bajo nivel en una cantidad efectiva para producir el resultado terapéutico deseado (por ejemplo una disminución en la concentración de Phe en plasma y/o la capacidad de tolerar mayores cantidades de ingesta de pH/proteína sin producir un incremento concomitante en concentraciones de Phe en plasma). Este proceso puede implicar administrar la composición BH4 y la composición terapéutica de proteína en la dieta al mismo tiempo. Esto se puede lograr administrando una composición simple o formulación de proteína farmacológica que incluye todos los requerimientos de proteína en la dieta y también incluye el BH4 dentro de la formulación de proteína. De manera alternativa, la proteína en la dieta (suplemento o comida de proteína normal) se ingiere aproximadamente al mismo tiempo que una formulación farmacológica (comprimido, inyección o bebida) de BH4.

En algunos modos de realización, la dieta con proteína restringida es una la cual es suplementada con aminoácidos, tal como tirosina, valina, isoleucina y leucina. Al paciente se le puede administrar un conjunto, un suplemento de proteína Phe de bajo nivel, el cual puede incluir L-tirosina, L-glutamina, L-carnitina en una concentración de 20 mg/100 g de suplemento, L-aurina en una concentración de 40 mg/100 g de suplemento y selenio. Puede comprender además las dosis diarias recomendadas de minerales, por ejemplo calcio, fósforo y magnesio. El suplemento puede comprender además la dosis diaria recomendada de uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en L-leucina, L-prolina, acetato de L-lisina, L-valina, L-isoleucina, L-arginina, L-alanina, glicina, L-asparagina monohidrato, L-triptófano, L-serina, L-treonina, L-histidina, L-metionina, ácido L-glutámico y ácido L-aspártico. Además, el suplemento puede ser fortificado con una dosis diaria recomendada de vitaminas A, D y E. Opcionalmente, el suplemento comprende un contenido en grasa que proporciona al menos 40% de la energía del suplemento. Dichos suplementos pueden ser proporcionados en la forma de un suplemento en polvo o en la forma de una barra de proteína. En ciertas modos de realización, la dieta de proteína restringida comprende un suplemento de proteína y el BH4 se proporciona en la misma composición que el suplemento de proteína.

En otras alternativas, el tratamiento con BH4 puede preceder o seguir la terapia de proteína dietética en intervalos que se encuentra en un rango de minutos a horas. En modos de realización en donde la proteína y las composiciones BH4 se administran por separado, se puede asegurar de manera general que no expiró un periodo de tiempo significado entre el tiempo de cada administración, de modo que el BH4 tendrá la capacidad de ejercer un efecto conveniente en el paciente. En dichos casos, se contempla que se puede administrar el BH4 a las 2 a 6 horas (antes o después) del efecto de proteína dietética, por ejemplo, con un tiempo de retraso únicamente aproximadamente 1 hora a menos. En ciertos modos de realización, se contempla que la terapia BH4 sea una terapia continua, en donde se administra una dosis diaria de BH4 al paciente en forma indefinida. En otras situaciones, por ejemplo, en mujeres embarazadas que tienen únicamente formas más leves de PKU y HPA, puede ser la terapia BH4 continúe únicamente durante el tiempo en que la mujer está embarazada y/o en periodo de lactancia.

De forma adicional, además de las terapias basadas únicamente en la administración de BH4 y las regulaciones de proteína dietética, los métodos de la presente invención también contemplan terapia de combinación con una tercera composición que se dirige específicamente a uno o más de los síntomas de HPA. Por ejemplo, se sabe que el déficit en tirosina originada por HPA, da como resultado una deficiencia en

neurotransmisores de dopamina y serotonina. Por lo tanto, dentro del contexto de la presente invención, se contempla que los métodos a base de proteína en la dieta y BH4 puedan ser combinados en forma adicional con la administración de neurotransmisores L-dopa, carbidopa y 5-hidroxitriptófano para corregir los defectos que resultan de las cantidades disminuidas de tirosina en la dieta.

- 5 De forma adicional, la terapia genética tanto con PHA (Christensen et al., Mol. Gent. And Metabol. 76: 313-318, 2002; Christensen et al., Gene Therapy, 7:1971-1978, 2000) y amonía-lias de fenilalanina (PAL Liu et al., Arts. Cells. Blood. Subs y Immob. Biotech. 30(4)243-257, 2002), ha sido contemplada por los expertos en la técnica. Dichas técnicas de terapia genética pueden ser utilizadas en combinación con las terapias a base de restricción de BH4/proteína dietética combinada de la presente invención. En terapias de combinación
10 adicionales, se contempla que la fenilasa pueda ser proporcionada como una enzima inyectable para destruir las bajas concentraciones de Phe en el paciente. Ya que la administración de fenilasa puede no generar tirosina (a diferencia de la administración de PAH), dicho tratamiento aún dará como resultado tirosina, que es un aminoácido esencial para dichos pacientes. Por consiguiente, el suplemento dietético con tirosina puede ser deseable para pacientes que reciben fenilasa en combinación con terapia BH4.
- 15 BH4 puede ser administrada en conjunto para trastornos neuropsicológicos o neuropsiquiátricos de acuerdo con el método de la presente invención con uno o más de otros agentes activos neuropsiquiátricos, incluyendo antidepresivos, precursores de neurotransmisor y triptófano, tirosina, serotonina, agentes que activan los sistemas noradrenérgicos tales como lofepramina, desipramina, reboxetina, tirosina, agentes que actúan preferentemente sobre la serotonina, inhibidores combinados tanto de captación de noradrenalina
20 como serotonina, tal como venlafaxina, duloxetine o milnacipran, o fármacos que son inhibidores combinados para recaptación tanto de dopamina como noradrenalina, tal como bupropión.

En un modo de realización relacionado, BH4 se administra con otros agentes terapéuticos comúnmente utilizados para tratar diabetes, enfermedad vascular, hiperlipidemia. Los agentes utilizados para tratar diabetes incluyen, pero no se limitan a, agentes que mejoran la sensibilidad de insulina tal como ligandos
25 PPAR gamma (tiazolidinodonas, glitazonas, troglitazonas, rosiglitazona (Avandia), pioglitazona), estimuladores de secreción de insulina tales como sulfonilureas (gliquidona, tolbutamida, glimeprida, clorpropamida, glipizida, gliburida, acetohexamida) y meglitinidas (meglitinida, repaglinida, nateglinida) y agentes que reducen la producción de glucosa en el hígado tal como metformina. El agente utilizado para tratar enfermedad vascular, incluye pero no se limita a antagonistas de receptor de endotelina comúnmente
30 utilizados para el tratamiento de hipertensión y otros trastornos relacionados con disfunción endotelial, tal como bosentan, darusentan, enrasentan, tezosentan, atrasentan, ambrisentan sitaxsentan; relajantes de músculo liso tales como inhibidores PDE5 (acción indirecta) y minoxidil (acción directa); inhibidores de enzima de conversión de angiotensina (ACE) tales como captopril, enalapril, lisinopril, fosinopril, perindopril, quinapril, trandolapril, benazepril, ramipril; bloqueadores de receptor de angiotensina II tales como irbesartan, losartan,
35 valsartan, eprosartan, olmesartan, candesartan, telmisartan; bloqueadores beta tales como atenolol, metoprolol, nadolol, bisoprolol, pindolol, acebutolol, betaxolol, propranolol; diuréticos tales como hidroclorotiazida, furosemida, torsemida, metolazona; bloqueadores de canal de calcio tales como amlodipina, felodipina, nisoldipina, nifedipina, verapamil, diltiazem; bloqueadores de receptor alfa doxazosin, terazosin, alfuzosin, tamsulosin; y agonistas alfa centrales tales como clonidina. Los agentes utilizados para tratar
40 hiperlipidemia, incluyen pero no se limitan a agentes que disminuyen LDL tales como estatinas (atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, calcio de rosuvastatina, simvastatina) y ácido nicotínico, inhibidores de proteína de transferencia de éster colesterolico (tal como torcetrapib), agentes que estimulan PPAR alfa tales como fibratos, gemfibrozil, fenofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, agentes que enlazan y ubican la reabsorción de ácidos biliares y reducen los niveles de colesterol tales como agente secuestrante de ácido biliar,
45 colestiramina y colestipol e inhibidores de absorción de colesterol.

BH4 también se puede administrar con un factor o combinaciones de factores que aumenta o normaliza la producción del óxido nítrico vasodilatador (NO) solo o en combinación con un agente terapéutico. En un modo de realización, dichos factores aumentan la actividad o expresión de la síntesis de novo de BH4 y se selecciona del grupo que consiste en ciclohidrolasa I de trifosfato de guanosina (GTPCH1), sintasa de 6-piruvoyltetrahidropterina (PTPS) y reductasa de sepiapterina. En un modo de realización preferente de la presente, la síntesis de BH4 se incrementa, incrementando la expresión, de la expresión GTPCH1 a través del uso de cualquiera de uno o más análogos o agonistas de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) incluyendo forskolin, cAMP 8-bromo u otros agentes que funcionan para incrementar la señalización de célula transmitida por cAMP, por ejemplo, citocinas y factores de crecimiento que incluyen interleucina-1, interferón-
50 gamma (IFN- γ), factor alfa de necrosis de tumor (TNF- α), proteína c-reactiva, reductasas HMG-CoA (estatinas tipo atorvastatina) factor de crecimiento de nervios (NGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), hormonas incluyendo adrenomedulina y benzoato de estradiol y otros compuestos tales como NADPH y análogos NADPH, cafeína, metil-xantinas de ciclosporina A, incluyendo xantina de 3-isobutil-1-metilo, teofilina, reserpina, peróxido de hidrógeno.

Un modo de realización de la presente invención, hace referencia por consiguiente al incremento de niveles GTPCH1, inhibiendo la degradación de nucleótidos 3'5'-cíclico utilizando inhibidores de las once familias de fosfodiesterasas (PDE1-11) incluyendo PDE1, PDE3, PDE5. Los inhibidores PDE de la presente invención incluyen Viagra/sildanefil, cialis/tadalafil, vardenafil/levitra, udenafil, 8-Metoximetil-IBMX, UK-90234, dexametasona, hesperetina, hesperedinas, Irsogladina, vinpocetina, cilostamida, rolipram, beta-carbolina-3-carboxilato de etilo (beta-CCE), derivados de tetrahidro-beta-carbolina, 3-O-metilquercetina y similares.

Otro modo de realización de la presente invención hace referencia al incremento en los niveles de BH4 incrementando los niveles de enzimas que sintetizan BH4 a través de terapia genética o administración dirigida por endotelio de los polinucleótidos de la maquinaria sintética de BH4. Aún otro modo de realización de la presente invención hace referencia al incremento de niveles de BH4, mediante la suplementación con enzimas de sintetización-BH4 GTPCH1, PTPS, SR, PCD, DHPR y DHFR. Se contempla que las enzimas de sintetización-BH4 comprenden todas las formas naturales y no naturales de las enzimas, incluyendo mutantes de las proteínas.

Otro modo de realización de la presente invención hace referencia a incrementar los niveles BH4, desviando el sustrato de trifosfato de 7,8-dihidroneopterina hacia enzimas de sintetización BH4 PTPS en lugar de fosfatasa alcalina (AP), inhibiendo la actividad AP. Los agentes o compuestos que inhiben la actividad de AP incluyen análogos de fosfato, levamisole y L-Phe. Otro modo de realización de la presente invención hace referencia a agentes o compuestos que inhiben fosfatasa alcalina que incluyen el ARN inhibidor pequeño (siARN), ARN antisentido, dsADN, moléculas pequeñas, anticuerpos de neutralización, fragmentos de cadena simple, quiméricos, humanos y de anticuerpo que inhiben la síntesis de fosfatasa alcalina.

Otro modo de realización de la presente invención incluye agentes o compuestos que aumentan la actividad de catalizador o cofactores necesarios para la síntesis de enzima de la trayectoria de la síntesis de NOVO de la síntesis BH4.

Otro modo de realización de la presente invención incluye agentes o compuestos que evitan la degradación de las enzimas necesarias para la síntesis de BH4. Aún otro modo de realización de la presente invención incluye agentes o compuestos que evitan la degradación de los catalizadores necesarios para la síntesis de BH4 y sus enzimas sintéticas incluyendo GTPCH1, PTPS y SR.

Otro modo de realización de la presente invención hace referencia al incremento de niveles de BH4 incrementando la reducción de BH2 a través de la trayectoria salvaje. In vivo, BH4 queda oxidado para BH2. BH2 que existe como la forma quinoide (qBH2) y como la 7,8-dihidropterina la cual se reduce a BH4 mediante DHPR y DHFR respectivamente. Un modo de realización de la presente invención, hace referencia a incrementar la regeneración o recuperación de BH4 de BH2, modulando la actividad de síntesis de enzimas PCD, DHPR y DHFR utilizando agentes o compuestos tales como NADPH de trayectoria, tioles, percloromercuribenzoato, peróxido de hidrógeno y similares.

Otro modo de realización de la presente invención hace referencia a agentes que estabilizan BH4 disminuyendo la oxidación de BH4 utilizando agentes o compuestos tales como antioxidantes que incluyen ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol alfa (vitamina E), tocoferoles (por ejemplo vitamina A), selenio, beta-carotenos, carotenoides, flavonas, flavonoides, folatos, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequizas, antocianidinas y chalconas.

En un modo de realización adicional, dicho factor(s) puede incrementar la actividad de expresión de la sintasa de óxido nítrico y de esta forma aumentar la generación de NO.

Incluso en otro modo de realización, la presente invención contempla factores que inhiben la proteína reguladora de retroalimentación GTPCH, GFRP. Un modo de realización de la presente invención hace referencia a agentes o compuestos que inhiben el enlace de BH4 al complejo GTPCH1/GFRP, evitando de esta forma la inhibición de retroalimentación mediante BH4. Los agentes o compuestos de la presente invención incluyen inhibidores competitivos tales como formas alternas de BH4 con afinidades alteradas para el complejo, análogos estructurales, etc. Aún otro modo de realización de la presente invención incluye agentes o compuestos que aumentan el enlace de L-fenilalanina a CTPCH1/GFRP induciendo la síntesis de BH4. Otro modo de realización de la presente invención incluye agentes o compuestos que incrementan los niveles de L-Phe tales como precursores de L-fenilalanina, que sirven para evitar la inhibición de retroalimentación de GTPCH1 mediante GFRP y BH4.

Incluso otro modo de realización de la presente invención hace referencia a agentes o compuestos que modulan la actividad o la síntesis de GFRP. Un modo de realización de la presente invención incluye agentes o compuestos que inhiben la actividad de GFRP. Otro modo de realización de la presente invención incluye el

uso de siARN, moléculas pequeñas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y similares para inhibir la síntesis de GFRP.

VI. Ensayos de biopterina

La concentración de biopterina total y dióptero oxidada en plasma, sangre y otros tejidos se determina en base a el método descrito por Fukushima et al. (Anal. Biochem. 102:176 (1980)). La biopterina tiene cuatro diferentes formas que incluyen dos formas de biopterina reducida, R-tetrahidrobiopterina (BH4) y R-dihidrobiopterina (q-BH2) quinonoide y dos formas de biopterina oxidada, dihidrobiopterina (BH2) y biopterina (B). De estas cuatro formas, únicamente las formas reducidas de biopterina tienen actividad coenzimática. La biopterina reducida es convertida a B mediante yodilación bajo condiciones ácidas, mientras que bajo condiciones alcalinas, se convierte a pterina. La biopterina oxidada se convierte a B mediante yodilación bajo condiciones ácidas y alcalinas. Tomando la ventaja de esta propiedad, la cantidad de biopterina total se determina al momento de la yodilación bajo condiciones ácidas, y la cantidad de biopterina oxidada se determina al momento de la yodilación bajo condiciones alcalinas, de modo que la cantidad de biopterina reducida se calcula a partir de la diferencia en cantidad de la misma. Cuando se utiliza como una coenzima, BH4 se convierte a q-BH2. El q-BH2 se convierte inmediatamente a BH4 mediante reductasa de dihidrobiopterina o si no se reduce, se oxida a BH2 o DHPT. Debido a que es difícil que la biopterina exista en la forma de q-BH2 in vivo, la biopterina reducida también puede ser desplazada como BH4.

Las muestras de plasma y sangre total recolectadas, se someten inmediatamente a oxidación con una solución de oxidación ácida (solución HCl 0.6N en agua que contiene yoduro de potasio al 0.6% (KI), yodina al 0.3% (I2) y ácido tricloroacético (TCA)) y la solución de oxidación alcalina (0.7N hidróxido de sodio (NaOH)). La determinación de B se lleva a cabo mediante HPLC y la radiactividad se mide utilizando un contador de centelleo líquido.

La medida de BH4 utilizando HPLC de fase inversa (RP) acoplada con Espectrometría de Masa Tándem (LC/MS/MS): El uso combinado de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP) y espectrometría de masa tándem (LC/MS/MS), mostraron ser selectivas para BH4 en plasma humano, sensibles a BH4 dentro del rango de 5 - 1000 ng/mL. El método se asocia con aproximadamente una conversión del 50% de BH4 debido a la oxidación durante la recolección y almacenamiento. Las muestras son estables durante más de 3 meses en sal de dipotasio de plasma de ácido etilenodiaminotetraacético (K2EDTA). La recuperación de los pasos del tratamiento previos de aproximadamente 75%. La precisión y exactitud del método se determinó teniendo un coeficiente de variación (CV)% debajo de 15% (20% en el límite inferior de cuantificación, LLOQ).

El uso combinado de HPLC y espectrometría de masa tándem mostraron tener una mejoría con respecto a HPLC sólo en la determinación del artículo de prueba BH4 debido a: (1) su selectividad incrementada para fármaco-BH4 (en tanto que HPLC mide la biopterina total), (2) rango cualitativo más amplio, (3) dosificación de conversión establecido, (4) caracterización extensa y utilidad probado en sujetos humanos y (5) medición novedosa y útil en diferentes especies y matrices.

El método mejorado comprende los siguientes pasos. Las muestras de sangre, plasma, homogenados de tejido u orina se someten a oxidación ácida o alcalina. Con oxidación ácida, (1) las muestras son tratadas con cloruro de potasio (KCl), ácido hidroclicó (HCl) o TCA durante una hora; (2) las muestras oxidadas de ácido posteriormente son sometidas a yodometría; (3) las muestras se corren a través de una columna de intercambio de iones; (4) biopterina total comprendiendo BH4, q-BH2 (que es reducida inmediatamente in vivo a BH4, de modo que la biopterina reducida medida, se base principalmente en BH4), BH2 y B se miden utilizando HPLC y espectrometría de masa tándem. Con oxidación alcalina, (1) las muestras son tratadas con KI, I2 o NaOH durante una hora; (2) las muestras oxidadas alcalinas posteriormente son sometidas a acidificación con HCl o TCA; (3) son sometidas a yodometría; (4) las muestras corren a través de una columna de intercambio de iones; (5) la biopterina oxidada que comprende BH2 y B son medidas; (6) se miden diferentes especies utilizando HPLC y espectrometría de masa tándem; y (7) la cantidad de biopterina reducida (BH4 + q-BH2) se calcula como la diferencia entre la biopterinas totales menos la forma oxidada.

Los diagramas de flujo para la medición de biopterina y el resumen de validación del ensayo se proporcionan en las figuras 16 y 17.

Ensayo Optimizado

Es conveniente un método HPLC utilizando Detección Electroquímica (ECD) y detección de Fluorescencia (FL), ya que permite la medición de cada uno de los compuestos de biopterina independientes (BH4, BH2 y B) así como análogos.

BH4 es un cofactor para la sintasa de óxido nítrico del sistema de enzimas (NOS), que produce óxido nítrico (NO). La producción de NO es importante para mantener homeostasis vascular. Cuando los niveles intracelulares de BH4 están limitados, la producción de NO se disminuye (debido a la actividad NOS disminuida) y conduce a la generación del daño de superóxido de radical libre (O_2^-). O_2^- en exceso puede conducir a una disfunción endotelial y puede contribuir a la oxidación de BH4 a BH2. Una baja proporción de BH4 a BH2, puede promover lesión endotelial, en tanto que una alta proporción de BH4 a BH2, puede promover la salud endotelial. Por consiguiente, la caracterización de la proporción BH4 a BH2 puede servir como una variable explicativa de la salud endotelial.

Las concentraciones de diferentes biopterinas (BH4, BH2 y B) o análogos se determina utilizando inicialmente HPLC de fase inversa para separación, seguido de detección ECD y FL.

BH4 que es una molécula no fluorescente, sensible-redox, se mide utilizando ECD. BH4 (y análogos de los mismos) se mide utilizando ECD en donde BH4 (o análogos) se oxidan mediante el electrodo 1 a una forma de dihidrobiopterina quinonoide (por ejemplo, qBH2), un intermediario de dihidropterina de vida corta, que posteriormente es reducido nuevamente a BH4 (o análogo) en el electrodo 2. Posteriormente el detector utiliza la corriente generada por esta reacción de reducción para determinar la concentración de BH4 o análogo del mismo (qBH2 endógeno es insignificante).

BH2, B y los análogos de los mismos se pueden medir en la misma inyección mediante detección de fluorescencia. La oxidación post-ECD de BH2 o análogos de los mismos utilizando una célula detectora de acondicionamiento en el potencial óptimo, oxida BH2 o un análogo del mismo a B o el análogo de biopterina correspondiente. Esto es deseable debido a que BH2 no es fluorescentemente activo o fácilmente medido y debe ser convertido a B, que se mide fácilmente utilizando fluorescencia. BH2 endógeno, una vez que se convierte a B, y B endógeno son distinguidos entre sí a través de dos picos fluorescentes separados, debido a los diferentes tiempos de retención en la columna HPLC de cada molécula.

En total, los métodos se pueden utilizar para medir las especies BH4, BH2 y B y análogos de las mismas. Las biopterinas preferentemente se miden utilizando 2% de fase móvil que contiene MeOH, tal como se describe en la presente invención. Los análogos de biopterina, tales como derivados de biopterina de valina pueden ser mejor adaptados a contenidos de metanol superiores en la fase móvil, por ejemplo una fase móvil que contiene 10% MeOH.

Por lo tanto, un método para detectar biopterinas en una mezcla de especies de biopterina, puede incluir (a) separar las especies de biopterina en la mezcla mediante HPLC de fase inversa; y en el caso de BH4 y análogos de los mismos, (b1) llevará a cabo detección electroquímica oxidando el BH4 y análogos de los mismos presentes a través de un primer electrodo para formas de dihidrobiopterina quinonoide, seguido de reducción de las formas quinonoides de regreso a BH4 y análogos de los mismos presentes en un segundo electrodo, y midiendo la corriente generada por la reacción de reducción para determinar la concentración de especies y/o (b2) en el caso de BH2, análogos de los mismos, biopterina o análogos de los mismos, medir dichas especies mediante detección de fluorescencia después de oxidación post-columna de especies BH2 a biopterina. Preferentemente, la fase móvil es una como la descrita en la presente patente.

En un modo de realización, la fase móvil preferente incluye acetato de sodio, ácido cítrico, EDTA y 1,4-ditioeritritol (DTE) con metanol. Las concentraciones preferentes son 50 mM acetato de sodio, 5 mM ácido cítrico, 48 μ M de EDTA y 160 μ M de DTE con 2% de metanol.

VII. Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar los modos de realización preferentes de la presente invención. Los expertos en la técnica deberán apreciar que las técnicas descritas e los ejemplos que se encuentran a continuación, representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la presente invención, y por lo tanto se puede considerar que constituye modos preferentes para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica, a la luz de la presente invención, deberán apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las modos de realización específicas, las cuales se describen y aún obtienen un resultado similar o parecido sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1

Curva de Tiempo de Concentración de Biopterina en Plasma Después de una Dosis Oral Simple en Ratas

El propósito de este estudio fue evaluar la farmacocinética de BH4 después de una administración oral simple en ratas. Las dosis simples de BH4 (10 y 100 mg/kg) fueron administradas por vía oral a ratas Sprague Dawley macho (6 semanas de edad) bajo condiciones de ayuno.

Resultados

Las concentraciones de biopterina total máxima en plasma, 2 horas y 1 hora después de la dosificación fueron de 108 ng/ml (es decir aproximadamente 3x el nivel endógeno) y 1227 ng/ml (es decir aproximadamente 30x el nivel endógeno) respectivamente (figura 18). Posteriormente, la biopterina tuvo una vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de aproximadamente 1.1 hora, regresando al nivel endógeno 9 horas después de la dosificación para la dosis de 10 mg/kg y 24 horas después de la dosificación para la dosis de 100 mg/kg (figura 18).

La biodisponibilidad (F) después de una administración oral de 10 y 100 mg/kg fue de 6.8% y 11.8%, respectivamente, en base al área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo (ΔAUC) obtenida sustrayendo el nivel endógeno durante una administración intravenosa de 10 mg/kg. La tasa de absorción del GI fue de 8.8% cuando se midió utilizando marcadores radioactivos en orina. Un estimado del valor real puede ser de aproximadamente el 10% de biodisponibilidad oral en base a estos datos.

La proporción de la biopterina reducida a las biopterinas totales en plasma (es decir, la proporción de forma reducida) fue relativamente estática (73%-96%) (figura 19).

EJEMPLO 2

Curva de Tiempo de Concentración de Biopterina en Plasma Después de Dosificación Oral Simple a Monos

El propósito de este estudio fue evaluar las farmacocinéticas de sapropterina después de una administración oral simple en monos cinomolgo. Se administró una dosis simple de sapropterina (10 mg/kg) en forma oral a monos cinomolgo hembra (3/grupo) bajo condiciones de ayuno.

Resultados

La concentración de biopterina en plasma total (ΔC) alcanzó su valor máximo 3 horas después de la dosificación (344 ng/ml), aproximadamente 20x de niveles endógenos) (figura 20). La vida media de eliminación en plasma de biopterina fue de aproximadamente 1.4 horas, regresando al nivel endógeno a las 24 horas posteriores a la dosis. La proporción de biopterina reducida a biopterinas totales, fue casi constante durante el periodo de prueba. La biodisponibilidad (F) después de una administración oral 10 mg/kg a monos hembra fue de aproximadamente 9%, medido como proporciones orales/iv ΔAUC (figura 21).

EJEMPLO 3

Biodisponibilidad Relativa de Tetrahydrobiopterina (BH4) Administrado Después de la Disolución de Comprimidos en Agua o Administradas como Comprimidos intactos, y Efecto de la Alimentación en la Absorción en Sujetos Sanos

Objetivos

Los objetivos primarios del estudio fueron: (1) evaluar la biodisponibilidad relativa de tetrahydrobiopterina (BH4, diclorhidrato de sapropterina) cuando se administra después de la disolución de comprimidos en agua o se administra como comprimidos intactos; (2) comparar el efecto del alimento en la biodisponibilidad de BH4 en sujetos saludables. El objetivo secundario del estudio fue evaluar la seguridad y capacidad de toleración de dosis orales simples de BH4 en sujetos sanos.

Metodología

Este estudio fue un estudio cruzado de etiqueta abierta, aleatorizado, de tres tratamientos, seis secuencias, tres periodos en los cuales 30 sujetos completaron 3 periodos de dosificación de dosis simple, y fueron asignados de forma aleatoria a uno de seis grupos de secuencia (grupos 1, 2, 3, 4, 5 y 6):

Grupo 1: a, b, c

Grupo 2: b, c, a

Grupo 3: c, a, b

Grupo 4: a, c, b

Grupo 5: b, a, c

Grupo 6: c, b, a

en donde todos los grupos de dosificación recibieron BH4 10 mg/kg por vía oral como se indica:

5 a: administrada después de disolución de comprimido(s) en agua proporcionadas en ayuno bajo condiciones de ayuno.

b: administrado como comprimido(s) intactas proporcionadas en ayuno bajo condiciones de ayuno

b: administrada como comprimido(s) intactas proporcionadas 30 minutos después del comienzo de la ingestión de una comida con alto contenido calórico, alto contenido en grasa en condiciones de alimentación.

10 Cada sujeto recibió una dosis simple de 10 mg/kg de BH4 durante cada periodo de tratamiento. Un periodo de lavado de al menos siete días de separación en cada administración de la dosis. Se llevó a cabo una evaluación posterior al estudio 5 a 7 días después de la descarga del tercer periodo de tratamiento. Se extrajeron muestras de sangre para análisis Farmacocinéticos (PK) en tiempos de recolección programada durante cada periodo de estudio: 30 minutos antes de la dosis y 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 18.0, y 24.0 horas después de la dosis.

15 *Dosis y Modo de Administración*

Se administraron comprimidos BH4 en la forma de dosificaciones 10 mg/kg por periodo de tratamiento. Los comprimidos fueron administrados a través de a) disolución en agua administrada en un estado de ayuno, b) como comprimidos intactos administrados en estado en ayuno o c) como comprimidos intactos proporcionados en estado de alimentación.

20 Cada dosis del fármaco de estudio se preparó y administró en forma líquida (solución) mezclada con agua. El agua suministrada fue agua del grifo a temperatura ambiente. Se prepararon soluciones de dosificación a los 15 minutos del tiempo de dosis programado. La disolución del comprimido en el líquido tomó aproximadamente 1 a 3 minutos. Los comprimidos se rompieron o trituraron en un tazón de dosificación antes de la disolución, con el objeto de mejorar el rango de disolución.

25 En el tiempo de dosificación diseñado en la mañana, se administró BH4 en forma oral como el número de comprimidos equivalente a 10 mg/kg dosis, disuelto en 120 mL de agua o jugo de naranja. Cada sujeto fue observado cercanamente conforme se consumía toda la dosis de 120 mL durante los 15 minutos de preparación. Inmediatamente después de que la dosis se había consumido, se enjuagó el tazón de dosificación con 60 mL de agua y el sujeto consumió el agua del enjuague. Se agregó un segundo enjuague con 60 mL de agua al tazón de dosificación, y posteriormente el sujeto consumió el segundo enjuague. Se completó todo el procedimiento de dosificación en un periodo de tiempo de 1-minuto. Una persona calificada del grupo inspeccionó el tazón de dosificación y la boca de cada sujeto inmediatamente después del término de la dosis, para asegurar que se había consumido toda la dosis. De manera alternativa, el sujeto tragó una píldora que contiene BH4 en lugar de disolverse en agua. Para cada individuo, los periodos de dosificación
30
35 tuvieron lugar en un mínimo de 7 días entre dosis.

Programa de Ingestión de Alimentos

Se sirvió un tentempié la noche de la revisión. A todos los sujetos se les requirió posteriormente ayunar durante al menos 10 horas antes de la dosificación.

Condiciones de ayuno

40 Los sujetos que recibieron tratamientos administrados bajo condiciones de ayuno, fueron dosificados después de que completaron un ayuno durante la noche mínimo de 10 horas.

Los sujetos continuaron en ayuno durante 4 horas posteriores a la dosis. Se dejó agua *ad libitum* durante el estudio, excepto 1 hora antes a 1 hora después de la dosis. Se proporcionaron comidas estandarizadas aproximadamente a las 4 y 10 horas después de la administración del fármaco y en tiempos adecuados
45 posteriormente.

Condiciones de no ayuno

Los sujetos que recibieron tratamientos administrados bajo condiciones de no ayuno fueron dosificados después de consumir un desayuno con alto contenido calórico, alto contenido en grasas. Los sujetos recibieron el siguiente desayuno estándar con alto contenido en grasa (aproximadamente 50% del contenido calórico total de la comida), alto contenido calórico (aproximadamente 1000 calorías) que comenzó 30 minutos antes de la administración programada de la dosis y finalizó (la última mordida tomada) a los 5 minutos antes de la dosis.

2 huevos fritos en mantequilla

2 tiras de beicon

2 rebanadas de tostada con mantequilla

4 onzas de patatas picadas

8 onzas de leche entera

Esta comida contenía aproximadamente 150 calorías de proteínas, 250 calorías de carbohidrato y 500 a 600 calorías de grasa. Se sustituyó una comida equivalente con documentación del menú y contenidos calóricos.

Posteriormente los sujetos ayunaron durante 4 horas posteriores a la dosis. Se dejó agua *ad libitum* durante el estudio, excepto 1 hora antes a 1 hora después de la dosis. Se proporcionaron alimentos estándar aproximadamente 4 y 10 horas después de la administración del fármaco y posteriormente en las horas adecuadas.

Duración de Tratamiento

Tres periodos de tratamiento de dosis simple, separados cada uno un mínimo de 7 días.

Se realizó una visita de seguimiento de 5 a 7 días después de la última visita de tratamiento.

Variable de Seguridad: Evaluación y Métodos

Se evaluó la seguridad para todos los sujetos quienes tomaron al menos una dosis de BH4.

Mediciones de Eficacia y Seguridad Evaluadas y Diagrama de Flujo

Se evaluó la seguridad registrando la incidencia de eventos adversos, cambios en parámetros ECG de 12 cables, signos vitales y resultados de revisión física, y cambios en la línea de base en valores de prueba de laboratorio. El programa para estas evaluaciones muestra la figura 22.

Revisión física y signos vitales

Cada sujeto pasó por una revisión física de rutina por parte del investigador del estudio. La revisión física incluyó evaluación de cabeza, ojos, oídos, nariz, garganta, cuello, cabeza, pecho, pulmones, abdomen, extremidades, pulsaciones periféricas, estado neurológico, piel y otras condiciones físicas para observación. Este protocolo de estudio no requirió revisiones genitourinarias.

Se midió la altura (en centímetros) y peso (en kilogramos) y se calculó el índice de masa corporal (BMI) ($BMI = \text{peso (kg)} / [\text{altura (m)}]^2$).

Se midió la presión sanguínea en posición sentada, de acuerdo con las recomendaciones de la Asociación Americana del Corazón (American Heart Association). Los sujetos estuvieron en descanso con sus pies sobre el suelo durante 5 minutos en posición sentada, cuando se midió la presión sanguínea.

Se midió la frecuencia cardíaca (pulsación) mientras que el sujeto estaba en la posición sentada.

Se tomó un registro de electrocardiograma (ECG) de 12 cables estandarizado en la clasificación y la descarga del estudio. Se evaluaron los ECGs a través de un investigador calificado. Las copias de los informes ECG y de la evaluación se mantuvieron como parte del expediente de cada sujeto.

La historia médica, resultados de prueba de laboratorio clínicos y rastreo(s) ECG se revisaron y evaluaron a través del investigador principal para determinar la capacidad de elección clínica de cada sujeto para participar en el estudio.

Evaluaciones de Laboratorio Clínicas

5 Hematología:

Se evaluaron los siguientes parámetros: hemoglobina, hematocrito, conteo de leucocitos totales diferencial, conteo de glóbulos rojos (RBC) y plaquetas.

Además, se analizó la sangre para el antígeno de Superficie de Hepatitis B, Anticuerpo de Hepatitis C y Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).

10 Química:

Se evaluó lo siguiente: albúmina, nitrógeno de urea en la sangre (BUN), creatinina, bilirrubina total, fosfatasa alcalina (ALP), transaminasa de aspartato (AST), transaminasa de alanina (ALT), sodio (Na⁺), potasio (K⁺), cloruro (Cl⁻), deshidrogenasa láctica (LDH), ácido úrico y glucosa.

Urianálisis:

15 Se evaluó lo siguiente a través del método de varilla graduada de orina: pH, gravedad específica, proteína, glucosa, cetonas, bilirrubina, sangre, nitrito y urobilinógeno. Si la proteína, oculta sangre o los valores de nitrito están fuera de rango, se llevó a cabo una revisión microscópica.

También se analizaron las muestras de orina con respecto a fármacos de abuso (anfetaminas, barbituratos, benzodiazepinas, cannabinoides, cocaína y opiáceos).

20 *Eventos adversos*

En este estudio, se definió un evento adverso (AE) como cualquier surgimiento médico adverso en un sujeto o sujeto de investigación clínica al que se le administró BH4 en cualquier dosis, ya sea si tiene o no una relación causal con el evento. Posteriormente un AE puede ser cualquier signo no favorable y no atendido (incluyendo descubrimientos de laboratorio anormales), síntomas o enfermedad temporal asociada con el uso de BH4, ya sea relacionada o no con BH4. Esta definición incluyó enfermedades o lesiones intercorrientes y exacerbación (incremento en frecuencia, severidad o especificidad) de condiciones pre-existentes.

25

El periodo de informe para AEs comenzó con la primera administración de BH4. El periodo de informe para eventos adversos severos (SAEs) comenzó antes, a partir del momento de la generación de signos del Consentimiento Informado. SAEs se definieron posteriormente en esta sección. El investigador monitoreó todos los AEs hasta la resolución, o si el AE fue determinado como crónico, se identificó una causa. Si un AE permaneció sin resolver a la conclusión del estudio, el PI y Monitor Médico realizó una evaluación clínica para ver si el seguimiento continuo del estaba garantizado y documentó los resultados. La evaluación de severidad fue una de las responsabilidades del investigador en la evaluación de AEs y SAEs. El investigador fue responsable de aplicar su juicio clínico para evaluar la relación causal de cada AE para BH4.

30

35 *Eventos adversos severos*

Se define un evento adverso severo (SAE) como cualquier AE que tiene al menos uno de los siguientes resultados:

Dio como resultado la muerte

40 Puso en riesgo la vida, esto es, puso a los sujetos en riesgo inmediato de muerte a partir de que ocurrió el evento.

Esta definición no incluye una reacción que, de haber ocurrido en una forma más severa, deba originar la muerte.

Hospitalización interna requerida del paciente o prolongación de hospitalización existente.

Admisión de un sujeto al hospital como un paciente interno como resultado de un AE, incluso si el sujeto era dado de alta el mismo día, calificada como hospitalización. Una visita a la sala de urgencias no constituye hospitalización.

Dio como resultado discapacidad o incapacidad persistente significativa.

- 5 Un evento calificado como un resultado de discapacidad o incapacidad persistente significativa si implicó una interrupción sustancial de la capacidad del sujeto para llevar a cabo las funciones de vida usuales. Esta definición no pretendía incluir experiencias de significación médica relativamente menor o temporal.

Fue una anomalía congénita o defecto de nacimiento esto es, un AE que ocurrió en el niño o feto del sujeto expuesto al fármaco de estudio antes de la concepción o durante el embarazo.

- 10 Fue un evento médico importante que no cumplió con cualesquiera de los criterios anteriores, pero podría poner en peligro al sujeto o requerirse una intervención médica o quirúrgica para evitar uno de los resultados mencionados anteriormente.

Más de uno de los resultados anteriores se puede aplicar a cualquier evento específico.

Buen uso de las medidas

- 15 Las medidas de seguridad en este estudio fueron revisiones físicas de rutina, signos vitales, incidencia y severidad de eventos adversos y procedimientos clínicos y de laboratorio.

Medidas de Concentración de Fármacos

- 20 Se evaluaron las características farmacocinéticas en sangre (plasma) (PK) después de cada dosis del medicamento de estudio. Todos los sujetos permanecieron sentados en una posición recta durante 4 horas posteriores a la dosis. Las muestras de sangre fueron extraídas 30 minutos antes de la dosis y en 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 18.0 y 24.0 horas posteriores a la dosis. Las muestras se recolectaron en tubos K₂-EDTA superiores color púrpura Vacutainer® de 6 mL etiquetados en forma adecuada. Las muestras de sangre se centrifugaron aproximadamente 3000 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. A partir del plasma resultante, se eliminaron exactamente 1 mL de cada muestra
- 25 utilizando una pipeta, y se colocaron en un tubo de alícuota que contiene 0.1% p/v de ditioeritritol. La muestra se tapó herméticamente y se vortizó durante aproximadamente 10 segundos, utilizando el vortizador VWR Mini Vortexer en velocidad 6. Al término de estos pasos, la muestra se enjuagó congelada en un baño de hielo seco/isopropilo y se colocó en un análisis pendiente en congelador a una temperatura de -70°C.

- 30 Se extrajeron aproximadamente 80 mL de sangre durante cada periodo de tratamiento (5 mL por punto de tiempo) para el análisis PK.

Farmacocinética:

Se llevó a cabo el análisis farmacocinético (PK) de los datos de concentración de BH4 en plasma-tiempo, utilizando métodos no divididos en categorías para obtener estimados de los siguientes parámetros PK:

- 35 Concentración en plasma pico (C_{max}) y tiempo para concentración pico (T_{max}) obtenido directamente de los datos sin interpolación;

λ_z , la constante de tasa de eliminación terminal aparente, determinada mediante regresión log-lineal de las concentraciones en plasma terminales.

Área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo a partir del tiempo cero hasta el tiempo de la última concentración medible [AUC(0-t)], calculada por el método trapezoidal lineal;

- 40 La vida media de eliminación aparente ($t_{1/2}$), calculada como $0.693/\lambda_z$;

Área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo a partir del tiempo 0 hasta el infinito [AUC(inf)] en donde $AUC(inf) = AUC(0-t) + C_t/\lambda_z$ y C_t es la última concentración medible.

Estimado de tasa de absorción

A los sujetos se les administró una dosis oral o intravenosa de 10 mg/kg de BH₄, seguido de medidas en serie de concentración de biopterina total en plasma para determina la tasa de absorción de BH₄ desde el tracto gastrointestinal del área bajo la curva de incremento de concentración de biopterina total en plasma (ΔC_p)-tiempo (ΔAUC). Se anticipa que una dosis menor de BH₄ fue requerida cuando se administró en forma intravenosa en comparación con BH₄ administrada en forma oral para lograr el mismo nivel de biodisponibilidad. Por ejemplo, puede requerir 10 mg/kg de BH₄ administrada en forma oral para lograr el mismo nivel de biodisponibilidad de 1 mg/kg BH₄ administrada en forma intravenosa. Debido a que la forma de administración aumentó la biodisponibilidad, puede requerirse únicamente 5 mg/kg de BH₄ para lograr el mismo nivel de biodisponibilidad que 1 mg/kg de dosis IV de BH₄.

- 10 La tasa de absorción BH₄ desde el tracto gastrointestinal fue estimado a partir del área bajo la curva de enfriamiento en concentración de biopterina total en plasma (ΔC_p)-tiempo (ΔAUC) después de la administración de BH₄ utilizando las siguientes fórmulas.

Estimado a partir de AUC

Tasa de absorción (%) =

- 15 $(\Delta AUC \text{ después de dosis p.o.} / \Delta AUC \text{ después de dosis i.v.}) \times (\text{dosis i.v.} / \text{dosis p.o.} \times 100)$

Métodos estadísticos:

- 20 Se llevó a cabo la comparación de los parámetros farmacocinéticos C_{max}, AUC(0-t) y AUC(inf) para BH₄, utilizando un modelo de análisis de varianza (ANOVA) con secuencia, sujeto dentro de la secuencia, tratamiento y periodo como las variables de clasificación utilizando logaritmos naturales de parámetros como las variables dependientes. Las comparaciones de interés fueron entre el comprimido disuelto e intacta en el estado en ayuno y el comprimido intacto en los estados con alimentos y en ayuno.

Los datos de todos los sujetos que terminaron los últimos dos periodos de estudio fueron incluidos en los análisis estadísticos PK. Todos los sujetos que recibieron al menos una dosis de fármaco de estudio fueron incluidos en los análisis de seguridad.

- 25 Todos los análisis PK y análisis estadísticos asociados fueron realizados utilizando SAS[®] de Windows[®] Versión 9.1.3 o una versión mayor.

- 30 Para proporcionar suficiente potencia para cumplir con los objetivos del estudio, se consideró como adecuada un tamaño de muestra de aproximadamente 30 sujetos, cada uno con 3 periodos de tratamiento, para proporcionar estimados de las comparaciones de las diferencias de interés. No se llevó a cabo un cálculo de tamaño de muestra formal.

Resultados

Farmacocinéticas

Comprimidos intactos versus Disueltos

- 35 Las concentraciones medias en plasma de BH₄ fueron inferiores cuando BH₄ administró como un comprimido disuelto en comparación con el comprimido intacto (figuras 23 y 24). El C_{max} promedio fue mayor para el comprimido intacto que los valores promedio para AUC(0-t) y AUC(inf) (figura 25). Las proporciones promedio geométricas, comprimido intacto a disuelto, se encontraron en un rango de 118% a 121% y los límites superiores de los intervalos de confiabilidad del 90% asociados fueron mayores al 125% (figura 26), indicando un incremento estadísticamente significativo en la absorción cuando el comprimido intacto se administra con una diferencia en comidas con alto contenido calórico, alto contenido en grasa en absorción entre la administración de comprimidos disueltos e intactos. La media y el rango para T_{max} fueron esencialmente iguales para los comprimidos disueltos e intactos (figura 25), lo que sugiere que el incremento observado con el comprimido intacto estuvo en el rango de extensión pero no en la tasa de absorción.

Efecto de Alimento con Alto Contenido Calórico y Alto Contenido en grasa en Absorción de Fármaco

- 45 Tal como se esperaba, la administración del comprimido intacto con una comida con alto contenido en grasa, alto contenido calórico estándar dio como resultado un incremento sustancial en las concentraciones BH₄ en plasma promedio (figura 23) y valores promedio para C_{max}, AUC(0-t) y AUC(inf) (figura 25). Las proporciones promedio geométricas (con alimento a ayuno) se encontraron en un rango de 126% a 139% (figura 26) y en

consecuencia, los límites superiores de los intervalos de confiabilidad al 90% asociados fueron mayores al 125%, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa en el efecto de alimento en absorción en comparación con comprimidos intactos. La media y el rango de Tmax fueron esencialmente los mismos bajo condiciones de alimentación y ayuno (figura 25), lo que sugiere que el incremento observado con el alimento estuvo en el rango de extensión pero no en la tasa de absorción.

Seguridad:

No hubo eventos adversos severos (SAEs) en este estudio. Cinco (5) sujetos informaron sobre un total de 9 eventos adversos (AE)s. Ocho (8) de estos 9 AEs fueron evaluados como leves y 1 fue evaluado como moderado en severidad. El AE más común fue dolor de cabeza; 1 sujeto experimentó un dolor de cabeza moderado el cual fue evaluado como no relacionado con el fármaco de estudio, y un sujeto experimentó dolor de cabeza leve en dos ocasiones, ambas de las cuales fueron evaluadas como posiblemente relacionadas. En todos, los cinco eventos fueron juzgados como no relacionados y 4 fueron juzgados como posiblemente relacionados con el fármaco en estudio. Se completaron las evaluaciones de salida del estudio, ECG y evaluaciones de revisión física sin descubrimientos clínicamente significativos.

Conclusiones:

La administración de BH4 como un comprimido intacto dio como resultado aproximadamente el 20% de incremento en el grado de absorción en comparación con un comprimido disuelto.

La administración de BH4 como un comprimido intacto con una comida con alto contenido calórico, alto contenido en grasa y bajo condiciones de alimentación, dio como resultado aproximadamente el 30% de incremento en el grado de absorción en comparación con condiciones en ayuno.

No se identificaron aspectos clínicamente significativos y aspectos de seguridad de parámetros de seguridad en esta población de estudio. No hubieron AEs considerados como severos en este estudio. Entre los 9 AEs reportados, todos menos uno, un caso de dolor de cabeza, fue leve, y se evaluó como no relacionado con el fármaco de estudio. Los casos de fatiga y dolor de cabeza fueron únicamente AEs que estaban posiblemente relacionados con el fármaco de estudio, aunque estos fueron evaluados como leves en severidad.

EJEMPLO 4

Métodos de Formulación para Aumentar la biodisponibilidad de BH4

Se seleccionaron dos formulaciones de control (formulación intravenosa BH4 y comprimido BH4 para solución oral) y seis formulaciones para probar los estudios en animales. Cada prototipo de la formulación contenía 80 mg o 100 mg de BH4.

Formulaciones intravenosas de BH4

La tabla 3 describe la composición de una formulación intravenosa. BH4 pasó a través de un colador de acero inoxidable de malla #20 antes de utilizarse, mientras que el manitol se utilizó conforme se recibió. Esta formulación se llenó como un polvo en una botella y se constituyó con agua estéril para inyección antes de la administración. Cada botella contenía 100 mg de BH4 y 5 g de manitol en una botella de copoliéster de tereftalato de polietileno (PETG) clara, con un cierre superior de rosca de polietileno de alta densidad (HDPE) color blanco. Antes de la administración, la formulación se constituyó con 100 mL de agua estéril para inyección para producir una concentración final de 1 mg/mL. La formulación IV se suministró como un polvo seco en una botella, y cada botella contenía el API y manitol. El polvo se disolvió en agua estéril para inyección y se filtró antes de la administración mediante la vía IV.

Tabla 3 Composición de formulación IV BH4

Ingredientes	% (p/v)	
BH4	0.1	1.0
Manitol (con bajo contenido de endotoxina), USP/Ph.Eur.	5.0	50.0
Agua estéril para inyección	qs 100 mL	qs 1 mL

Comprimido BH4 para solución oral

La tabla 4 describe la composición de una formulación de solución oral. Se colocaron diez (10) comprimidos BH4 (100 mg) en una botella de PETG graduada con 125 mL con un cierre HDPE color blanco. Antes de la administración, la formulación se constituyó con 100 mL de agua estéril para inyección para producir una concentración final de 10 mg/mL.

5 Tabla 4 Composición de comprimido BH4, 100 mg

Ingredientes	% (p/p)	mg/tableta
BH4	33.33	99.99
Acido ascórbico, USP/EP	1.67	5.01
Crospovidona, USP/EP	4.5	13.5
Fosfato Dicalcio Anhidro, USP/EP	2.18	6.54
Manitol (Parteck M 200), UPS/EP	57.06	171.18
Riboflavina universal, USP/EP	0.01	0.03
Fumarato estearilo de sodio (PRUV), NF/EP	1.25	3.75

Prototipo de Formulación para Motilidad Gastrointestinal lenta

10 La tabla 5 describe la composición de un prototipo de tiempo de vaciado gástrico recargado. BH4 pasó a través de un colador de acero inoxidable de malla #20 antes de utilizarse. El GMO-50 fue fundido en un baño de agua a una temperatura de 37°C. Se pesaron BH4 y ácido ascórbico y se agregaron lentamente al Capmul de residuo mientras se agitó en forma vigorosa. Se agregó la dispersión sólida en forma de gotas en una cápsula tamaño #2 utilizando una pipeta. Se colocaron tres cápsulas llenas en una botella polietileno de alta densidad (HDPE) de 100 cc con un cierre hermético de inducción por calor.

Tabla 5 Composición de Formulación de Cápsula Oral de Tiempo de Vaciado Gástrico Retrasado de BH4

Ingredientes	% (p/p)	mg/tableta
BH4	25	80
Gliceril mono/di-oleato (Capmul GMO-50)	65	208
Polvo fino de ácido ascórbico	10	32
Total	100	320

15 Prototipo de bioadhesivo

20 La tabla 6 describe la composición de un prototipo de bioadhesivo. Todos los materiales, excepto Carbopol 71G, fueron pasados a través de un colador de acero inoxidable de malla #20. Todos los materiales se pesaron y agregaron a una bolsa de plástico que tiene un cierre de cremallera, la cual posteriormente se agitó durante algunos minutos hasta que la mezcla pareció uniforme. El polvo se comprimó en un comprimido utilizando una herramienta B orientada hacia el plano, cóncava, redonda, estándar de ¼ de pulgada (0.635 cms) en una prensa manual Globe Pharma MTMC-1 en 600 psi. Se empaquetaron tres comprimidos a lo largo de una bolsa de disecante de gel de sílice en HDPE de 100 cc con un cierre hermético de inyección mediante calor.

25 Tabla 6 Composición de Formulación de Comprimido Oral de bioadhesivo

Ingredientes	% (p/p)	mg/tableta
BH4	48.5	80.00
Carbopol 71 G	20.0	32.99
Policarbofil (Noveon AA1)	20.0	32.99
Polvo fino de ácido ascórbico	10.0	16.49
Fumarato de estearilo de sodio (PRUV)	1.5	2.47
Total	100.0	164.94

Prototipo Liberación Sostenida

30 La tabla 7 describe la composición de un prototipo de liberación sostenido probado en monos. Todos los materiales, excepto Methocel K100M Premium CR, pasaron a través de un colador de acero inoxidable de malla #20. Todos los materiales fueron pesados y agregados a una bolsa de plástico que tiene un cierre de cremallera, la cual posteriormente se agitó durante unos cuantos minutos hasta que la mezcla pareció

uniforme. El polvo se comprimió en un comprimido utilizando una herramienta B orientada hacia el plano, cóncava, redonda, estándar de ¼ de pulgada (0.635 cms) en una prensa manual Globe Pharma MTMC-1 en 1200 psi. Los comprimidos junto con la lata de disecante de gel de sílice fueron empaquetadas en una botella HDPE 100 con un cierre hermético de inducción por calor.

5 Tabla 7 Composición de Formulación de Comprimido de Liberación Sostenida de BH4

Ingredientes	% (p/p)	mg/tableta
BH4	53.5	80.00
Methocel K100M Premium CR	35.0	52.34
Polvo fino de ácido ascórbico	10.0	14.95
Fumarato de estearilo de sodio (PRUV)	1.5	2.24
Total	100.0	149.53

Prototipo de Polímero Donante de Protones

10 La tabla 8 describe la composición de un prototipo de polímero donante de protones probado en monos. Todos los materiales, excepto Eudragit L100-55 y Kollidon CL, fueron colados previamente utilizando un colador de acero inoxidable de malla #20. Todos los materiales fueron pesados y agregados a una bolsa de plástico que tiene un cierre de cremallera, el cual posteriormente se agitó durante unos cuantos minutos hasta que la mezcla pareció uniforme. La cantidad pesada previamente de polvo se llenó en una cápsula #2.

15 Se preparó una solución de recubrimiento disolviendo Eudragit L100-55 y Carbowax PEG 4600 en alcohol etílico. El Eudragit L100-55 y Carbowax PEG 4600 se pesaron y se agregaron a 125 mL de una botella de copoliéster de tereftalato de polietileno graduada (PETG). El alcohol etílico fue agregado a la botella de PETG y se colocó en un baño de agua a una temperatura de 40°C con sonicado hasta que la solución se aclaró.

20 Las cápsulas llenas con polvo fueron bañadas en forma manual en una solución de recubrimiento y se dejaron secar a una temperatura de 40°C durante 20 minutos. Las cápsulas secas fueron pesadas y posteriormente enrolladas en Syloid FP244 para eliminar el pegosteo residual. Se empaquetaron tres cápsulas en una botella de HDPE de 100 cc con un cierre de sello de inducción con calor.

Tabla 8 Composición de Formulación de Cápsula Donante de Protones de BH4

Ingredientes	% (p/p)	mg/cápsula
Composición de cápsula		
BH4	40.0	80
Eudragit L100-55	44.5	89
Crospovidona (Kollidon CL)	4.0	8
Polvo fino de ácido ascórbico	10.0	20
Fumarato de estearilo de sodio (PRUV)	1.5	3
Total	100.0	200
Ingredientes	% (p/p)	mg/cápsula ¹
Composición de recubrimiento de cápsula		
Eudragit L100-55	5.0	ND
Polietilen glicol 4600 (Carbowax Sentry)	5.0	ND
Alcohol etílico, 200 proof	100 mL	ND
¹ Después del recubrimiento y secado de la cápsula en un horno a una temperatura de 40°C, la cápsula gana del 1 al 3% de peso en el recubrimiento de polímero.		
ND = No Determinado		

Sistema de Administración de Flotación

25 La tabla 9 describe la composición de un sistema de administración flotante. Todos los materiales, excepto Eudragit L100-55, pasaron a través de un colador de acero inoxidable de malla #20. Este prototipo de comprimido comprende tres capas; la capa media que contiene la sustancia de fármaco, la cual fue colocada entre dos capas externas insolubles en agua. Los materiales internos y externos fueron pesados y agregados por separado a bolsas de plástico que tienen cierres de cremallera, los cuales posteriormente fueron agitados hasta que las mezclas parecieran uniformes.

Las dos capas externas (12 mg cada una) y la capa interna (14.5 mg) fueron pesadas. Una de las capas externas se agregó a la prensa, seguido de la capa interna, y posteriormente la última capa externa. Las capas fueron comprimidas en un comprimido utilizando una herramienta B orientada hacia el plano, cóncava, redonda, estándar de 3/16 de pulgada (0.474 cms.) en una prensa manual Globe Pharma MTMC-1 en 200 psi.

Se preparó una solución de recubrimiento disolviendo Ethocel y PEG 4600 en alcohol etílico y una mezcla de agua purificada. Los ingredientes fueron agregados a una botella PETG, la cual se mezcló y colocó en un baño de agua a una temperatura de 40°C con sonicado hasta que la solución se aclaró.

Los comprimidos se bañaron en forma manual en la solución de recubrimiento y se dejaron secar durante 20 minutos a una temperatura de 40°C. Cada comprimido se volvió a pesar después del recubrimiento. Se colocaron siete (7) comprimidos en cada una de las cápsulas alargadas tamaño #2. Se empaquetaron tres cápsulas en una botella de HDPE de 100 cc con un cierre sellado herméticamente de inducción por calor.

Tabla 9 Composición de Formulación de Dosificación Flotante BH4

Ingredientes	% (p/p)	mg/tableta
Capas externas 1 y 3		
Eudragit L100-55	49.5	5.94
Acido esteárico	49.5	5.94
Fumarato estearilo de sodio (PRUV)	1.0	0.12
Total	100.0	12.00
Ingredientes	% (p/p)	mg/tableta
Capa media 2		
BH4	79.0	11.46
Acido esteárico	10.0	1.45
Polvo fino de ácido ascórbico	10.0	1.45
Fumarato de fenilo de sodio	1.0	0.15
Total	100.0	14.51
Ingredientes	% (p/p)	mg/cápsula
7 tabletas en una cápsula		
BH4	29.8	80.19
Acido esteárico	34.6	93.31
Polvo fino de ácido ascórbico	3.8	10.15
Eudragit L100-55	30.8	83.16
Fumarato estearilo de sodio (PRUV)	1.0	2.70
Total	100.0	269.51
Ingredientes	% (p/p)	mg/cápsula ¹
Solución de recubrimiento de tableta		
Ethocel Standard 10 FP	5.0	ND
Carbowax PEG 4600	5.0	ND
Etanol 200 proof	95.0 mL	ND
Agua purificada	5.0 mL	ND
¹ Después de recubrimiento y secado de la cápsula en el horno a una temperatura de 40°C, la cápsula gana del 3 al 8% en peso en el recubrimiento de polímero.		
ND = No Determinado.		

Sistema de Administración de Flotación de Generación de Gas

La tabla 10 describe la composición de un sistema de administración de flotación de generación de gas. Esta formulación estuvo compuesta de un comprimido central que contiene la sustancia de fármaco rodeada por una capa externa de generación de gas. Todos los materiales, excepto el bicarbonato de sodio y Methocel K100M CR, fueron clasificados previamente utilizando un colador de acero inoxidable de malla #20. Los materiales del centro interno y la capa externa fueron pesados y agregados por separado a bolsas de plástico que tienen cierres de cremallera, las cuales se cerraron y se agitaron hasta que la mezcla pareció uniforme. El polvo combinado para el centro interno (35 mg) fue comprimido en un comprimido utilizando una herramienta B orientada hacia el plano, cóncava, redonda, estándar de 1/18 de pulgada (0.14 cms) en una prensa manual Globe Pharma MTMC-1 en 800 psi.

Se preparó una solución de recubrimiento disolviendo Ethocel y PEG 4600 en alcohol etílico. Los comprimidos central interno se bañaron en forma manual en la solución de recubrimiento y se dejaron secar durante 20 minutos a una temperatura de 40°C. El polvo combinado de la capa externa (40 mg) fue pesado. La mitad se agregó a la prensa, seguido del comprimido central interno, y posteriormente la segunda mitad de la capa externa. El comprimido se comprimió utilizando una herramienta B orientada hacia el plano, cóncava, redonda, estándar de 3/16 de pulgada (0.474 cms) en una prensa manual Globe Pharma MTMC-1 en 800 psi. Se colocaron cuatro (4) comprimidos en cada cápsula de tamaño #2.

Tabla 10 Composición de Formulación de Dosificación Flotante de Generación de Gas de BH4

Ingredientes	% (p/p)	mg/tableta
Centro de tableta interna		
BH4	58.3	20.39
Polvo fino de ácido ascórbico	19.4	6.80
HPMC K100MCR	19.4	6.80
Fumarato estearilo de sodio (PRUV)	2.9	1.02
Total	100	35.01
Ingredientes	% (p/p)	mg/tableta
Capa de tableta externa		
HPMC K100MCR	46.1	18.46
Acido cítrico anhidro	34.2	13.68
Bicarbonato de sodio	17.1	6.84
Fumarato estearilo de sodio	2.6	1.03
Ingredientes	% (p/p)	mg/cápsula
4 tabletas en una cápsula		
BH4	27.2	81.55
Polvo fino de ácido ascórbico	9.1	27.18
HPMC K100MCR	33.7	101.03
Acido cítrico anhidro	18.2	54.70
Bicarbonato de sodio	9.1	27.35
Fumarato estearilo de sodio	2.7	8.18
Total	100	299.99
Ingredientes	% (p/p)	mg/cápsula ¹
Solución de recubrimiento		
¹ Después del recubrimiento secado de la cápsula en el horno a una temperatura de 40°C, la cápsula gana peso en el recubrimiento de polímero. ND = No determinado		

10 Prototipo del Gránulo de Bioadhesivo

La tabla 11 describe la composición de un prototipo de gránulo de bioadhesivo. Todos los materiales, excepto Methocel K100M CR, fueron colados previamente utilizando un colador de acero inoxidable de malla #20. Todos los materiales, excepto el fumarato de estearilo de sodio (PRUV), fueron pesados y colocados en un tazón de granulador tamaño #1 (LB Bohle Mini Granulator BMG). El polvo se mezcló a una velocidad de impulsor de 300 rpm y a una velocidad de tajador de 2500 rpm durante cinco minutos hasta que la mezcla pareció uniforme. Manteniendo las velocidades del propulsor y del dispositivo de corte, se agregaron en forma de gotas 5 mL de alcohol etílico a la mezcla hasta que se formaron gránulos. La masa húmeda se eliminó del tazón de granulación y se clasificó a través de un colador de acero inoxidable malla 18. Los gránulos fueron recolectados y colocados en un horno a una temperatura de 40°C para secar durante una hora. La pérdida en el secado de los gránulos, fue determinada del 1.93% después de una hora de secado. Los gránulos fueron pesados y colocados en una bolsa de plástico que tiene un cierre de cremallera. Se agregó fumarato estearilo de sodio (PRUV) a los gránulos secos en la bolsa. La bolsa se cerró y se agitó hasta que el fumarato estearilo de sodio (PRUV) apareció distribuido de manera uniforme entre los gránulos. Los gránulos se pesaron (134 mg). Se llenaron las cápsulas elongadas tamaño 2 con porciones de los gránulos alternando con gotas de aceite vegetal parcialmente hidrogenado (350 µL). Se empaquetaron tres cápsulas en una botella HDPE de 100 cc con un cierre sellado herméticamente de inducción por calor.

Tabla 11 Composición de Formulación de Cápsula de Gránulo de Bioadhesivo de BH4

Ingredientes	% (p/p)	mg/cápsula
BH4	60	80.00
Methocel K100M CR	19	25.33
Carbopol 971	10	13.33
Polvo fino de ácido ascórbico	10	13.33
Fumarato estearilo de sodio (PRUV)	1	1.33
Aceite Pureco HSC-1		350 µL
Total	100	133.33

Liberación de Fármaco In Vitro

Se llevaron a cabo las pruebas de liberación de fármaco in vitro en comprimidos de acuerdo con las especificaciones del aparato II USP 27 utilizando el Probador de Disolución Distek 2100C (Distek, Inc., North Brunswick, NJ), junto con un sistema de espectroscopía visible-UV Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). El medio de disolución utilizado para las pruebas de liberación de BH4 fue de 900 mL de 0.1N HCl. Durante las pruebas de disolución, el medio en cada envase se mantuvo a una temperatura de $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y se agitó en 50 rpm. Un volumen de muestra de 5 mL fue tomado en puntos de tiempo determinados previamente. Para determinar la concentración de BH4 en las muestras, 250 µL de cada muestra fue diluida con 500 µL de 0.1N HCl y la absorción fue medida en 265 nm utilizando el espectrómetro UV (8453 UV-Visible Spectrophotometer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Los datos se recolectaron utilizando un software ChemStation (Rev. A.09.01 [76], Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Todas las pruebas de disolución se llevaron a cabo por triplicado.

Prueba de Flotabilidad de Comprimido

La flotabilidad de los comprimidos prototipo de flotación, fue determinada primero colocando los comprimidos en tazones de plástico con 25-50 mL de 0.1N HCl. Esta prueba determinó el tiempo necesario para que los comprimidos floten, así como la duración de su flotación sin agitación. Los prototipos que flotaron durante al menos cuatro horas, fueron presentados para pruebas de disolución. Durante las pruebas de disolución, se determinó la flotabilidad de los comprimidos utilizando el método de remo en una velocidad de rotación de 50 rpm. El estado de los comprimidos se revisó visualmente en diversos puntos de tiempo.

Pruebas de Desintegración

Se llevaron a cabo pruebas de desintegración de acuerdo con las especificaciones de la prueba de desintegración USP-27 utilizando un probador de desintegración Distek 3100 Series (Distek Inc., North Brunswick, NJ). Los medios de desintegración utilizados fueron 900 mL de 0.1N HCl o 900 mL de 0.2M de fosfato de potasio, pH 5.8. Durante las pruebas de desintegración, el medio en los envases se mantuvo a una temperatura de $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Los comprimidos y cápsulas se inspeccionaron en forma visual para desintegración.

Pruebas de Dureza de Comprimido

Se determinó la dureza del comprimido utilizando un Probador de Dureza de Comprimido Dr. Schleuniger Pharmatron 8M (Dr. Schleuniger® Pharmatron Inc., Manchester, NH). Los comprimidos se colocaron en la mandíbula de probador de dureza, y la dureza se midió en kiloponds (Kp).

Grosor de Comprimido

Los grosores de los comprimidos se midieron utilizando el indicador Mitutoyo Digimatic (Mitutoyo Absolute, Dr. Schleuniger Pharmatron Inc., Manchester, NH). Los comprimidos se colocaron bajo el calibrador de grosor y el valor indicado fue registrado en milímetros (mm).

Resultados y Discusión

Se desarrollaron diversos prototipos en base a tres conceptos: gastrorretención, polímero donante de protones para cambiar pH intestinal y formas de dosificación de liberación sostenida. Las secciones que se encuentran más adelante, describen el desarrollo de la formulación de cada prototipo.

Formulación intravenosa BH4 - Después de la constitución con agua estéril, la solución resultante fue isotónica, pH 3.2 y contuvo 1 mg/mL de BH4, y fue adecuada para administración intravenosa después de filtración estéril a través de un filtro de 0.22 micras. Se analizó la estabilidad de la solución 1 mg/mL almacenada a temperatura ambiente mediante HPLC cada hora durante tres horas. Posteriormente se almacenaron las muestras de la solución añejada a una temperatura de -20°C y se analizaron mediante HP LC después de 2 semanas. La figura 27 indica que la solución fue estable a temperatura ambiente durante al menos 3 horas después de la constitución, fue estable durante al menos 2 semanas durante el almacenamiento a una temperatura de -20°C.

Comprimido BH4 para Solución Oral

Cada botella fue empaquetada para contener diez (10) comprimidos BH4, 100 mg. Se agregaron a los contenidos de cada botella cien (100) mL de agua purificada o agua estéril para inyección. Después de agitación vigorosa de la botella, los comprimidos se desintegraron rápidamente en 5 minutos. La solución resultante contenía 10 mg/mL de BH4 para administración oral. No todos los ingredientes en el comprimido fueron solubles, y aunque la solución final pareció nebulosa o traslúcida, el ingrediente farmacéutico activo fue completamente disuelto y los particulados finos fueron ingredientes inactivos deficientemente solubles.

Prototipo de Formulación para Disminuir la Motilidad Gastrointestinal

Esta formulación en cápsula comprendió BH4 y ácido ascórbico disperso en un derivado de ácido graso semisólido (mono/di-oleato de glicerilo, punto de fusión 86°F (30°C)). El mono/di-oleato de glicerilo (GMO) también se seleccionó debido a que GMO es químicamente compatible con BH4. El perfil de disolución ilustrado en la figura 28 mostró que aproximadamente el 90% del fármaco fue liberado en 2 horas, y el perfil de disolución permaneció sin cambio después de que las cápsulas se almacenaron a una temperatura de 40°C durante 57 días.

La dispersión del fármaco en GMO fundido, un semi-sólido, se llenó manualmente en cápsulas de gelatina dura. La densidad del semi-sólido es mayor a 1 g/mL, y fue posible llenar al menos una dosis de 80 mg en 25% de carga de fármaco en una cápsula de tamaño #2. Se espera que un tamaño de cápsula #0 deba tener la capacidad de contener al menos 200 mg de fármaco utilizando la misma formulación. La filtración de ácido graso de la cápsula fue observada durante el almacenamiento de 40°C. Preferentemente, las formulaciones de cápsula o de cápsula de gel suave serán agrupadas para evitar filtración del ácido graso durante el almacenamiento.

Prototipo de Bioadhesivo

Muchos de los bioadhesivos se elaboran en polímeros ya sea sintéticos o naturales. La mayoría de los polímeros de bioadhesivo sintéticos actuales con ya sea ácidos poliacrílicos o derivados de celulosa. Los ejemplos de polímeros a base de ácido poliacrílico incluyen pero no se limitan a carbopol, policarbofil, ácido poliacrílico (PAAc), etc. Las celulósicas se incluyen pero no se limitan a hidroxipropil celulosa e hidroxipropilmetil celulosa (HPMC). Se desarrollaron dos prototipos de bioadhesivo para probarse en estudios con animales. El primer prototipo fue una formulación de comprimido de bioadhesivo y el segundo, una cápsula que contiene gránulos de bioadhesivo.

Se seleccionó el policarbofil y los polímeros de carbómero para el desarrollo del primer prototipo de comprimido de bioadhesivo. Carbopol 71 G es una forma granular de carbómero y tiene buenas propiedades de flujo de polvo. Todos los lotes de los comprimidos fabricada tuvieron buena calidad con un contenido de fármaco aceptable (evidente a través de la cercanía al 100% de liberación de fármaco en perfiles de disolución) y dureza aceptable. La tabla 12 describe el tamaño, grosor y dureza de comprimido representativo del prototipo de bioadhesivo que contiene carbómero y policarbofil.

Tabla 12 Peso, Grosor y Dureza de Comprimido Representativos para Prototipo de Bioadhesivo que contiene Carbómero y Policarbofil

Número de Lote de Tableta	Presión de Compresión (psi)	Peso (mg)	Grosor (mm)	Dureza (Kp)
11210-83	600	165.4	5.24	10.5
11229-4	600	166.7	5.64	10.3
11229-4	800	164.1	5.27	14.4
11229-4	1000	164.9	5.12	18

El HPMC y los polímeros de carbómero fueron utilizados para el desarrollo de los segundos gránulos de bioadhesivo. HPMC se seleccionó debido a que se utilizó como un sistema hidrocoloidal de baja densidad y

se controló la liberación de fármaco independiente del pH. Los gránulos fueron seleccionados sobre los comprimidos para incrementar la oportunidad de bioadhesión, incrementando el área de superficie de la forma de dosificación. Para facilitar la separación de la cápsula llena de gránulos en el medio de disolución, los gránulos fueron recubiertos parcialmente con aceite hidrogenado. Sin el recubrimiento de aceite, los gránulos fueron hidratados y formaron una matriz en forma de cápsula sin desintegrarse en gránulos individuales.

Los perfiles de liberación de los dos prototipos de bioadhesivo (comprimido y gránulo) se muestran en la figura 29, la cual muestra que el perfil de liberación del comprimido fue más largo que el de los gránulos. La liberación de fármaco fue de aproximadamente 90% en cuatro horas y 95% en una hora para las formas de dosificación de bioadhesivo de comprimido y gránulos, respectivamente. Al momento del almacenamiento a una temperatura de 40°C y en humedad ambiental durante un mes sin protección de humedad (sin sello de inducción con calor) el prototipo de comprimido mostró una disminución en la disolución de fármaco (figura 29). Para prototipos que contienen carbómero, se debe tener precaución en la protección contra humedad, para proteger al comprimido de la posible hidratación prematura.

Prototipo de Liberación Sostenido

Se utilizó hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) como un vehículo hidrofílico para la preparación de sistemas de administración de fármacos controlados orales (Colombo, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1993, 11, 37). Las matrices HPMC son conocidas por controlar la liberación de una variedad de fármacos (Chattaraj, et al., *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 1996, 22, 555; Pabon, et al., *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 1992, 18, 2163; Lee, et al., *Drug Develop. Ind. Pharm.*, 1999, 25, 493; Basak, et al., *Indian J. Pharm. Sci.*, 2004, 66, 827; Rajabi-Siabhooni, et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 1062). Se evaluaron en este estudio diversos grados de viscosidad de HPMC (K4M, K15M y K100 M) para controlar la liberación de BH4. Los perfiles de disolución de los comprimidos elaborados con diversos grados de HPMC se muestran en la figura 30. Los perfiles de liberación de fármaco fueron similares en 20% de HPMC sin importar el grado de viscosidad; aproximadamente el 80% del fármaco fue liberado en 2 horas. Cuando el polímero HPMC se expuso a un medio acuoso, pasó por hidratación rápida y relajación de cadena para formar la capa de gel (Naruhashi, et al., *Pharm Res.* 2003,19:1415-1421). El HPMC al 20% puede no formar una capa de barrera de gel sustancial para disminuir significativamente la liberación de BH4.

Los perfiles de disolución de los comprimidos producidos con diversas concentraciones (20% a 40%) de un alto grado de viscosidad de HPMC (Methocel K100M CR) se presentan en la figura 30. Un comprimido que contiene 35% a 40% de Methocel K100M encontró que disminuye la liberación de fármaco durante hasta cuatro horas, en tanto que 20% de HPMC liberó fármacos en dos horas (figura 31). Se seleccionó un comprimido que contiene 35% de HPMC (Methocel K100M) como el prototipo para probarse en estudios de animales debido a que contiene la menor cantidad de HPMC requerida para disminuir la liberación de fármaco durante hasta cuatro horas. Por lo tanto, los comprimidos tuvieron buena calidad con un contenido de fármaco aceptable tal como es evidente por la cercanía al 100% de liberación de fármaco en perfiles de disolución.

Prototipo de Polímero de Donante de Protones

Para incrementar la absorción oral de BH4, un método es para estabilizar el fármaco disminuyendo el pH del intestino delgado próximo. Para manipular el pH luminal intestinal, se seleccionó Eudragit L100-55, un polímero de liberación de protones comúnmente utilizado para recubrimiento entérico. Este polímero no es soluble bajo condiciones ácidas, y se vuelve soluble y libera protones bajo condiciones débilmente ácidas (pH > 5.5) a alcalinas debido a sus grupos carboxilo, que controlan de esta forma el pH de luminal intestinal para ser ácido. Naruhashi, et al., (2003) descubrió que el pH en el lumen disminuyó en una forma dependiente de la concentración de Eudragit L100-55 y la absorción de cefadroxil y cefixima del asa ileal fue incrementada en la presencia del polímero ácido (Nozawa, et al., *J. Pharm Sci* 2003, 92 (11), 2208-2216). Nozawa, et al. (2003) mostró que Eudragit disminuyó el pH en las asas intestinales, e incrementó la desaparición tanto de cefadroxil como de cefixima de las asas.

Las formulaciones en polvo que contienen BH4 y Eudragit L100-55 tal como se muestra en la tabla 8, fueron comprimidas en comprimidos y llenadas en cápsulas. La formulación de comprimido liberó aproximadamente 27% de fármaco en una hora en fluido gástrico simulado (SGF) durante las pruebas de disolución. Sin embargo, durante las pruebas de desintegración, el comprimido permaneció intacta en SGF y en un tampón de fosfato con pH de 5.8 (PB) durante al menos 2 horas. Incluso en la presencia de un super desintegrante (crospovidona o croscarmelosa), el comprimido falló en la desintegración. Es posible que el fármaco pueda acidificar el Eudragit, creando un micro ambiente de pH bajo, de modo que el polímero permanezca no ionizado e insoluble.

La formulación de fármacos-Eudragit de cápsula llena con polvo se desintegró rápidamente en SGF. Para dirigir la liberación de protones en el intestino próximo, se aplicó a la cápsula un requerimiento entérico. Después del recubrimiento y secado de la cápsula en el horno a una temperatura de 40°C, la cápsula ganó

aproximadamente 1 a 3% de peso en el recubrimiento de polímero. Cuando se probó utilizando el aparato de disolución USP II (remo), el medio de disolución 0.1 N HCl mantenido a una temperatura de 37°C a una velocidad de rotación de 50 rpm, la cápsula recubierta liberó aproximadamente el 25% de fármaco en una hora. Después de 1 hora de tratamiento previo con ácido (0.1 N HCl), la cápsula recubierta fue colocada en un aparato de desintegración USP con 500 mL de tampón de fosfato con pH 5.8 mantenido a una temperatura de 37°C, la cápsula recubierta desintegrada se desintegró en 1 hora. El prototipo de cápsula con recubrimiento entérico fue seleccionado para el comprimido o la cápsula no recubierta, debido a que la cápsula con recubrimiento entérico es más probable que suministre un polímero de liberación de protones al sitio diana.

Sistema de Administración Flotante

Se desarrollaron dos sistemas de administración flotante. El primer prototipo fue una forma de dosificación de unidad múltiple flotante; el propósito de esta forma de dosificación fue incrementar la oportunidad de que una de las unidades permaneciera en la región gástrica y por lo tanto prologara el tiempo de residencia gástrico de los fármacos. Esta forma de dosificación consistió en siete comprimidos de capa triple en una cápsula; la capa media contuvo la sustancia la cual fue emparedada entre dos capas externas insolubles en agua (figura 32). Las capas externas contuvieron ácido esteárico, ácido graso insoluble en agua e hidrofóbico, el cual proporcionó la flotabilidad necesaria al comprimido flotante. Cada comprimido fue recubierto en forma manual con una solución de alcohol de etilcelulosa y polietilén glicol MW 4600 (PEG). La etilcelulosa formó una película insoluble en agua alrededor del comprimido y PEG, la cual actuó como un primer poro, que moduló el rango de liberación. Los perfiles de disolución de los comprimidos recubiertos con etilcelulosa y diversas concentraciones (20% a 40%) de soluciones PEG, se presentan en la figura 33. Se debe observar que el comprimido de capa triple recubierto logró cinéticas de liberación casi del orden de cero. Tal como se espera, el rango de disolución de fármaco incrementó conforme incrementó la concentración de PEG. Los comprimidos flotaron en un medio gástrico simulado durante al menos cuatro horas durante los estudios de disolución. La tabla 9 muestra la composición de la formulación probada en estudios de animales.

El segundo prototipo fue una forma de dosificación de generación de gas. Se formuló de tal forma que cuando estuvo en contacto con contenidos gástricos ácidos, el dióxido de carbono fue liberado y quedó atrapado en los hidrocoloides expandidos, lo cual proporcionó flotabilidad a la forma de dosificación (figura 33). Esta formulación flotó en un medio gástrico simulado durante al menos cuatro horas durante los estudios de disolución. Sin embargo, para que dicho sistema trabaje consistentemente, los comprimidos tienen que ser producidas en un ambiente de baja humedad para evitar la reacción prematura del ácido y la base. Esto puede ser la interacción potencial entre BH4 y bicarbonato de sodio en el comprimido durante el almacenamiento. Por estas razones, esta forma de dosificación no fue probada en estudios con animales.

Se desarrollaron para estudios de biodisponibilidad en animales, seis formulaciones de prueba prototipo que incorporaron diversos métodos de formulación, incluyendo polímero donante de protones para disminuir el pH intestinal, formas de dosificación gastroretentivas y formulaciones de liberación sostenida.

EJEMPLO 5

Biodisponibilidad de Formulaciones BH4 Novedosas

El objetivo de este estudio fue aumentar la absorción de BH4, desarrollando formas de dosificación que incrementan el tiempo de residencia del fármaco en el tracto gastrointestinal (GI).

Métodos: Se utilizaron tres monos cinomolgos sanos que pesan de 3 a 4 kg en un estudio abierto, no cruzado de 8 periodos para determinar la biodisponibilidad de siete formulaciones en comparación con una formulación BH4 disuelta de control. Después de un ayuno durante la noche, los monos recibieron, en ocasiones separadas, una dosis simple de 80 mg de la misma formulación novedosa en forma oral o intravenosa con un intervalo de al menos un periodo de lavado de una semana entre las diversas formulaciones estudiadas novedosas. Para administración intravenosa, se recolectaron muestras de sangre antes de la dosificación y posteriormente 5, 15 y 30 minutos y 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12 y 24 horas después de la dosis. Para administración oral, se tomaron muestras de sangre antes de la dosificación y posteriormente a los 15 y 30 minutos y 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12, y 24 horas después de cada dosis. Después de la separación del plasma mediante centrifugación, se transfirieron rápidamente alícuotas de 200 µL de cada muestra en tubos individuales que contienen 0.1% DTE y se congelaron a una temperatura de -70°C hasta que estuvieran listas para ensayarse para L-biopterina.

Formulaciones de Estudio: Las formulaciones administradas se encuentran en la tabla 13. Tres de las formulaciones fueron diseñadas en forma conceptual para ser gastroretentivas mediante mecanismos de bioadhesión o flotación para incrementar el tiempo de residencia GI (gránulo de flotación de multiparticulado, base de carbómero y gránulos de bioadhesivo). Otros conceptos estuvieron basados en la disminución de la

motilidad GI para incrementar el tiempo de residencia de la formulación (monooleato de glicerilo) reduciendo el pH del intestino delgado y de esta forma aumentando la estabilidad química de BH4 para permitir la absorción del fármaco intacto (bomba de protones) o formulación de administración sostenido para confirmar si aumentará la absorción.

5

Tabla 13

Fase	Prototipo	Forma de dosificación	Concepto	Ingredientes
Fase I	Formulación IV	Solución IV, 1 mg/mL	Control	BH4, D(-)-Manitol
Fase II	Tabletas Kuvan para solución	Solución oral, 10 mg/mL	Control	Tabletas BH4 fabricadas por Lyne (Lot# 140651)
Fase III	Mono Oleato de Glicerol	Cápsula, 80 mg	Disminución motilidad GI	BH4, Capmul GMO-50, Acido ascórbico
Fase IV	Prototipo de Carbómero	Tableta, 80 mg	Gastroretentivas, Bioadhesivo	BH4, Carbopol 71G Noveon AA1, Acido Ascórbico, PRUV
Fase V	Prototipo de HPMC	Tableta, 80 mg	Liberación Sostenida	BH4, Methocel K100M Premium CR, Acido Ascórbico, PRUV
Fase VI	Prototipo de Eudragit	Cápsula, 80 mg	Ph de polímero donante de protones para disminuir GI	BH4, Eudragit L100-55, Acido Ascórbico, Kollidon CL, PRUV, Recubrimiento (Eudragit L100-55, Carbowax PEG 4600, Alcohol Etilico 200 proof)
Fase VII	Unidades de flotación múltiple	Tabletas múltiples en cápsula, 80 mg	Gastroretentiva, flotación	Capa interna (BH4, Acido Ascórbico, Acido Esteárico, PRUV), Capa Externa (Acido Esteárico, Eudragit L100-55, PRUV), Recubrimiento (Ethocel Standard 10FP, Carbowax PEG 4600, 95% Etanol)
Fase VIII	Gránulos de bioadhesivo	Gránulos en cápsula, 80 mg	Gastroretentiva, bioadhesivo	Intergranular (BH4, Methocel K100M Premium CR, Carbopol 971, Acido Ascórbico), Extragranular (PRUV, aceite Pureco HSC-1)

Ensayo de Plasma para Biopterina: Se determinaron las concentraciones BH4 en plasma utilizando un método LC/MS/MS de fase inversa, específico, validado. La curva estándar fue lineal en el rango de concentración de 50 ng/mL a 2500 ng/mL. El límite inferior de cuantificación para L-biopterina fue de 50 ng/mL con precisión intradía mostrada por coeficientes de variación menores al 5%. L-biopterina es estable en plasma de mono congelado estabilizado con 0.1% DTE a una temperatura de -70°C hasta que se ensayó. Se calcularon la concentración BH4 a partir de las concentraciones de L-biopterina determinadas.

10

Farmacocinéticas y Análisis Estadístico: Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados mediante BH4 en plasma después de la administración de formulaciones orales e intravenosas. Los parámetros farmacocinéticos se proporcionan en la tabla 14.

15

Tabla 14

Fase, Formulación	AUC _{último} (ng-hr/mL)	AUC _∞ (ng-hr/mL)	C _{max} (ng/mL)	C _{último} ^a (ng/mL)	T _{max} (hr)	T _{1/2} (hr)
2, tableta disuelta	641 (88)	805 (36)	93.6 (31.3)	9.60 (2.20)	2.33 (0.58)	11.7 (2.1)
3, mono-oleato de glicerilo	716 (154)	858 (317)	133 (83)	6.47 (3.60)	2.00 (0)	12.1 (10.3)
4, polímero de adhesivo	593 (50.6)	648 (114)	108 (15)	4.46 (3.36)	2.67 (0.58)	6.89 (3.51)
5, liberación sostenida	355 (134)	472 (36)	86.0 (43.1)	12.9 (12.4)	3.33 (0.58)	5.30 (1.73)
6, donante de protones	276 (49.8)	282 (49)	68.3 (25.3)	2.97 (0.71)	3.33 (0.58)	1.59 (0.74)
7, forma de dosificación flotante	304 (78)	b	59.9 (31.8)	5.90 (0.94)	4.00 (2.00)	b
8, granulaciones de bioadhesivo	292 (79)	366 (40.6)	42.5 (12.6)	5.11 (2.43)	3.0 (0)	15.3 (8.2)

Resultados

El objetivo de este estudio puede identificar formulaciones que aumentan la biodisponibilidad de BH4 en comparación con la formulación de comprimido disuelto de control. Los perfiles de concentración BH4 en

20

plasma-tiempo promedio para las diversas formas de dosificación y formulación de control después de la administración oral de BH4 se muestran en la figura 35, y los parámetros farmacocinéticos BH4 derivados de los perfiles de concentración de fármaco en plasma-tiempo se proporcionan en la tabla 14. La formulación de control (fase 2) es el comprimido disuelto.

- 5 Tal como se muestra en la figura 35, la formulación de mono-oleato de glicerilo proporcionó el AUC_{último} más alto y AUC_∞ los cuales son de 716 ng-hr/mL y 858 ng-hr/mL, respectivamente. La formulación de comprimido BH4 disuelta de control mostró AUC_{último} y AUC_∞ los cuales son 641 ng-hr/mL y 805 ng-hr/mL respectivamente (tabla 14). El orden de clasificación de las formulaciones a partir de la más disponible a la menos disponibles es de mono-oleato de glicerilo > comprimido disuelto > comprimido de polímero de bioadhesivo > comprimido de liberación sostenida > forma de dosificación de flotación > producto de cápsula de granulación de bioadhesivo > producto de cápsula donante de protones.

EJEMPLO 6

Preparación de Formulación Intravenosa de Tetrahidrobiopterina *Evaluación de Estabilidad de Preformulación*

- 15 En general, el objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad de BH4 en soluciones tampón que se encuentra en un rango en pH de 1 a 7 (ver tabla 15) y en la presencia y ausencia de antioxidantes y con y sin gas inerte en las soluciones de reacción (ver tabla 16).

Tabla 15 Componentes y Composición de Soluciones tampón que serán utilizadas para Estudios de Estabilidad de Preformulación BH4

Componentes	Cantidades
<u>Tampón pH 1.2 (0.1 N HCl)</u>	
Concentrado HCl (12 N)	8.33 mL
Cloruro de Sodio	2.92 g
Agua destilada/desionizada qs	1000 mL
<u>Tampón pH 2.1 (0.01 N HCl)</u>	
Tampón pH 1.2 (0.1 N HCl)	100 mL
Cloruro de Sodio	7.79 g
Agua destilada/desionizada qs	1000 mL
<u>Tampón pH 3</u>	
Acido fosfórico, 15 M, 85%	.347 mL
Fosfato monobásico de sodio, anhidro (NaH ₂ PO ₄)	6.17 g
Cloruro de sodio	6.16 g
Agua destilada/desionizada qs	1000 mL
<u>Tampón pH 4</u>	
Acido acético, Glacial, 100%	2.38 mL
Acetato de sodio, Trihidrato	1.29 g
Cloruro de sodio	8.22 g
Agua destilada/desionizada qs	1000 mL
<u>Tampón pH 5</u>	
Acido acético, Glacial, 100%	.87 mL
Acetato de sodio, Trihidrato	4.78 g
Cloruro de sodio	6.72 g
Agua destilada/desionizada qs	1000 mL
<u>Tampón pH 6</u>	
Monohidrato de ácido 4-morfolinoetanosulfónico (MES)	4.99 g
Sal de sodio MES	5.75 g
Cloruro de sodio	7.23 g
Agua destilada/desionizada qs	1000 mL
<u>Tampón pH 7</u>	
Fosfato monobásico de sodio, monohidrato (NaH ₂ PO ₄)	2.56 g
Fosfato dibásico de sodio, anhidro, (Na ₂ HPO ₄)	4.44 g
Cloruro de sodio	2.18 g
Agua destilada/desionizada qs	1000 mL

Tabla 16 Composición de Soluciones tampón para Estudios de Estabilidad que Contienen BH4 Con o Sin Antioxidante y dependiendo de si se Someten a rociado de Gas o No

pH	Número de Grupo de Estudio				
	1	2	3	5	6
	Estudio de tampón	Estudio de tampón + ácido ascórbico	Estudio de tampón + L-cisteína	Estudio de rociado de tampón+ argón	Estudio de rociado de tampón + oxígeno
1	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 1.2	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico en tapón de pH 1.2	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de L-cisteína en tapón de pH 1.2	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 1.2 y manto de argón y rociado con argón-sellado	1 mg/mL de BH4 en tapón pH 1.2 y manto de O ₂ y rociado con oxígeno-sellado
2	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 2.1	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico en tapón de pH 2.1	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de L-cisteína en tapón de pH 2.1	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 2.1 y manto de argón y rociado con argón-sellado	1 mg/mL de BH4 en tapón pH 2.1 y manto de O ₂ y rociado con oxígeno-sellado
3	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 3	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico en tapón de pH 3	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de L-cisteína en tapón de pH 3	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 3 y manto de argón y rociado con argón-sellado	1 mg/mL de BH4 en tapón pH 3 y manto de O ₂ y rociado con oxígeno-sellado
4	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 4	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico en tapón de pH 4	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de L-cisteína en tapón de pH 4	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 4 y manto de argón y rociado con argón-sellado	1 mg/mL de BH4 en tapón pH 4 y manto de O ₂ y rociado con oxígeno-sellado
5	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 5	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico en tapón de pH 5	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de L-cisteína en tapón de pH 5	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 5 y manto de argón y rociado con argón-sellado	1 mg/mL de BH4 en tapón pH 5 y manto de O ₂ y rociado con oxígeno-sellado
6	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 6	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico en tapón de pH 6	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de L-cisteína en tapón de pH 6	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 6 y manto de argón y rociado con argón-sellado	1 mg/mL de BH4 en tapón pH 6 y manto de O ₂ y rociado con oxígeno-sellado
7	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 7	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico en tapón de pH 7	1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de L-cisteína en tapón de pH 7	1 mg/mL de BH4 en tapón de pH 7 y manto de argón y rociado con argón-sellado	1 mg/mL de BH4 en tapón pH 7 y manto de O ₂ y rociado con oxígeno-sellado

- 5 Más específicamente, la influencia de combinar dos antioxidantes en la presencia o ausencia de un gas inerte se evaluó en un pH de 4 para soportar la formulación de un producto líquido, y en un pH de 7 para confirmar la contribución de inestabilidad en un pH fisiológico para la menor disponibilidad del compuesto en monos y humanos (ver tablas 17 y 18). La estabilidad de BH4 se espera que sea dependiente de la temperatura. Por consiguiente, la estabilidad del compuesto fue evaluada en temperaturas de 2-8°C, 25°C, 30°C y 37°C para soportar la determinación de vidas en anaquel a largo plazo predictivas para el compuesto en diferentes temperaturas. La determinación de la estabilidad del compuesto a una temperatura fisiológica de 37°C, arroja datos que proporciona soporte para el estimado de estabilidad del tiempo de vida de una forma de dosificación oral formulada en las regiones de absorción del tracto GI.

Tabla 17 Composición de Soluciones tampón para el Estudio de Estabilidad de BH4 en pH 4

pH 4	pH 4
Estudio de tampón + ácido ascórbico + L-cisteína	Estudio de tampón + ácido ascórbico + L-cisteína + rocío con argón
1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico y 1 mg/mL de L-cisteína en tampón de pH 4	1 mg/mL de BH4 + 1 mg/mL de ácido ascórbico + 1 mg/mL de L-cisteína en tampón con pH 4 y manto de argón y rociado con argón-sellado

Tabla 18 Composición de Soluciones Tampón para el Estudio de Estabilidad de BH4 en pH 7

pH 7	pH 7
Estudio de tampón + ácido ascórbico + L-cisteína	Estudio de tampón + ácido ascórbico + L-cisteína + rocío con argón
1 mg/mL de BH4 y 1 mg/mL de ácido ascórbico y 1 mg/mL de L-cisteína en tampón de pH 7	1 mg/mL de BH4 + 1 mg/mL de ácido ascórbico + 1 mg/mL de L-cisteína en tampón con pH 7 y manto de argón y rociado con argón-sellado

Se estimaron los tiempos de muestreo propuestos para estudios que serán llevados a cabo en diversas soluciones tampón, comparando la vida media de un estudio simple en pH 3.1 con datos obtenidos por Davis, et al. (1988; Eur. J. Biochem. 173, 345-351, (1988)), en tampones Tris y fosfato con pH 6.8. El estudio de estabilidad de una solución con pH 3.1 produjo un estimado $t_{1/2}$ de 17769 minutos (12.3 días) y el trabajo de Davis et al. produjo un $t_{1/2}$ de 10 minutos en tampón de fosfato con pH 6.8 y 14 minutos en tampón Tris con pH 6.8. Estos dos estudios sugieren una reducción del orden de magnitud en la vida media (es decir un orden de magnitud que incrementa en la reactividad) de BH4 por cada incremento de una vez en pH (ver tabla 19). En base a esta aproximación, la solución es de pH 1.2 a pH 3 fueron muestreadas débilmente en forma inicial, y se realizaron correcciones de tiempo de muestreo si fue necesario después de que se recolectaron los primeros dos puntos de datos. Los tiempos de muestreo estimados en 25°C son proporcionados en la tabla 19.

Tabla 19 Tiempos de Muestreo Sugeridos en Diversos pH en base a la Vida Media Medida de BH4 y Vidas Medias Teóricas Derivadas de las Mismas

pH	Medido $t_{1/2}$ (Min)	$t_{1/2}$ Estimado en base a $t_{1/2}$ obtenido en pH 3 (Min) ^a	Tiempo de muestreo inicialmente sugerido ^c
1.0	-	776900.0 (1234 días)	Cada 7 días
2.0	-	177690.0 (1234.4 días)	Cada 7 días
3.0	17769.0 (12.34 días)	17769.0 (12.34 días)	Cada 96 horas
4.0	-	1776.9 (1.23 días)	Cada 12 horas
5.0	-	177.7 (0.12 días)	Cada ½ hora
6.0	-	17.7 (0.1 días)	Cada 5 minutos ^d
6.8 ^b	10 (fosfato) 14 (Tris)		
7.0	-	1.8	Cada ½ minuto ^d

^aEl $t_{1/2}$ estimado está basado en el cambio por un orden de magnitud, la vida media obtenida en pH de 3.0 por cada cambio de una vez en pH. pH < 3 se incrementan hacia arriba en tanto que pH>3 disminuyen hacia abajo por un orden de magnitud en un modo por etapas para coincidir rigurosamente con los datos de pH 6.8 obtenidos por Davis et al..

^bDatos obtenidos de Davis, et al.. 1988; Eur. J. Biochem., 173, 345-351, (1988)

^cEl muestreo puede ser modificado

^dLas soluciones de reacción se muestrearon y extinguieron tan rápido como fue posible y requieren un cronómetro y 2 personas, una de muestreo/extinción y la otra que registre en forma precisa el tiempo en minutos y/o segundos en un cuaderno.

Los estudios se llevaron a cabo en soluciones tampón de pH 1 - 7 y a temperaturas de 5°C, 25°C, 30°C y 37°C. Aunque los estudios se llevaron a cabo en envases no sellados de forma hermética, los antioxidantes solos (ácido ascórbico o L-cisteína) o combinados (ácido ascórbico + L-cisteína) redujeron la tasa de pérdida o degradación de BH4 (ver figura 36 y figura 37). El rociado de una solución que contiene tanto ácido ascórbico como L-cisteína aumentó sustancialmente la estabilidad de BH4.

La tasa de degradación de BH4 es dependiente de la concentración (ver figura 38). Por consiguiente, las formulaciones altamente concentradas, de dosis altas de BH4 mostraron requerir una menor concentración de estabilizadores para estabilización sinérgica de las formulaciones.

Este resultado demuestra que la formulación de las formulaciones de vida media en almacenamiento, estables, líquidas pueden producirse de acuerdo con los métodos y composiciones aquí descritos, incluyendo líquidos inyectables estériles, líquidos orales y polvos liofilizados y estériles para formulaciones de constitución.

EJEMPLO 7

Formulaciones Líquidas y Liofilizadas de Tetrahidrobiopterina para Uso Oral y Parenteral

Composiciones de Formulaciones a modo de ejemplo

Tabla 20 Formulación específica amortiguada en pH 4 que tiene ácido ascórbico como estabilizador

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	1.00	0.10	Sustancia activa
Acido ascórbico	10.00	1.00	Antioxidante
Acido cítrico	6.56	0.66	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	5.53	0.55	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

5

Tabla 21 Formulación amortiguada en pH 4.0 que contiene una combinación de dos estabilizadores: ácido ascórbico y metabisulfito de sodio

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	1.00	0.10	Sustancia activa
Acido ascórbico	2.50	0.25	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	2.50	0.25	Antioxidante
Acido cítrico	6.56	0.66	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	5.53	0.55	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

Tabla 22 Formulación amortiguada en pH 4.0 que contiene una combinación de tres estabilizadores: L-cisteína, ácido ascórbico y metabisulfito de sodio

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	1.00	0.10	Sustancia activa
Acido ascórbico	2.00	0.20	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	2.00	0.20	Antioxidante
L-cisteína	4.00	0.40	Antioxidante
Acido cítrico	6.56	0.66	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	5.53	0.55	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

10

Tabla 23 Formulación amortiguada en pH 7.0 que contiene únicamente ácido ascórbico únicamente como estabilizador

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	10.00	1.00	Sustancia activa
Acido ascórbico	50.00	5.00	Antioxidante
Fosfato monobásico de sodio, monohidrato	10.24	0.10	Agente tampón
Fosfato dibásico de sodio	17.76	0.18	Antioxidante
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	5.53	0.55	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

15

Tabla 24 Formulación amortiguada en pH 7.0 que contiene metabisulfito de sodio, ácido ascórbico como estabilizadores

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	10.00	1.00	Sustancia activa
Acido ascórbico	20.00	2.00	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	15.00	1.50	Antioxidante
Fosfato monobásico de sodio, monohidrato	10.24	0.26	Agente tampón
Fosfato dibásico de sodio	17.76	0.44	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

5 Tabla 25 Formulación amortiguada en pH 7.0 que contiene ácido ascórbico, metabisulfito de sodio y L-cisteína como estabilizadores

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	10.00	1.00	Sustancia activa
Acido ascórbico	20.00	2.00	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	15.00	1.50	Antioxidante
L-cisteína	10.00	1.00	Antioxidante
Fosfato monobásico de sodio, monohidrato	10.24	0.26	Agente tampón
Fosfato dibásico de sodio	17.76	0.44	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

Formulaciones Líquidas de Dosis Alta

Tabla 26 Formulación amortiguada en pH 6.0 que contiene ácido ascórbico únicamente como estabilizador

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	50.00	0.10	Sustancia activa
Acido ascórbico	7.50	0.75	Antioxidante
Acido cítrico	5.30	0.53	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	51.4	5.14	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

10 Tabla 27 Formulación amortiguada en pH 6.0 que contiene una combinación de dos estabilizadores: ácido ascórbico y metabisulfito de sodio

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	50.00	5.00	Sustancia activa
Acido ascórbico	2.50	0.25	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	2.50	0.25	Antioxidante
Acido cítrico	5.30	0.53	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	51.4	5.14	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

Tabla 28 Formulación amortiguada en pH 6.0 que contiene una combinación de tres estabilizadores L-cisteína, ácido ascórbico y metabisulfito de sodio

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	50.00	0.10	Sustancia activa
Acido ascórbico	2.00	0.20	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	2.00	0.20	Antioxidante
L-cisteína	1.00	0.10	Antioxidante
Acido cítrico	5.30	0.53	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	51.4	5.14	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

15 Tabla 29 Formulación oral amortiguada en tampón de citrato pH 3.0 y que contiene ácido ascórbico únicamente como estabilizador

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	10.00	1.00	Sustancia activa
Acido ascórbico	20.00	2.00	Antioxidante
Sacarosa	200.00	20.00	Edulcorante
Sabor a naranja	1.00	0.10	Agente de Sabor
Acido cítrico	8.98	0.90	Agente tampón
Citrato de sodio, dihidrato	2.13	0.21	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

Tabla 30 Formulación oral amortiguada en tampón de tartrato de pH 3.5 y que contiene ácido ascórbico y metabisulfito de sodio como estabilizadores

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	10.00	1.00	Sustancia activa
Acido ascórbico	20.00	2.00	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	5.00	0.50	Antioxidante
Sacarosa	200.00	20.00	Edulcorante
Sabor a uva	1.00	0.10	Agente de Sabor
Acido tartárico	1.34	0.13	Agente tampón
Dibásico tartrato de sodio dihidrato	8.39	0.84	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

- 5 Tabla 31 Formulación oral amortiguada en pH 3.5 en solución en solución tampón a base de ácido málico y que contiene ácido ascórbico, y metabisulfito de sodio como estabilizadores

Componentes	Cantidad (mg)	% Peso/Volumen	Función
BH4	10.00	1.00	Sustancia activa
Acido ascórbico	20.00	2.00	Antioxidante
Metabisulfito de sodio	15.00	1.50	Antioxidante
Sacarosa	200.00	20.00	Edulcorante
Sabor a manzana	1.00	0.10	Agente de Sabor
Acido málico	3.07	0.31	Agente tampón
Dibásico de malato de sodio	4.91	0.49	Agente tampón
Agua para inyección qs	1.00 mL	1.00 mL	Diluyente

- 10 Las soluciones en formulación o en compuestos anteriores son rociadas opcionalmente con un gas inerte (por ejemplo argón o nitrógeno) o dióxido de carbono en el tanque de elaboración de compuestos, y los envases primarios se sellan preferentemente en un manto de gas inerte o dióxido de carbono para eliminar el oxígeno del espacio superior del envase. Las formulaciones pueden ser escaladas de manera ascendente en cualquier volumen, multiplicando las cantidades del componente por un factor de escala ascendente adecuado.

EJEMPLO 8

- 15 Determinación LC/MS/MS de Tetrahidrobiopterina (BH4) en plasma humano midiendo concentración de L-Biopterina al Momento de Oxidación Bajo Condiciones Básicas

- 20 La tetrahidrobiopterina (BH4) es una molécula terapéutica para el tratamiento de pacientes con fenilketonuria (PKU). Es importante tener un método preciso y específico para medir concentraciones BH4 en plasma humano. Sin embargo, es un desafío con cuantificar BH4 en plasma humano debido a su baja concentración endógena e inestabilidad. Bajo condiciones básicas, BH4 se oxida en dihidrobiopterina (BH2) y finalmente L-Biopterina. Además, la proporción de conversión de oxidación de BH4 a L-Biopterina es casi constante hasta 23 semanas. Por consiguiente, al medir la concentración de L-Biopterina al momento de oxidación bajo una condición básica, y aplicando una proporción de conversión molar, podremos determinar de manera confiable la concentración de BH4 en plasma humano.

- 25 Los métodos publicados están basados en el método clásico desarrollado por Fukushima y Nixon (Anal. Biochem., 102, 176-188(1980)) utilizando HPLC con detección de fluorescencia. En el método LC/MS/MS, la muestra de plasma humana se estabilizó con antioxidante, se aseguró con una solución estándar interna (IS) y se hizo base con una solución de hidróxido de sodio, posteriormente se oxido con solución de yodo. Al momento de la incubación en la oscuridad a temperatura ambiente, se agregó ácido ascórbico para reducir el

yodo en exceso. Las muestras oxidadas fueron extraídas mediante precipitación de proteína. L-Biopterina en los extractos reconstituidos fue analizado utilizando HPLC de fase inversa con detección MS/MS de Turbo Ion Spray®. Los iones negativos para L-Biopterina fueron determinados en el modo MRM. Las proporciones de área pico de fármaco a IS para los estándares fueron utilizada para crear una curva de calibración lineal utilizando análisis de regresión de mínimos cuadrados ponderado en $1/x^2$.

La proporción de conversión de oxidación de BH4 a L-Biopterina fue evaluada en múltiples puntos de tiempo: 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 23 semanas, y se encontró consistente en todos los puntos de tiempo probados, con una proporción de conversión nominal de 47.3% determinada a partir de los primeros tres puntos de tiempo consecutivos. La diferencia entre la proporción de conversión y otros puntos de tiempo y los valores nominales se encuentra en un rango de -2.3 a 6.3%. El método LC/MS/MS fue validado para cuantificar L-Biopterina en plasma humano K₂ EDTA en el rango de calibración lineal de 5 a 1000 ng/mL (equivalente a 11 a 2114 ng/mL para BH4). La precisión y exactitud del ensayo fue evaluada con muestras de control de calidad (QCs) y los resultados mostraron una precisión intradía entre 4.7 a 14.5% CV; exactitud intradía entre -7.1 a 7.4% de valores nominales; y precisión y exactitud intradía de 7.4 a 16.4% CV y -8.3 a 3.7% de valores nominales, respectivamente. La recuperación de extracción promedio para L-Biopterina fue del 65.3%. En plasma humano, K₂ EDTA, L-Biopterina se encontró como estable a temperatura ambiente durante al menos 4 horas y después de 4 ciclos de congelación-descongelación, y a una temperatura de 70°C durante al menos 275 días.

EJEMPLO 9

Determinación de BH4/BH2/B utilizando HPLC con Detección Electroquímica y de Fluorescencia

Se llevó a cabo un estudio para desarrollar un método para determinar las concentraciones de tetrahidrobiopterina (BH4), dihidrobiopterina (BH2) y biopterina (B) en plasma humano utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC) con detección de fluorescencia (FD) y detección electroquímica (ECD). El método está basado en la publicación de Cai, et al.. (*Cardiovascular Research* 55: 838-849, 2002).

Se elaboraron soluciones de reserva de BH4 (en 20 mM HCl), BH2 y B (en DMSO) en una concentración final de 10 mM y se almacenaron a temperatura de -80°C. Las soluciones de trabajo estándar de calibración se prepararon a partir de una solución de reserva en 100, 10, 7.5, 5, 2.5, y 1 nM en plasma humano K₂ EDTA modificado por 0.1% (w/v) 1,4-Ditioeritritol (DTE). Las soluciones de trabajo de control de calidad de BH4, BH2 y B fueron preparadas en 5, 8, 25 y 50 nM en plasma humano K₂ EDTA modificado por 0.1% (w/v) DTE y almacenadas a una temperatura de -80°C.

Para procesamiento de la muestra, el plasma fue diluido 1:10 en un tampón de resuspensión. A 180 µl del plasma diluido, se le agregaron 20 µl del tampón de precipitación 10 X. Este proceso de dilución de plasma y precipitación se aplicó a todos los estándares de plasma, muestras de plasma y QCs de plasma. Después de la adición de tampón de precipitación 10X, la muestra fue centrifugada a una velocidad máxima de 4°C durante 5 minutos para eliminar los desechos de plasma no específicos. 150 mL en sobrenadante posteriormente se transfirieron a un vial de muestra y posteriormente se colocaron en un automuestreador para una inyección de 100 mL.

Se preparó la fase móvil (2L) con 13.6 g de acetato de sodio (50 mM), 2.1 g de ácido cítrico (5 mM) 36 mg EDTA (48 mM), 49.4 mg DTE (160 mM), y 2% de metanol por volumen de agua. El pH se ajustó a 5.22. Se elaboró el tampón de suspensión (20 mL) con 20 mL de PBS pH 7.4 (50 mM), 20 µL de 1 M DTE (1 mM), y 100 mL de 100 µM EDTA. Se elaboró en fresco el tampón de precipitación 10X (25 mL) con 2.88 mL de ácido fosfórico (1M), 9.39 g de ácido tricloroacético (2 M) y 20 mL 1M DTE (1 mM).

Se separaron tetrahidrobiopterina (BH4), dihidrobiopterina (BH2), y Biopterina (B) utilizando separación HPLC de fase inversa. El BH4 fue medido utilizando detección electroquímica en donde BH4 se oxidan mediante el electrodo 1 a dihidrobiopterina quinoide (qBH2) y posteriormente se redujo de nuevo a BH4 en el electrodo 2. Posteriormente el electrodo utiliza la corriente generada por esta reacción de reducción para determinar la concentración de BH4. BH2 y B puede medirse en la misma inyección utilizando detección de fluorescencia. La oxidación posterior a la columna de BH2 utilizando una célula de protección de acondicionamiento en el potencial óptimo, oxida BH2 a Biopterina.

Se llevó a cabo la separación HPLC en una columna ACE C-18 (250 mm x 4.6 mm), 5 µm, a una tasa de flujo de 1.3 mL/minuto con un tiempo de ejecución de 13 minutos. Los ajustes de la detección electroquímica fueron E1: + 100 mV (corriente de fondo +500 nA a +600 nA) y E2: -300 mV (corriente de fondo: -50 nA a -60 nA). La oxidación post-columna se ajustó en 900 mV. Las preparaciones de detección de fluorescencia fueron longitud de onda de excitación: 350 nm y longitud de onda de emisión: 450 nm.

La linealidad y rango del método se evaluaron en base a la precisión y exactitud de los estándares en plasma y solución tampón. La concentración de curva estándar se estableció utilizando al menos de 4 a 6 concentraciones no cero de cada material para análisis. La concentración de los estándares fue de 1, 2.5, 5, 7.5, 10, y 100 nM. Los resultados muestran un ajuste lineal de 1 a 100 nM para BH4, BH2, y B con R2 de >0.99.

La precisión fue determinada mediante análisis de réplica para muestras de control de calidad que contienen cantidades conocidas (2, 8, 25, y 50 nM) de material para análisis y se expresan como precisión de porcentaje. La precisión también se calcula en base a los datos de los controles de calidad. Se evaluó la precisión intra-ensayo y precisión inter-ensayo en base a CV%. En tres tandas experimentales separadas, se prepararon concentraciones de cada material para análisis en plasma y se analizaron. Además 10 nM de BH4, BH2, y B fueron "sujetadas" en muestras de plasma humana para determinar la exactitud y precisión. Las medidas de BH4, BH2, y B en 8, 25, y 50 nM probaron ser exactas en el 112% y demostraron precisión (CV%) de 2.5%-20%. Los experimentos de recuperación por sujeción utilizando 10 nM BH4, BH2, y B en muestras clínicas de plasma humano, denotaron recuperaciones entre 70%-130%. Los resultados demuestran que el método es exacto y preciso para muestras con concentraciones mayores a 2 nM.

Para revisar la presencia de interferencia endógena en seis diferentes lotes de plasma, se sujetó 10 nM BH4, BH2, y B en seis diferentes lotes de plasma y se determinó la exactitud y precisión para cada muestra de plasma. Los experimentos de selectividad mostraron que los seis individuos tuvieron niveles BH4 de línea de base endógenos de entre debajo del límite cuantificable a 2.48 nM. En forma similar, las concentraciones BH2 y B se encontraron en un rango de 0.02 a 10 nM. La recuperación de los materiales para análisis sujetado 10 nM se encontraron en un rango de 69%-87%. La variabilidad (CV%) a través de las muestras de plasma individuales y materiales para análisis cuando sujetado en 10 nM se encontraron en un rango de 23%-37%. La variabilidad de los niveles endógenos de BH4, BH2 y B fluctuó de 0.9-9.6 nM. Juntos, los resultados indican una tendencia que sugiere la interferencia de matriz o pérdida durante la extracción, pero no indican una fuerte selectividad entre individuos.

Para medir la matriz, se compararon las curvas estándar del efecto preparadas en plasma o tampón con respecto a exactitud (recuperación), linealidad y correlación. La comparación de los estándares preparados en plasma versus estándares preparados en tampón demuestra un efecto de matriz modesto y generalmente una buena correlación. Los tres materiales para análisis tuvieron excelentes ajustes lineales para plasma y tampón. BH4 y BH2 no demostraron efectos de matriz significativos a través del rango de concentración. Sin embargo, BH2 tuvo menos recuperación en la concentración estándar más alta (100 nM). Las muestras de control de calidad preparadas en tampón y plasma demostraron una buena precisión. En general, los efectos de matriz parecieron mínimos, con una tendencia hacia una menor recuperación en tampón en comparación con el plasma. Debido a que BH4 y BH2 se oxidan fácilmente, el plasma recolectado y los tampones de muestra deben contener antioxidantes y tener, cuando sea posible, un pH bajo.

Para probar la capacidad para diluir en forma precisa una muestra de plasma y tampón sujetado con 250 nM de BH4, BH2 y B, el plasma fue diluido utilizando plasma en blanco en series de dilución de 3 veces. Las muestras diluidas fueron analizadas y comparadas con un valor nominal después de que se aplicó el factor de dilución. La dilución de las altas concentraciones de BH4, BH2 y B puede ser elaborada en forma precisa. Para BH4 las concentraciones observadas después de la dilución fueron entre 83% y 104% de exactitud para concentraciones entre 83.33 nM y 3.07 nM. BH2 fue de 74% a 80% de exactitud a través del rango cuantitativo (83 nM-3 nM). B fue de 119% a 113% de exactitud a través del rango cuantitativo (83 nM-3 nM). Por consiguiente, una muestra que está por encima del límite cuantitativo puede ser diluida de forma precisa.

Se prepararon cuatro concentraciones de materiales de analitos (2, 8, 25 y 50 nM) en plasma y se congelaron durante un mínimo de 24 horas durante un ciclo y un mínimo de 12 horas durante otros ciclos para un mínimo de tres ciclos. Las muestras fueron congeladas sin ayuda a temperatura ambiente entre periodos de congelación. La exactitud y variabilidad después de cada uno de y todos los ciclos de congelación libres fue evaluada para establecer el número máximo de ciclos por los que puede pasar una muestra. El BH4-, BH2- y las muestras que contienen-B pueden pasar hasta tres ciclos de congelación en descongelación sin cambio significativo en exactitud o precisión de la medida. Las muestras de plasma con 8 nM-50 nM BH4 son de 121%-91% exactitud y CV% menores a 10%. En forma similar las medidas BH2 fueron de 77%- 88% de exactitud a través del rango cuantitativo del ensayo. Las medidas BH2 fueron de 98%-99% de exactitud a través del rango cuantitativo con precisión (CV%) de 5%-8%. La muestra de BH4, BH2, y B no prueba precisión o exactitud después de congelación-descongelación repetida. Por consiguiente, los estándares, controles de calidad y muestras de estudio pueden ser congelados y descongelados hasta 3 veces.

Debido a que los materiales para análisis son sensibles a oxidación, revisamos la estabilidad de congelación a largo plazo para mimetizar condiciones de almacenamiento esperadas. Se prepararon cuatro niveles de concentración (2, 8, 50, y 100 nM) de BH4, BH2, y B en plasma y se almacenaron a una temperatura de -70°C durante 8 semanas. Se ensayaron en forma fresca muestras de estabilidad en las semanas 3, 5, 6, y 8. BH4 y

5 B tienen buena estabilidad de congelación a largo plazo. BH2 demostró una concentración de muestra
 reducida después de almacenamiento prolongado. En las 8 semanas de almacenamiento, las muestras de
 plasma con BH4 fueron de 93%-94% exactitud y tuvieron CV% de entre 31%-0.21%, con la mayor variación
 observada en la concentración 2 nM. Las medidas BH2 fueron 63%-85% de exactitud a través de las
 10 concentraciones probadas con exactitud reducida en las concentraciones de 2 nM y 100 nM. La precisión
 (CV%) fluctuó de 37% a 18% para estas muestras. Las medidas B fueron de 88% a 101% de exactitud a
 través de las concentraciones probadas con precisión (CV%) de 23% a 0.14%, con la variabilidad más alta en
 la concentración de 2 nM. Juntos estos datos soportan la recomendación de almacenar muestras durante
 hasta 8 semanas sin pérdida apreciable de concentración del material para análisis. BH2 parece ser el más
 susceptible a degradación (oxidación).

15 Para medir la estabilidad de BH4, BH2 y B en el automuestreador, 8 nM de cada material para análisis en el
 disolvente de reconstitución permaneció en el automuestreador durante 0.25, 4 y 11 horas. La exactitud y
 precisión de las medidas fueron comparadas. La medición BH4 observada fue precisa en el 5% de la teoría en
 cada punto de tiempo con una exactitud y precisión a través de todas las medidas de 102% y 0.054%
 respectivamente. Las medidas de BH2 tuvieron una exactitud en disminución y una variabilidad en incremento
 después de 4 horas. Después de 11 horas en el automuestreador, se midió aproximadamente el 50% del
 BH2. Esto indica una deficiente estabilidad del automuestreador en el tampón de la ejecución. La medición de
 B permaneció exacta en el 125% de la teoría después de 11 horas. Por consiguiente, los tiempos de
 ejecución no mayores a 4 horas son los recomendados.

20 Para determinar la fluidez de inyección, se insertó una muestra de plasma de línea de base extraída después
 de la concentración estándar más alta 100 nM. Esto se realizó para mimetizar la posibilidad de sobreestimar
 la concentración del material para análisis en una muestra de baja concentración debido a la fluidez. La
 fluidez de inyección de BH4, BH2 y B es mínima y no abarca más del 1% del área pico del límite de
 25 cuantificación superior de 100 nM. La fluidez de inyección abarca aproximadamente 5% a 20% del límite
 inferior de cuantificación, en base al área pico promedio obtenida del control de baja calidad (2 nM). Por
 consiguiente, preferentemente las muestras deben ser ordenadas desde la más baja hasta la más alta (por
 ejemplo, primera predosis, seguido de muestras de post-dosis) y lavados adicionales para limpiar la columna
 periódicamente durante una operación, serán realizadas preferentemente para potencialmente minimizar la
 fluidez.

30 Se desarrolló un método cualificado que es robusto, específico, exacto y preciso. Este método es adecuado
 para cuantificar los niveles de BH4, BH2 y B en plasma para los estudios farmacocinéticos y del fármaco.

REIVINDICACIONES

- 1 Tetrahidrobiopterina (BH4) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma para su uso en el tratamiento de la hipernilalaninemia, en donde la BH4 o una sal de la misma se administra por vía oral dentro de un periodo de 0 a 30 minutos después de una comida.
- 5 2 La BH4 o su sal para el uso según la reivindicación 1, en donde la BH4 o una sal de la misma es para su administración por vía oral con una comida.
- 3 La BH4 o su sal para el uso según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde la comida comprende una comida de alto contenido en grasa, y alto contenido calórico.
- 10 4 La BH4 o su sal para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 -3, en donde la BH4 o la sal de la misma es para su administración en una dosis total diaria de 1 mg/kg hasta 20 mg/kg.
- 5 La BH4 o su sal para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 -4, en donde la BH4 o la sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra disuelta en un líquido.
- 6 La BH4 o su sal para su uso según una de las reivindicaciones 1-5 en donde la BH4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se administra ingiriéndola en una forma de dosificación sólida.
- 15 7 La BH4 o su sal para su uso según la reivindicación 6 en donde la forma de dosificación sólida es un comprimido.
- 8 La BH4 o su sal para su uso según la reivindicación 6, en donde la forma de dosificación sólida es una cápsula.
- 20 9 La BH4 o su sal para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la BH4 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma es para la administración sólo una vez por semana.
10. La BH4 o su sal para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el paciente sufre de fenilcetonuria (PKU), incluyendo PKU suave o clásica.
11. La BH4 o su sal para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la BH4 o una sal de la misma se administra dentro de un periodo de 5-20 minutos después de una comida.
- 25 12. La BH4 o su sal para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en donde la BH4 o una sal de la misma se administra al mismo tiempo una vez al día.
13. La BH4 o su sal para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde la BH4 se administra con una comida para aumentar la absorción de BH4.

FIG. 1

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma B de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterin

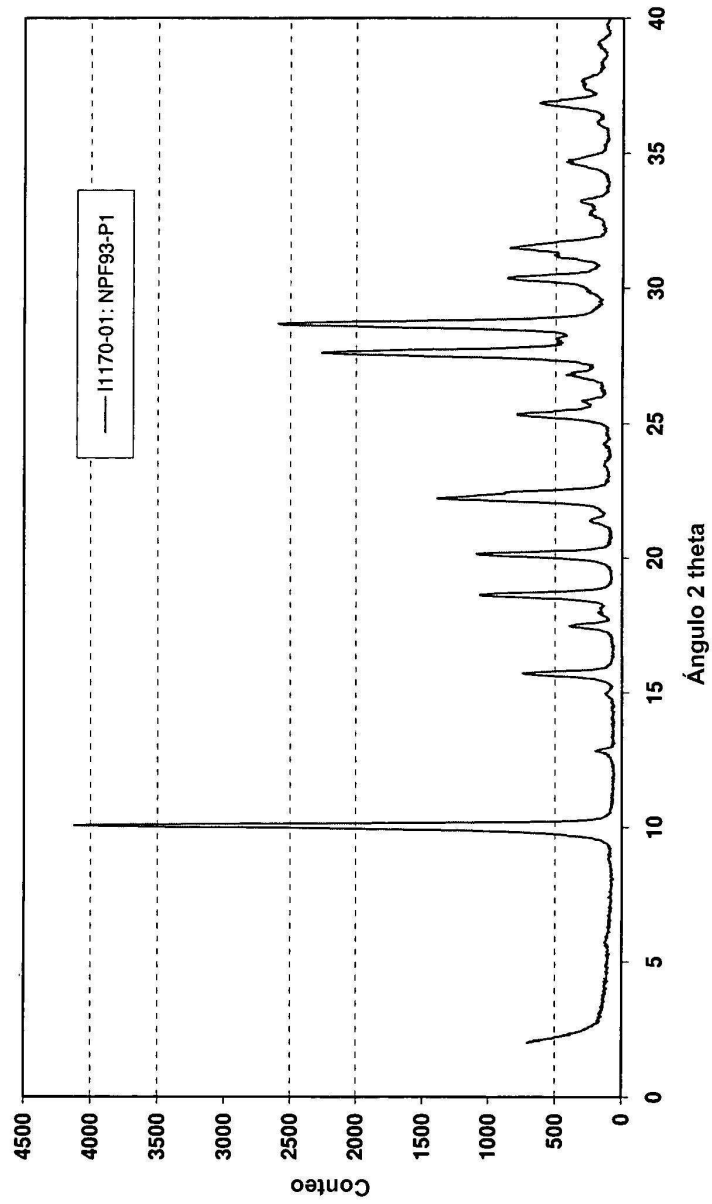


FIG. 2

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma A de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

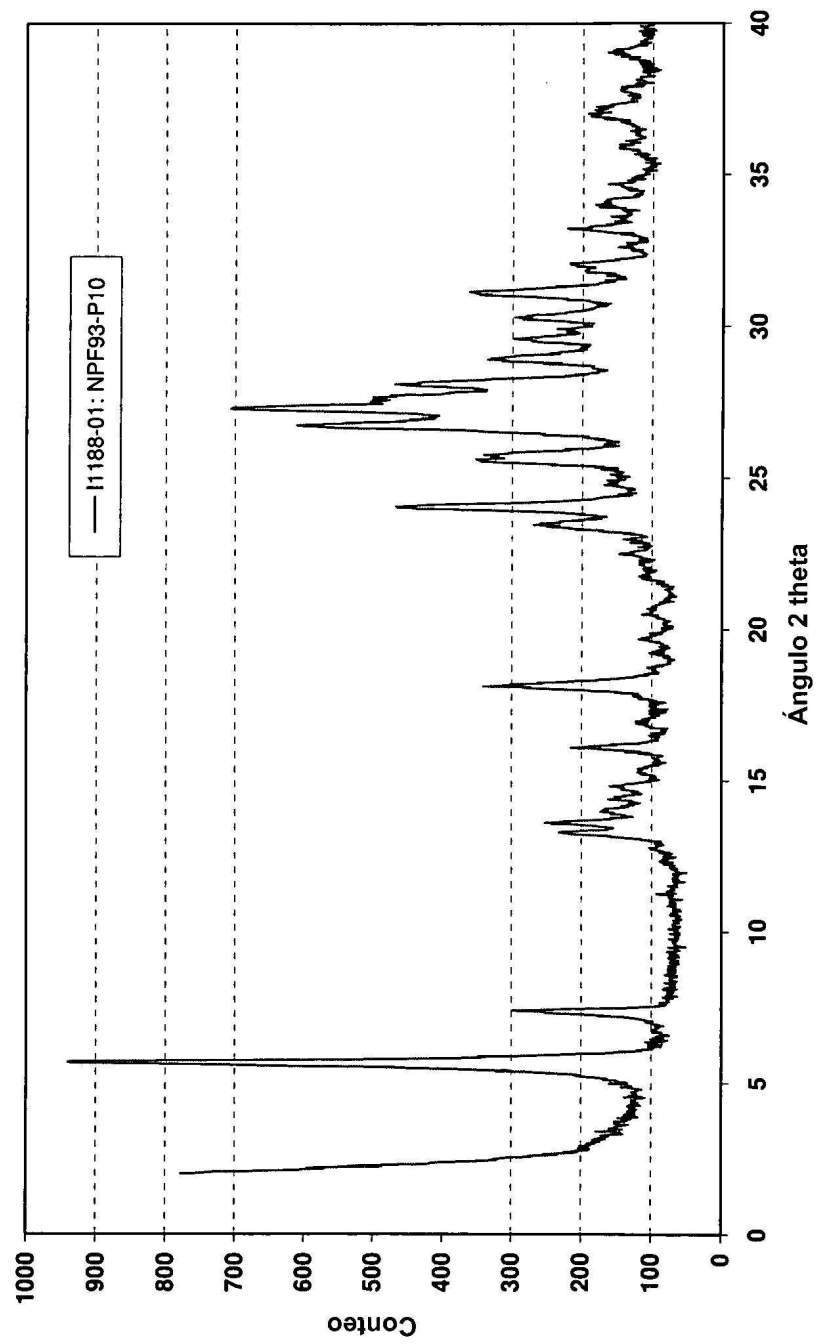


FIG. 3

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma F de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

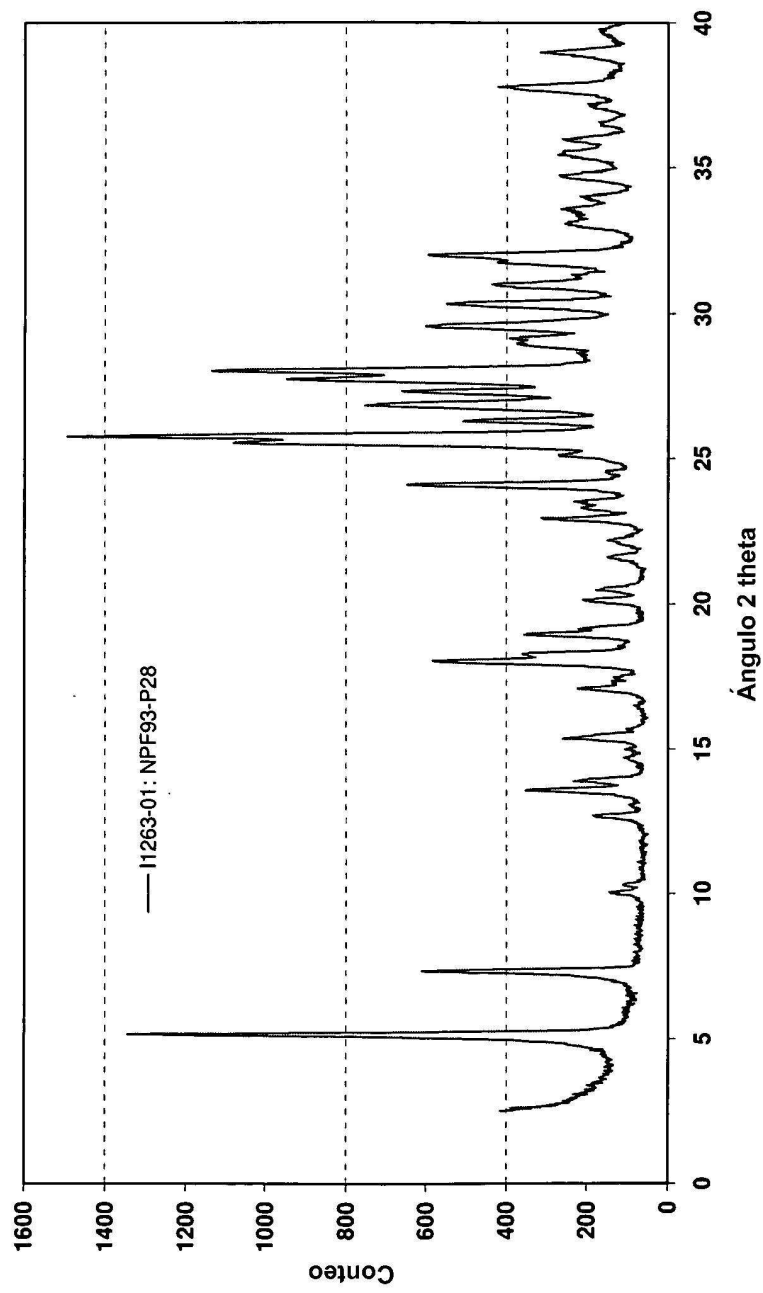


FIG. 4

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma J de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

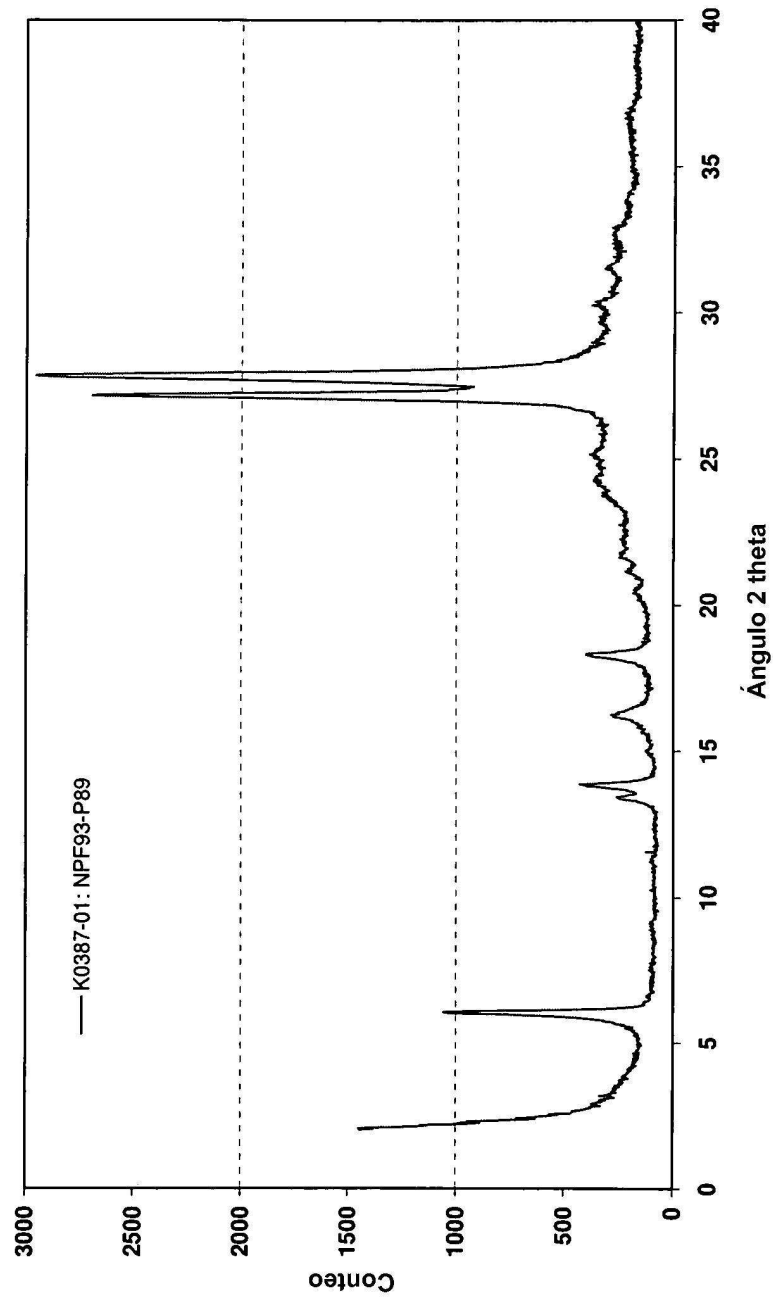


FIG. 5

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma K de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

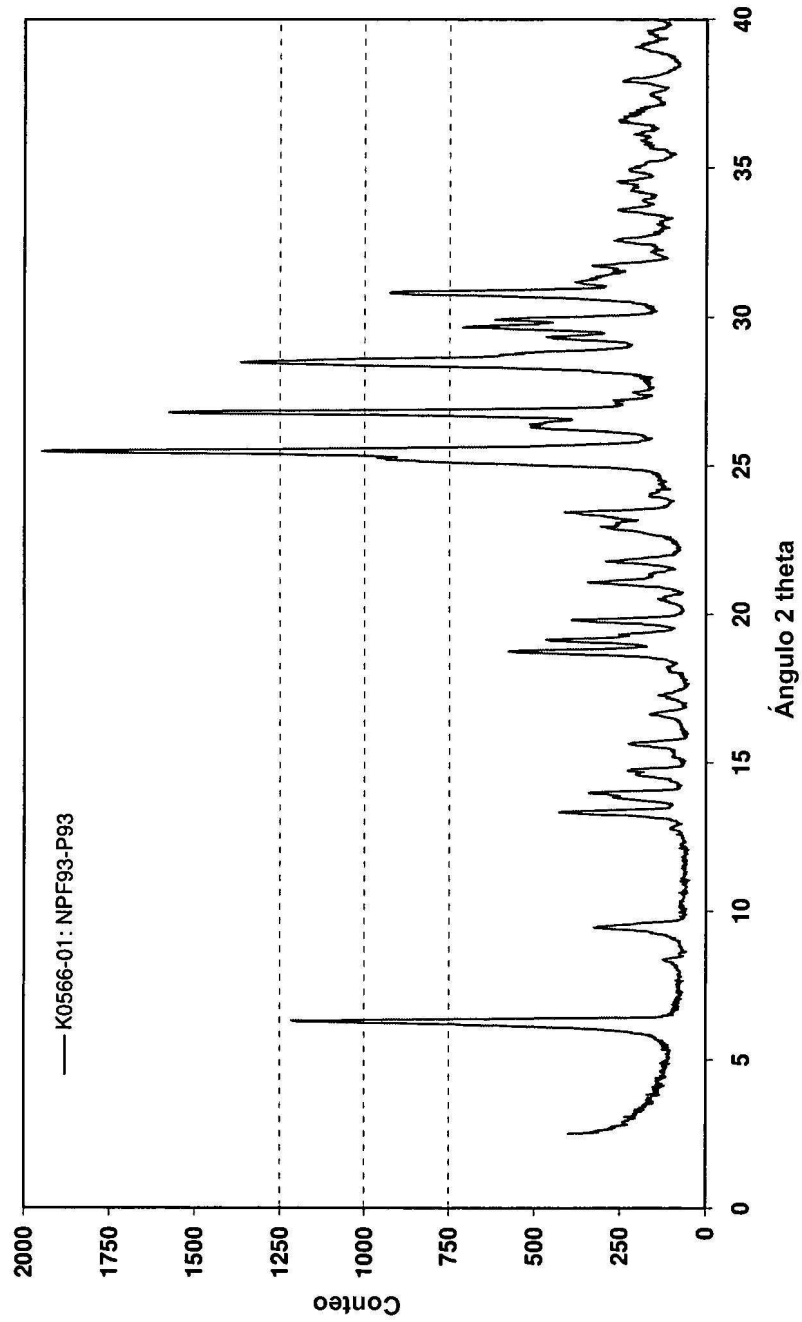


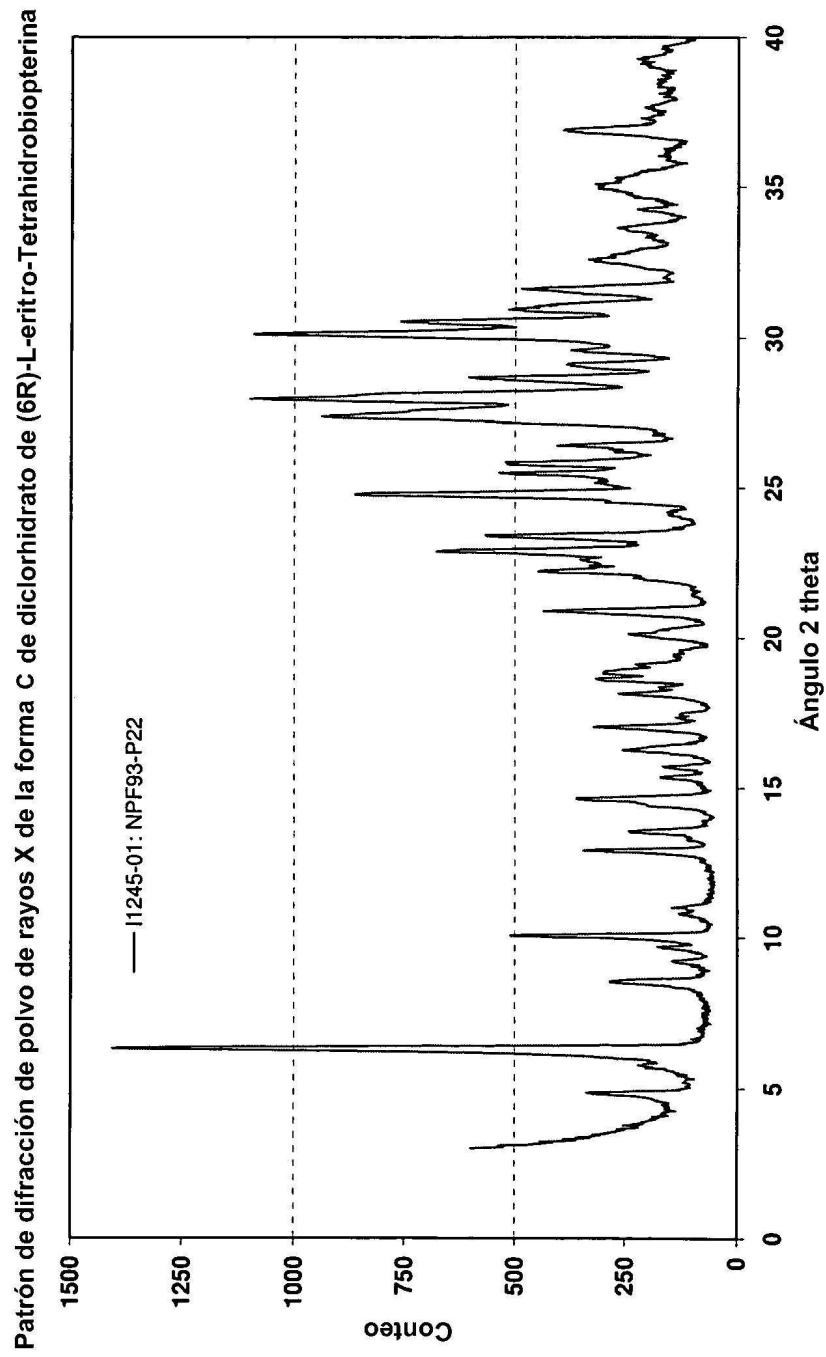
FIG. 6

FIG. 7

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma D de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

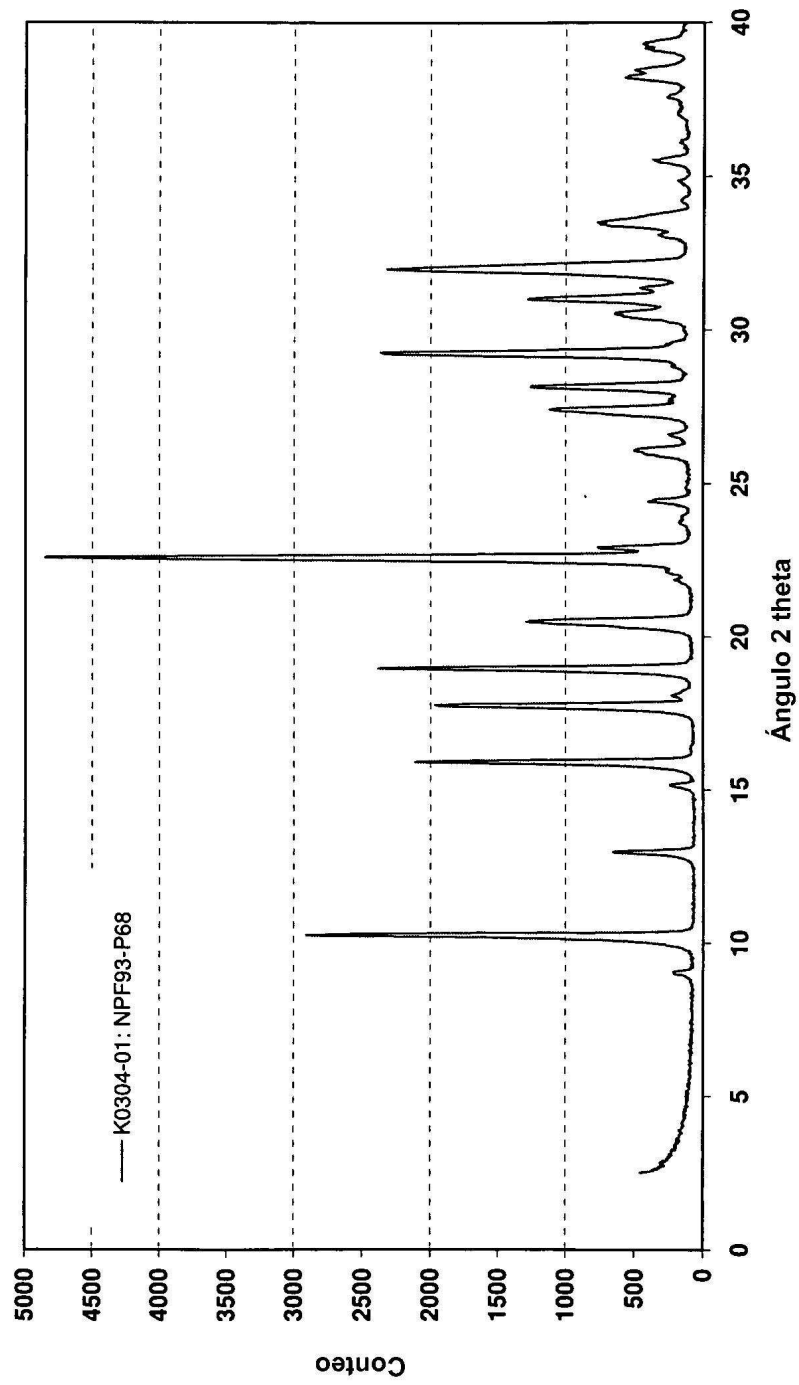


FIG. 8

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma E de clorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

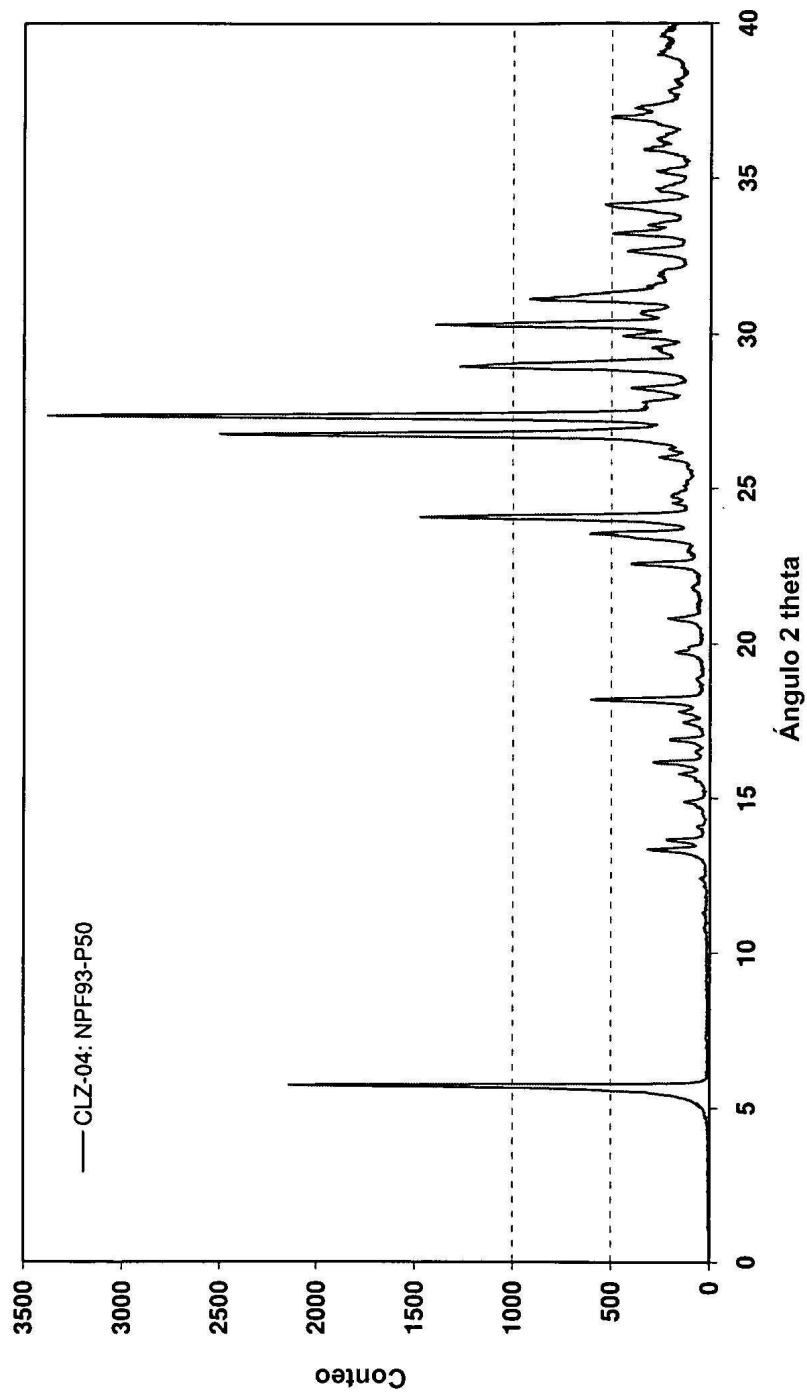


FIG. 9

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma H de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

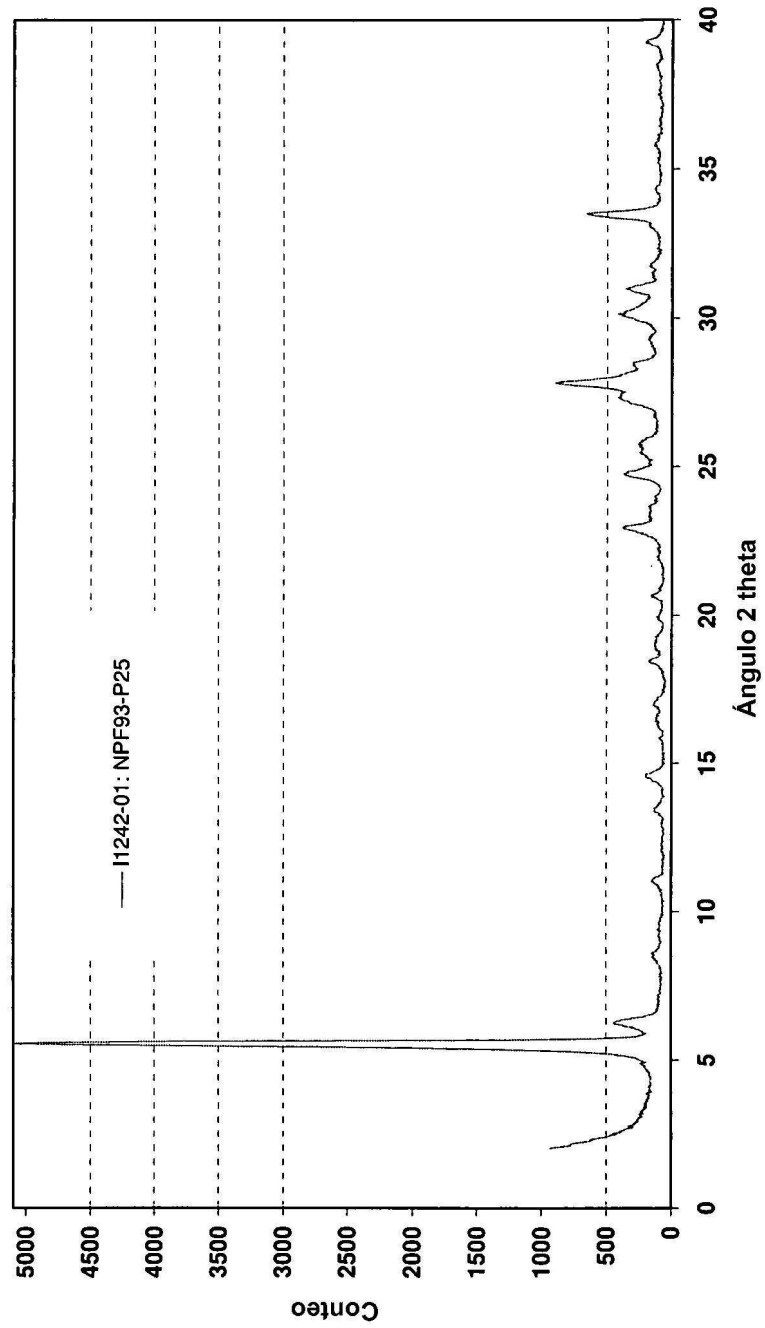


FIG. 10

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma O de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

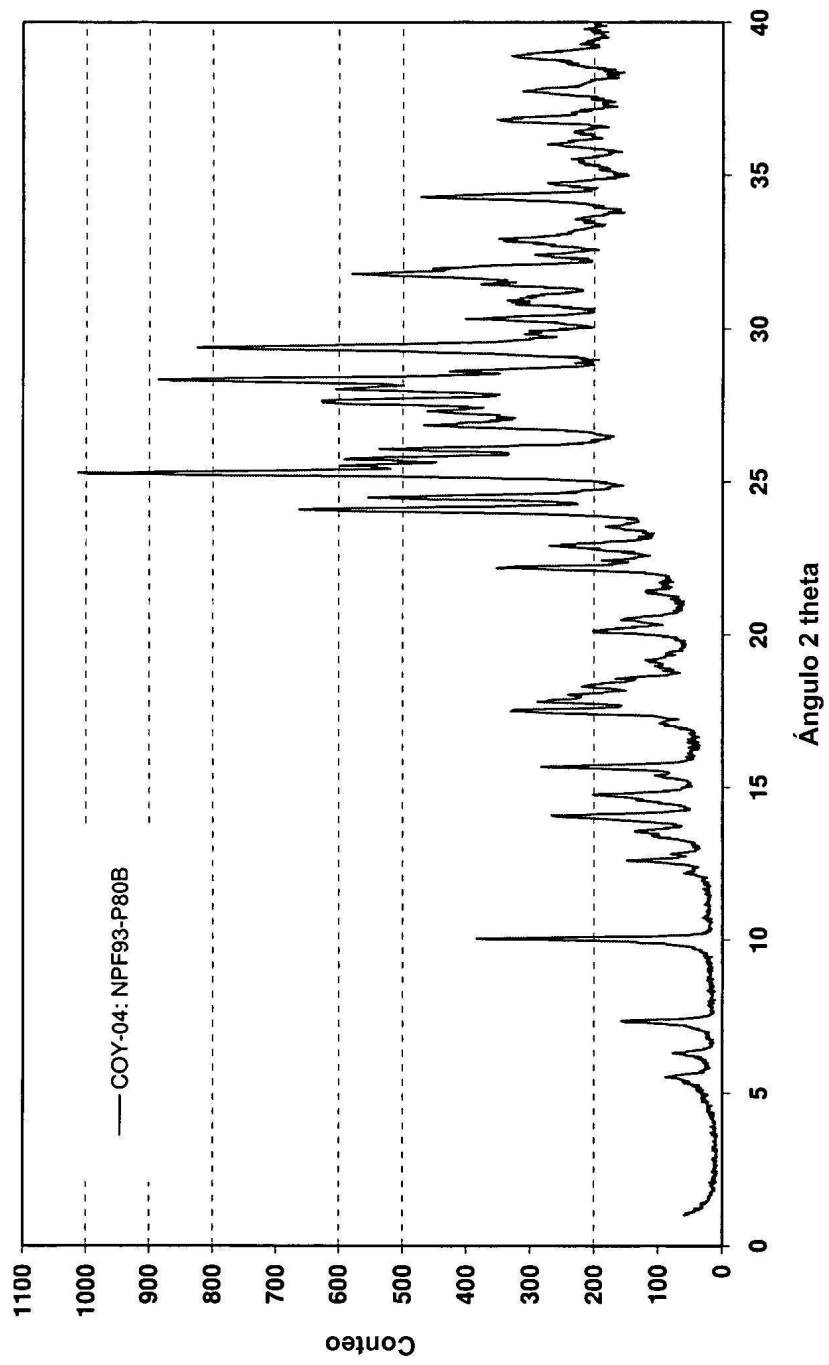


FIG. 11

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma G de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

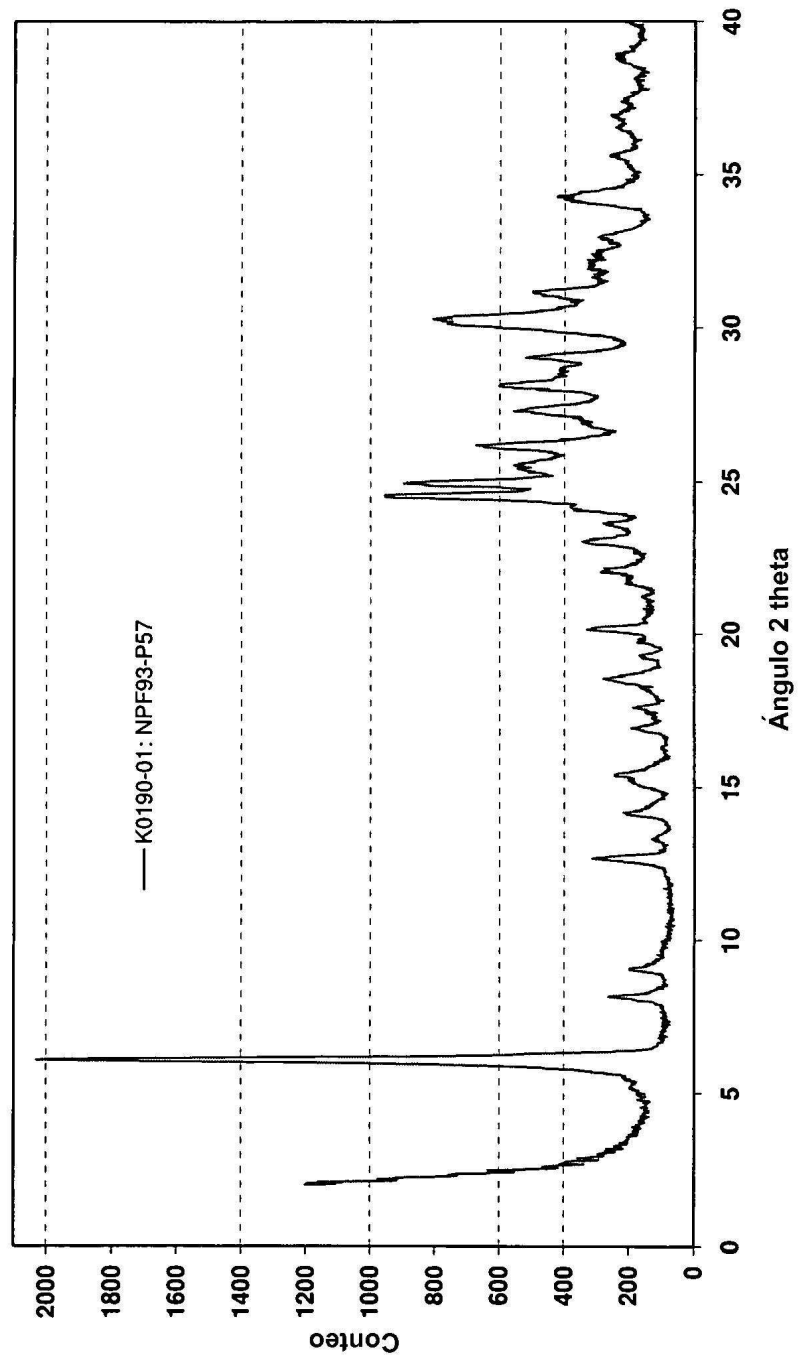


FIG. 12

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma I de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

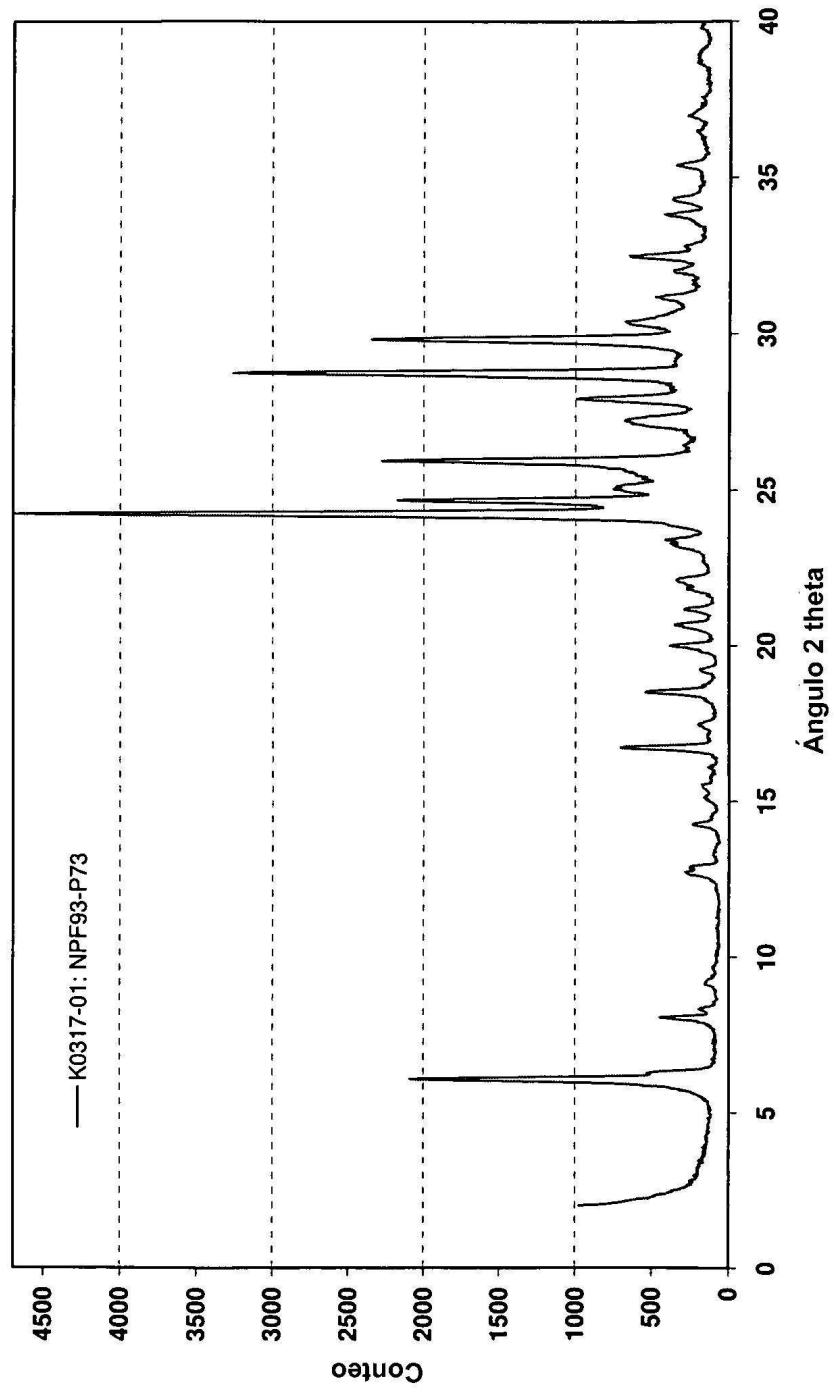


FIG. 13

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma L de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

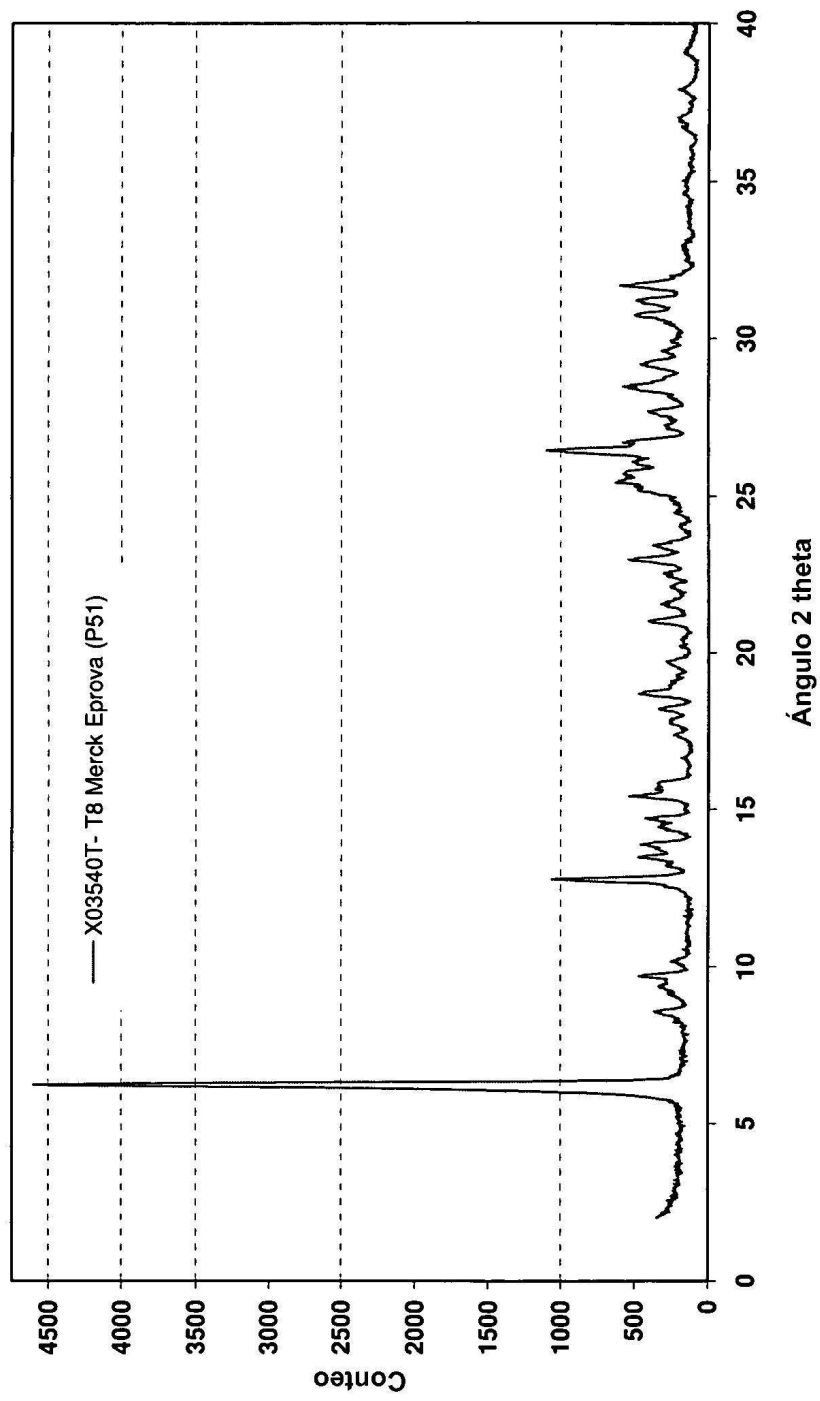


FIG. 14

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma M de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

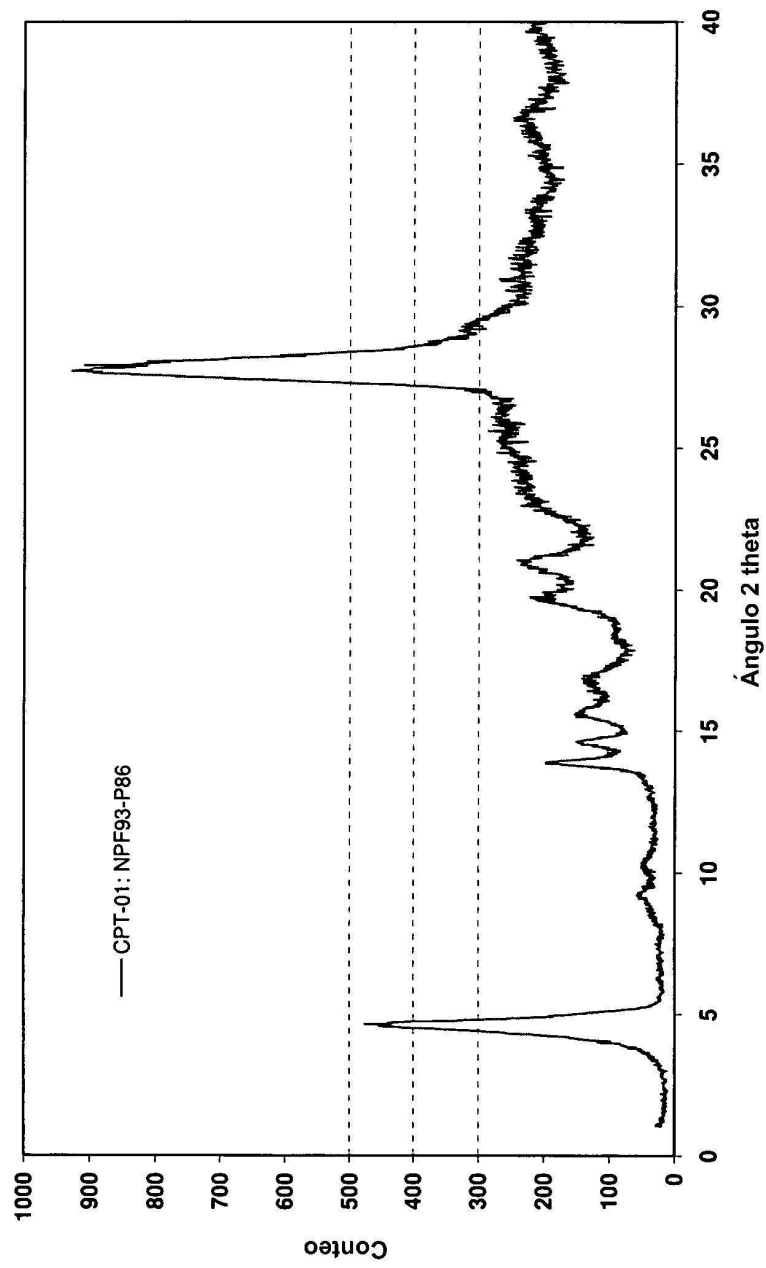


FIG. 15

Patrón de difracción de polvo de rayos X de la forma N de diclorhidrato de (6R)-L-eritro-Tetrahidrobiopterina

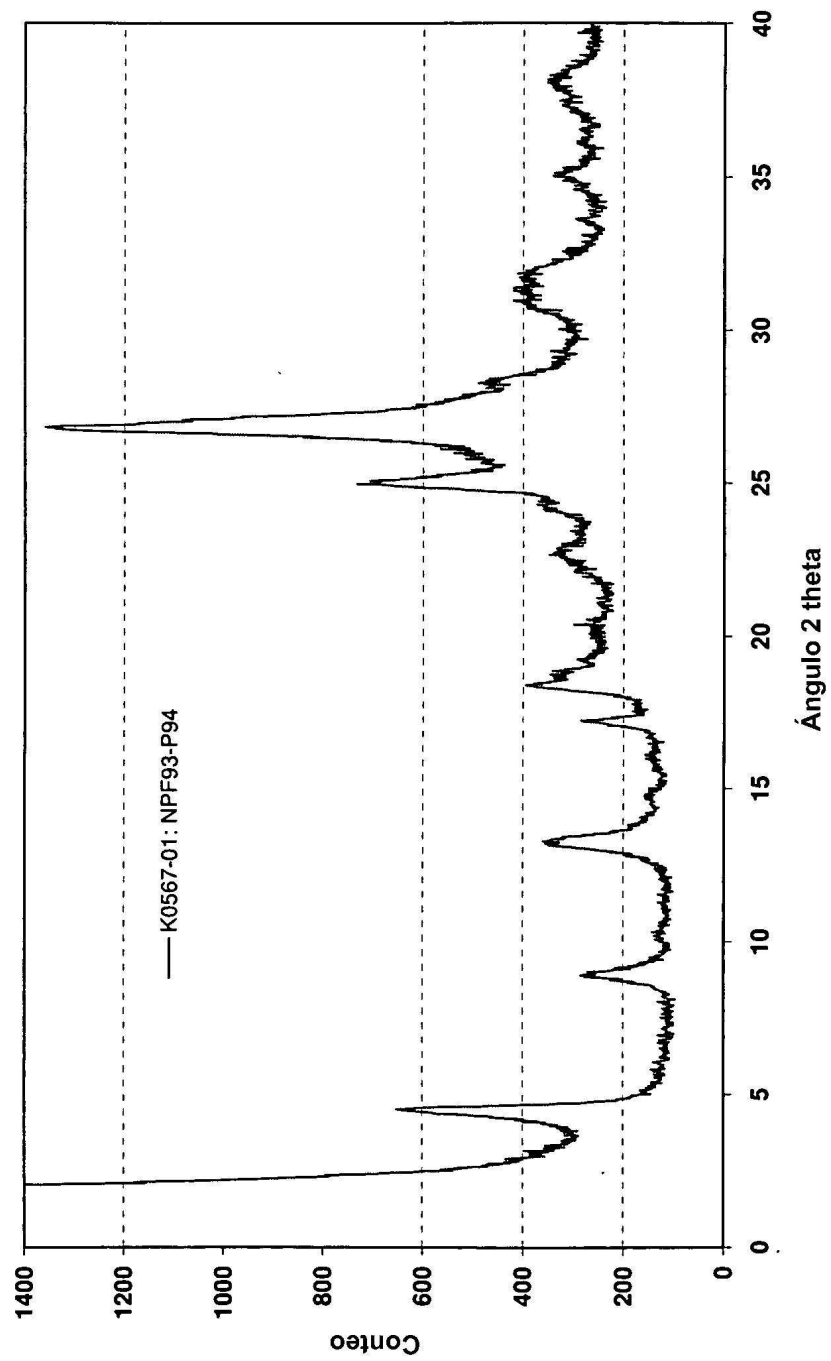
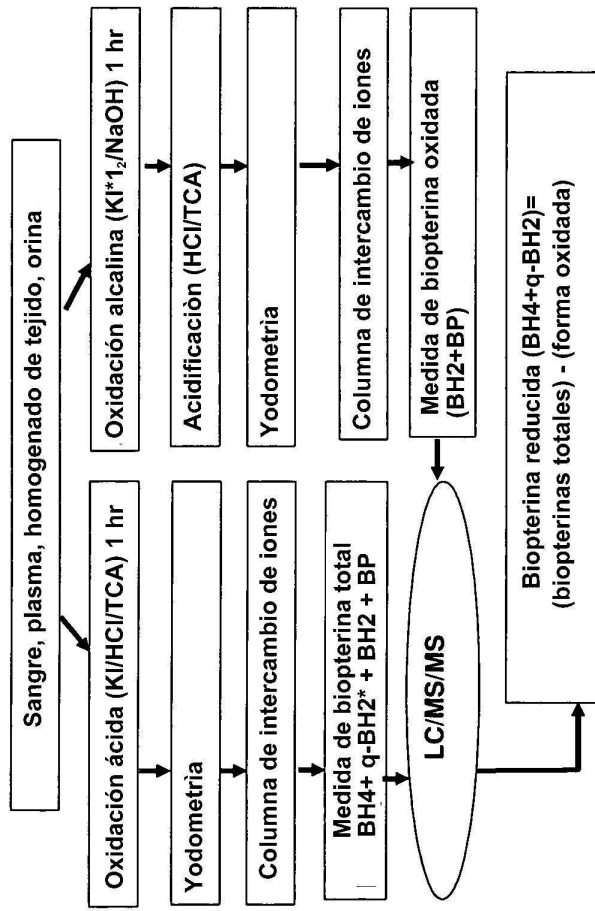


FIG. 16 - Diagrama de flujo de medición de biopterina

*q-BH2 es reducido inmediatamente in vivo a BH4 de modo que la a biopterina reducida medida, se basa principalmente en BH4

FIG. 17

Ensayo	Determinación LC/MS/MS de BH4 en plasma humano	Determinación HPLC de bipterina en plasma humano
Nombre de material para análisis	Tetrahidrobiopterina (BH4)	Biopterina
Nombre de material para análisis (producto de oxidación)	L-biopterina	Biopterina
Estándar interno	Irbesartan	Biopterina
Tipo de método analítico	LC/MS/MS	HPLC (Ex 365 nm/Em 473 nm)
Método de extracción	Precipitación de proteína	Precipitación de proteína
Concentraciones QC	5, 15, 150 y 800 ng/mL BH4	1, 10 y 40 ng/mL de bipterina
Concentraciones de Curva Estándar	5, 15, 50, 100, 300, 500 y 1000 ng/mL	0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 ng/mL
Límite de Cuantificación Inferior	5 ng/mL	(5 ng/mL de bipterina)
Límite de Cuantificación Superior	1000 ng/mL	50 ng/mL de bipterina)
Recuperación Promedio de Fármaco	65.3%	??
Recuperación Promedio de Estándar Interno	94%	74.94%
Rango de Precisión Intradía QC	4.7 a 14.5% CV	0.8 a 13
Rango de Exactitud Intradía QC	-7.1 a 7.4% Diff	-2.8 a 6.1
Rango de Precisión Interdía QC	7.4 a 16.4% CV	0.6 a 4.9
Rango de Exactitud de Interdía QC	-8.3 a 3.7% Diff	??
Solvente de Solución de Reserva	MeOH:DMSO/50:50 (v:v)	Amortiguador de fosfato de amonio
Estabilidad Benchtop en Plasma humano	4.5 horas en RT	??
Estabilidad de Congelación/Descongelación en plasma humano	4 ciclos en -70°C	2 ciclos en -20°C
Proporción de conversión de BH4 a L-Biopterina	47% (al menos 12 semanas)	??
Estabilidad a largo plazo de plasma K2 EDTA	38 días en -70°C	?? (7 días en -20°C)
Integridad de dilución	15000 ng/mL diluido 10 veces	??
Selectividad	BH4	Biopterina total

FIG. 18

Concentración de biopterina en plasma y proporción de forma reducida después de administración de dosis simple de sapropterina a ratas

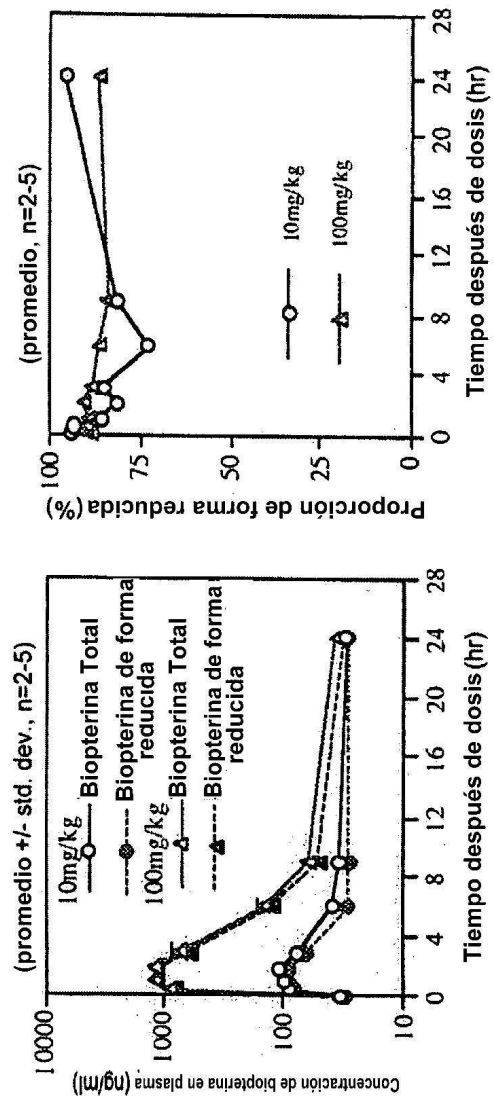


FIG. 19

Parámetros farmacocinéticos de biopterinas totales en plasma después de administración oral simple de sapropterina en ratas

Dosis	Ruta de Administración	Cendo ¹ (ng/ml)	Cmax (ng/ml)	ΔCmax ² (ng/ml)	Tmax (hr)	ΔAUC ³ (ng·hr/ml)	T _{1/2} (h)	F ⁴ (%)
(mg/kg)								
100	p.o.	38.2	1227	1189	1.0	4571	1.1(2-6 h)	11.8
10	p.o.	33.5	108	75	2.0	265	1.1(2-6h)	6.8
10	i.v.	33.5	–	–	–	3881	0.6(0.5–3h)	
1	i.v.	33.5	–	–	–	529	0.3(0.5–3h)	

Concentración de biopterina total endógena

Cmax-Cendo

Computarizado con base en regla trapezoidal, utilizando el valor (AC) obtenido sustrayendo Cendo del valor medio realmente (C) de la concentración de plasma

La biodisponibilidad (F) fue computarizada utilizando AAUC al momento de inyección intravenosa 10-mg/kg

$$F = \frac{AAUC_{po}}{(DOSE_{po}) / (AAUC_{iv} / 10 \times 100)} (\%)$$

Sapropterina Lotes -s:9996202, 8885Y05
(valor promedio de 2 a 5 animales).

FIG. 20

Parámetros Farmacocinéticos de Biopterinas Totales en Plasma Después de Administración Oral Simple de Sapropterina en Monos.

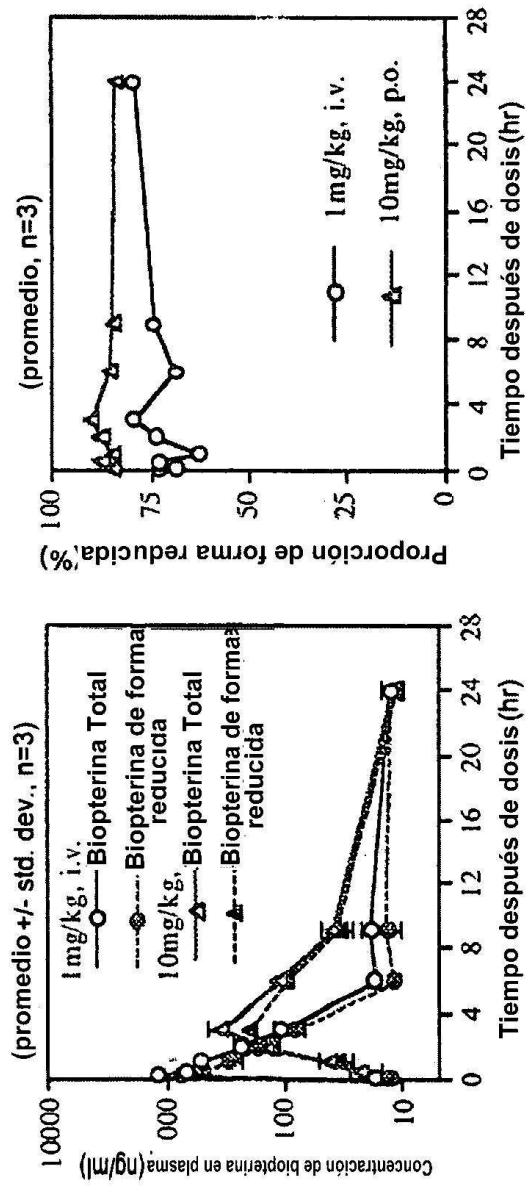


FIG. 21

Parámetros Farmacocinéticos de Biopterinas Totales en Plasma Después de Administración Oral Simple de Sapropterina en Monos.

Dosis (mg/kg)	Ruta de Administración	Cendo ¹		Cmax (ng/ml)	ΔCmax ² (ng/ml)	Tmax (hr)	ΔAUC ³ (ng-hr/ml)	T _{1/2} (hr)	F ⁴ (%)
		(ng/ml)	(ng/ml)						
10	p.o.	17.4±1.3	344±149	344±148.5	2.9±0.2	1301±144	1.42±0.17	9.0	
1	i.v.	17.1±2.1				1449±68.4	0.82±0.14		

Concentración de biopterina total endógena
Cmax-Cendo
Computarizado con base en regla trapezoidal, utilizando el valor (AC) obtenido sustrayendo Cendo del valor medio
realmente (C) de la concentración de plasma
La biodisponibilidad (F) fue computarizada utilizando AAUC al momento de inyección intravenosa 10-mg/kg
 $F = (AAUC_{po}) / (DOSE_{po}) / (AAUC_{iv}) / 10 \times 100$ (%)
Sapropterina Lotes :9996202, 8885Y05
(valor promedio ± error estandar, n=3)

FIG. 22 :Programación de eventos

Visita	Tratamiento de Etiqueta abierta					Seguimiento Semana 5
	Clasificación	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	
Consentimiento informado	X					
Peso	X	X ⁵				X
Signos Vitales	X	X	X	X	X	X
Revisión Física	X					X
Pruebas de laboratorio clínica	X					X
Prueba de embarazo	X	X			X	X
Clasificación de Fármacos de Abuso en Orina	X	X	X	X	X	X
Medicamentos concomitantes	X	X	X	X	X	X
Eventos Adversos		X	X	X	X	X
Muestreo de Sangre PK		X	X	X	X	X
Sumistro de fármaco de estudio		X	X	X	X	

Pruebas de laboratorio clínicas incluyeron hematología química, urianálisis, hepatitis B y C y VIH en clasificación Hematología química y urianálisis únicamente fueron repetidos en la descarga del estudio. Aproximadamente 20 mL de sangre fueron recolectados en las vistas que incluyeron prueba de laboratorio clínicas.

La clasificación de fármaco y orina incluye pruebas para anfetaminas, benzodiazepinas, barbituratos, cocaína, canabinoides y opiatos.

Las muestras farmacocinéticas fueron tomadas en los siguientes puntos de tiempo durante cada periodo de tratamiento: Pre-dosis 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 18.0 y 24.0 horas posteriores a la dosis. Aproximadamente 80 mL de sangre fueron extrídas durante cada periodo de tratamiento (5 mL por punto de tratamiento) para análisis PK.

Las pruebas de embarazo de orina adicionales se llevaron a cabo en cualquier visita en donde el estado de embarazo estaba en cuestion, y se llevaron a cabo pruebas de embarazo en suero en el caso de cualquier de los resultados de prueba de embarazo en orina positivos o equivocados

Peso en el periodo de tratamiento de la semana 1 fue utilizado para calcular la dosis.

FIG. 23

Concentraciones en plasma promedio de BH después de administración oral de 10 mg/kg de fenoptin como tabletas disueltas intactas bajo condiciones en ayuno y tabletas intactas bajo condiciones de alimentación a voluntarios saludables-ejes lineales

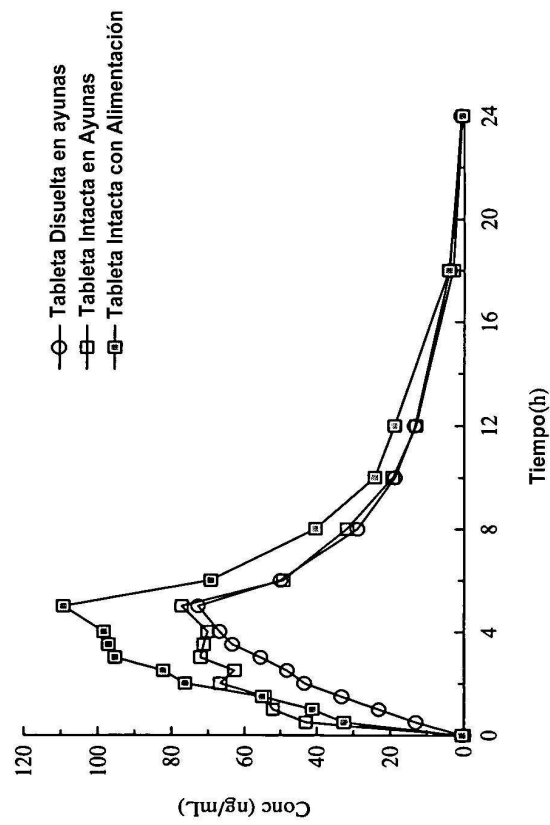


FIG. 24

Concentraciones en plasma promedio de BH después de administración oral de 10 mg/kg de fenoptin como tabletas disueltas intactas bajo condiciones en ayuno y tabletas intactas bajo condiciones de alimentación a voluntarios saludables-ejes semi-logarítmicos

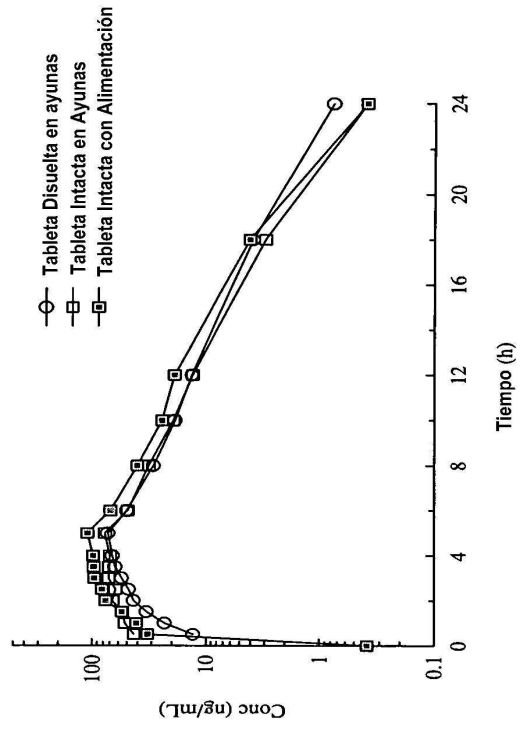


FIG. 25

Resumen de parámetros farmacocinéticos de BH después de administración oral de 10mg/kg de fenoptin como tabletas disueltas e intactas bajo condiciones en ayuno y tabletas intactas bajo condiciones de alimentación a voluntarios saludables

Parámetro	Tableta Disuelta en ayunas	Tableta Intacta en Ayunas	Tableta Intacta con Alimentación
Cmax (ng/mL)	80.3 ± 63.3 [30] (69.4)	91.2 ± 36.3 [30] (84.0)	121 ± 33.6 [30] (116)
Tmax (h)	4.00 [30] (2 - 6)	3.50 [30] (1 - 5)	4.00 [30] (1 - 5)
A UC(0-t) (h•ng/mL)	479 ± 292 [30] (420)	550 ± 214 [30] (505)	709 ± 221 [30] (675)
A UC(inf) (h•ng/mL)	597 ± 336 [22] (528)	704 ± 202 [19] (670)	825 ± 256 [23] (784)
λz (h ⁻¹)	0.2101 ± 0.1326 [22]	0.2099 ± 0.0942 [19]	0.2104 ± 0.0918 [23]
t½ (h)	5.31 ± 4.42 [22]	4.47 ± 3.37 [19]	4.28 ± 2.79 [23]

Desviación promedio + estándar excepto para Tmax para el cual se reportó la media. Los números en los paréntesis cuadrados con el número de sujetos para los cuales el parámetro puede ser estimado y los números en los paréntesis son los promedios geométricos para Cmax, AUC(0-t) y AUC(inf) y los rangos para Tmax.

FIG. 26

Comparación estadística de parámetros farmacocinéticos para BH después de administración oral de 10 mg/kg de fenoptina como tabletas intactas utilizadas bajo condiciones con alimentación en voluntarios saludables.

Parámetro	Proporción Promedio Geométrica (%) ¹	
	Estimado	90% Intervalo de Confiabilidad
Tableta disuelta vs Intacta (en ayuno)		
C _{max}	120.98	104.21 → 140.44
AUC(0-t)	120.33	104.12 → 139.06
AUC(inf)	118.04	98.16 → 141.96
Tableta Intacta-con alimento vs en ayuno		
C _{max}	138.63	119.42 → 160.93
AUC(0-t)	133.69	115.68 → 154.50
AUC(inf)	125.61	104.29 → 151.30

Con base en análisis de datos transformados-log naturales

FIG. 27

Estabilidad de BH4 (1mg/ml) en una solución acuosa en manitol al 5%

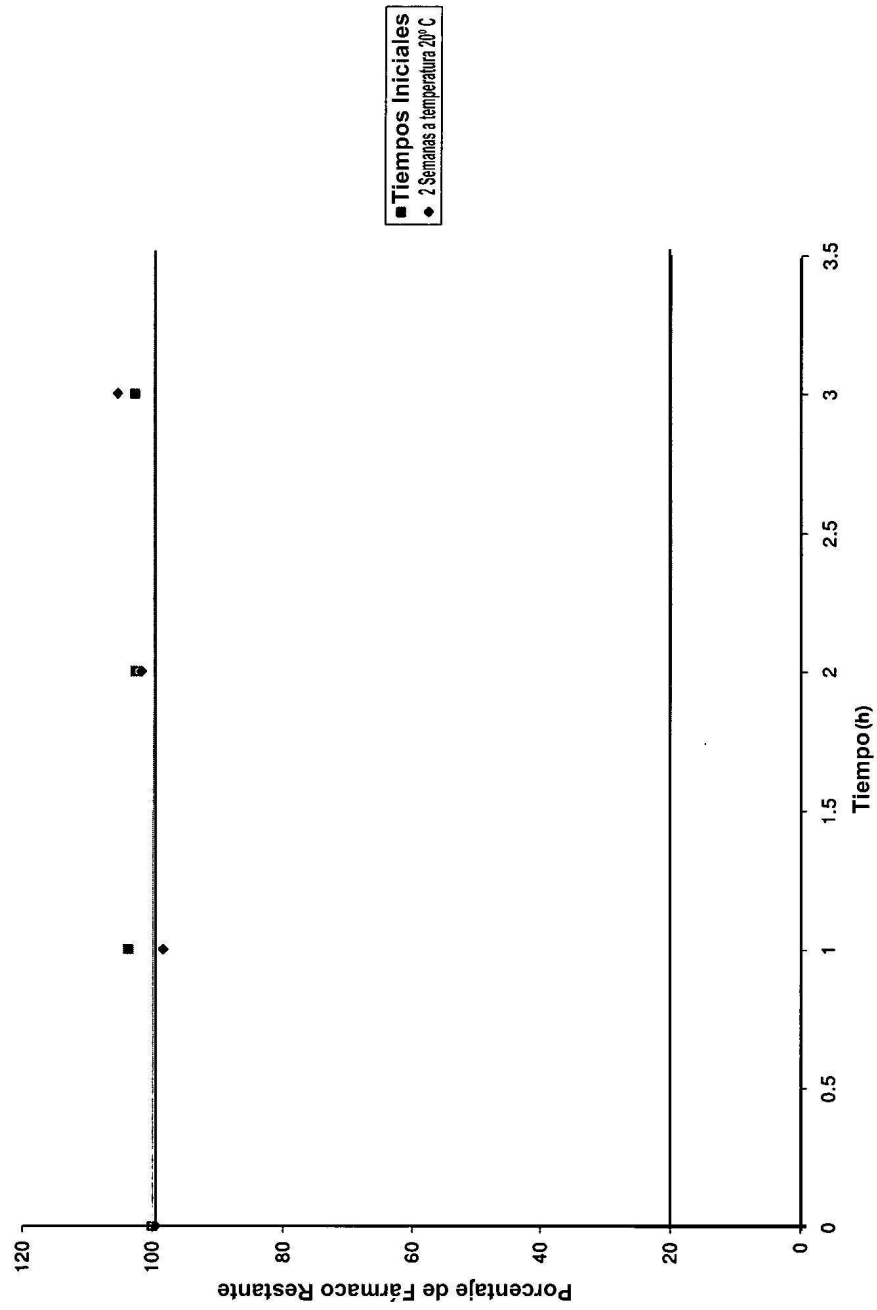


FIG. 28

Perfil de disolución de prototipo de cápsula GMO

Aparato USP Paddle, 50 rpm, 37°C, 900ml, 0.1 N HCl (110210-28, 110210-76E)

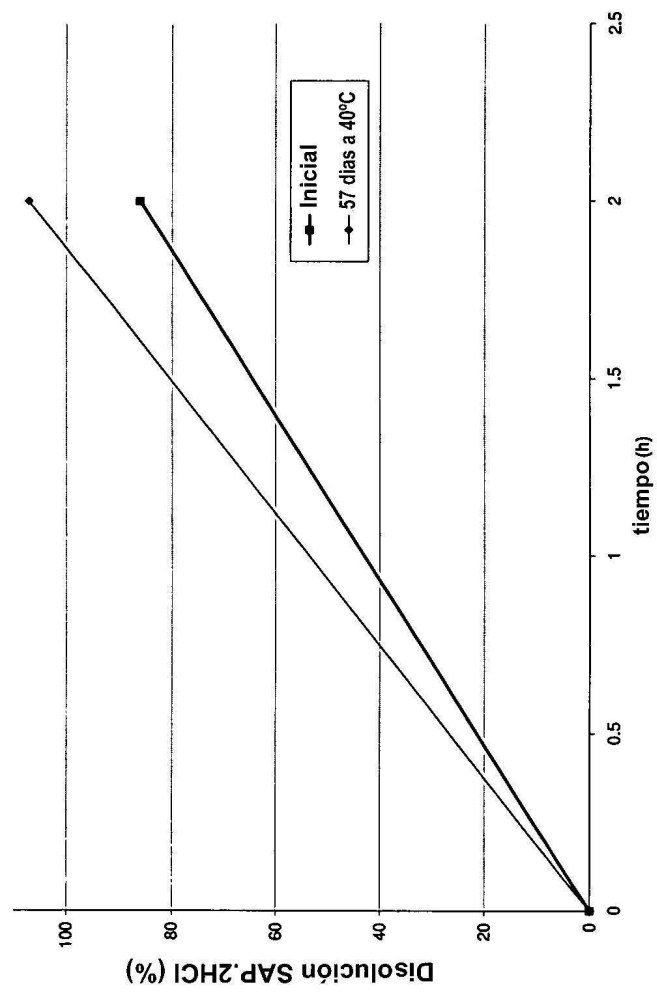


FIG. 29

Perfil de disolución de prototipo de tableta de bioadhesivo (80 mg BH4)

Aparato USP Paddle, 50 rpm, 37°C, 900ml, 0.1 N HCl (11229-04, 11229-85)

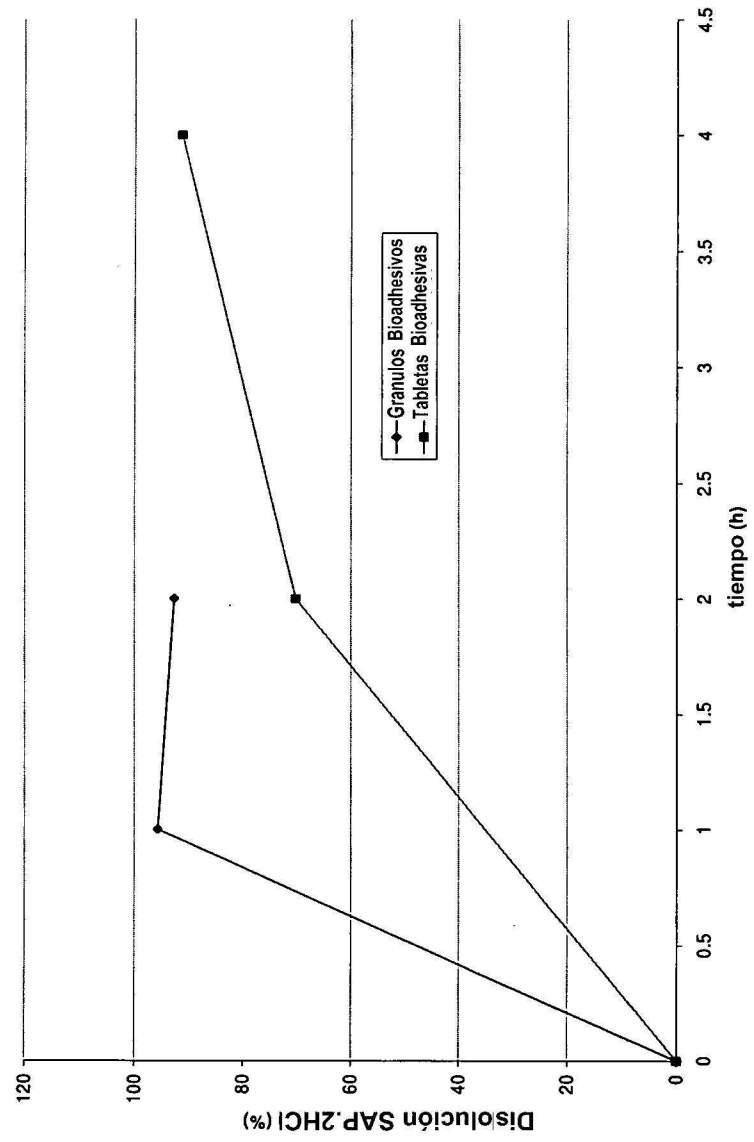


FIG. 30

Perfil de disolución de prototipo de liberación sostenida (80mg, SAP-2HCl) con
20% de HPMC en diversos grados de viscosidad

Aparato USP Paddle, 50 rpm, 37°C, 900ml, 0.1 N HCl

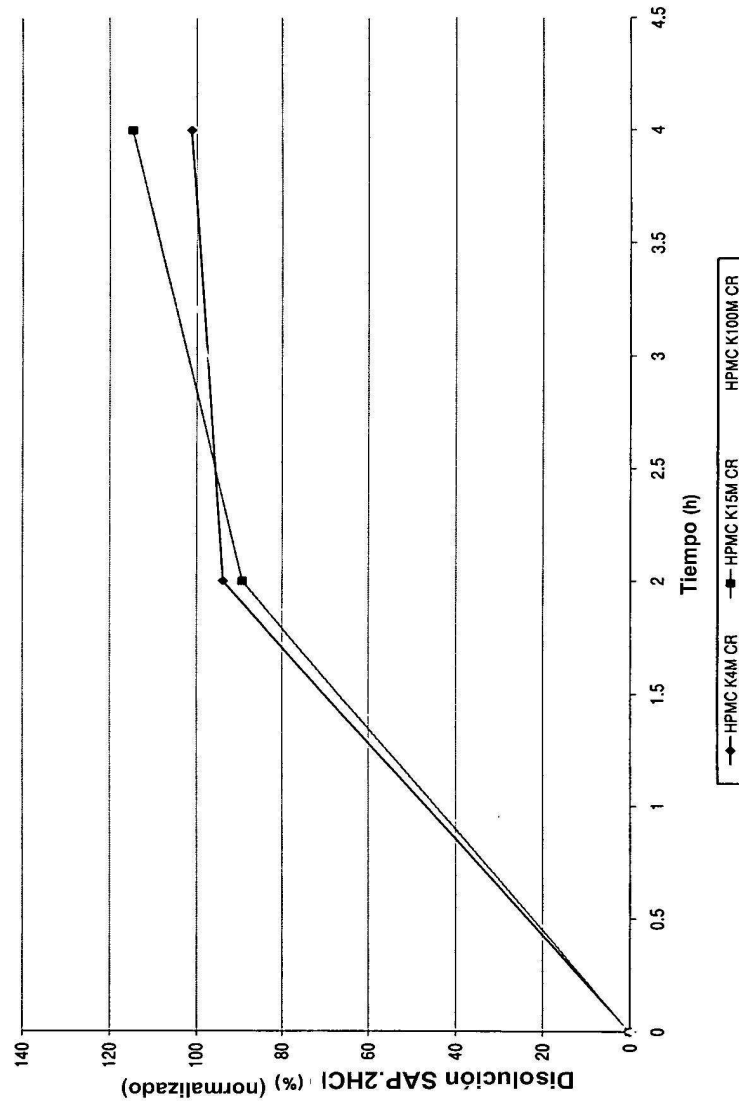


FIG. 31

Perfil de disolución de prototipo de liberación sostenida 80 mg BH4) que contiene 20% a 40% de methocel K100M CR

Aparato USP Paddle, 50 rpm, 37°C, 900ml, 0.1 N HCl

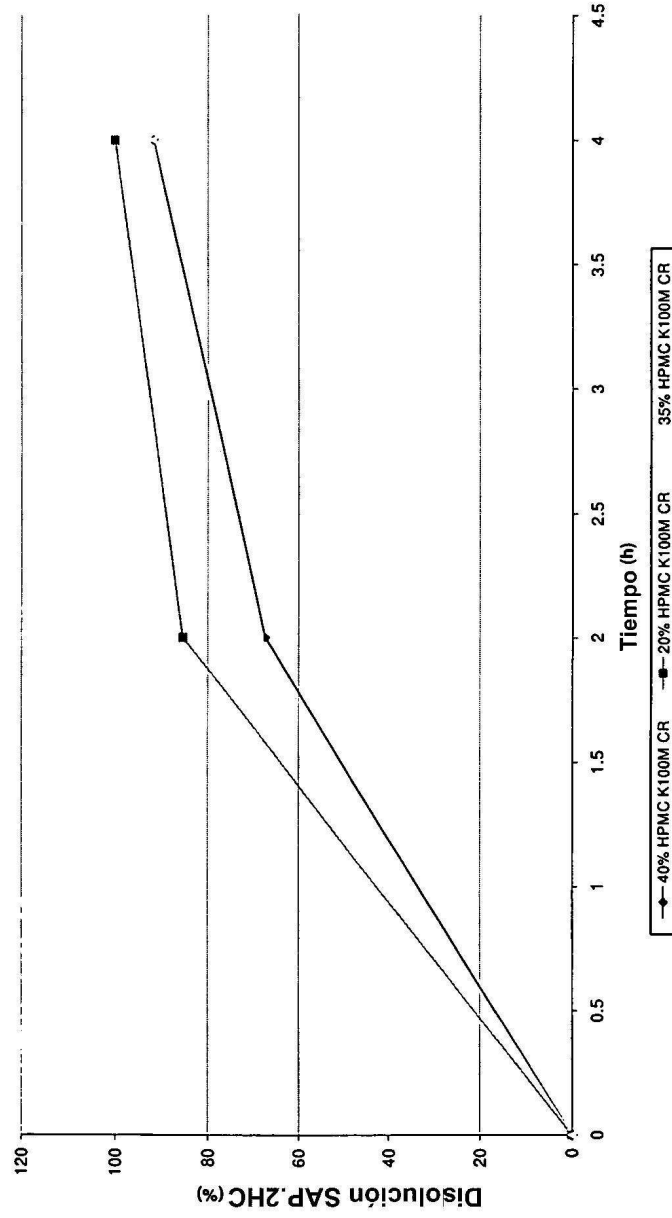


FIG. 32

Diagrama esquemático de forma de dosificación flotante

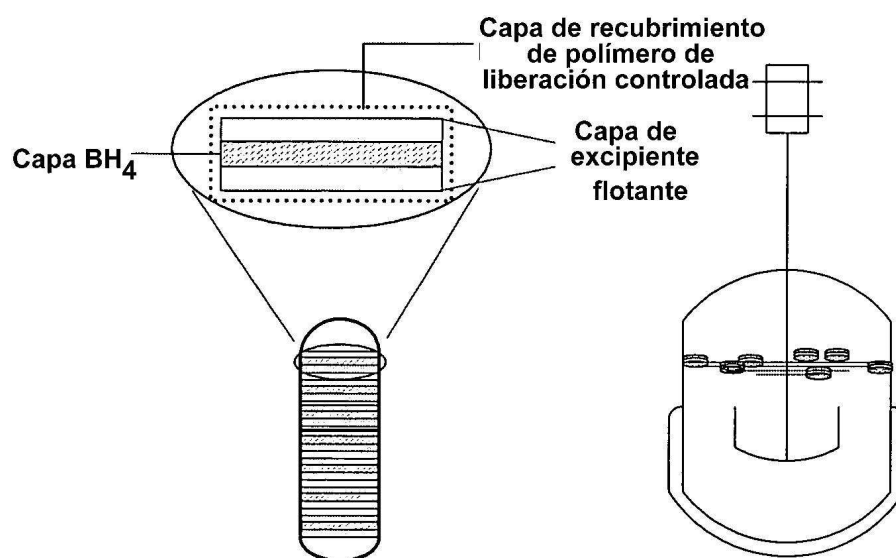


FIG. 33

Perfil de disolución de prototipo de sistema flotante (80 MH BH4) con diversos niveles de recubrimiento PEG

Aparato USP Paddle, 50 rpm, 37°C, 900ml, 0.1 N HCl

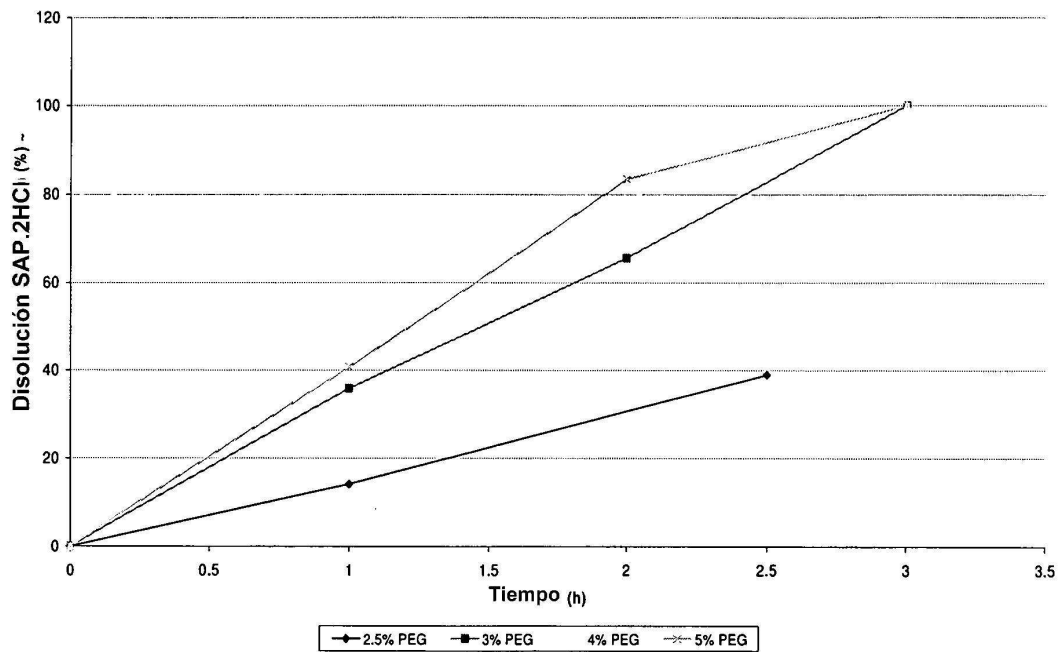


FIG. 34

Diagrama esquemático de forma de dosificación de generación de gas

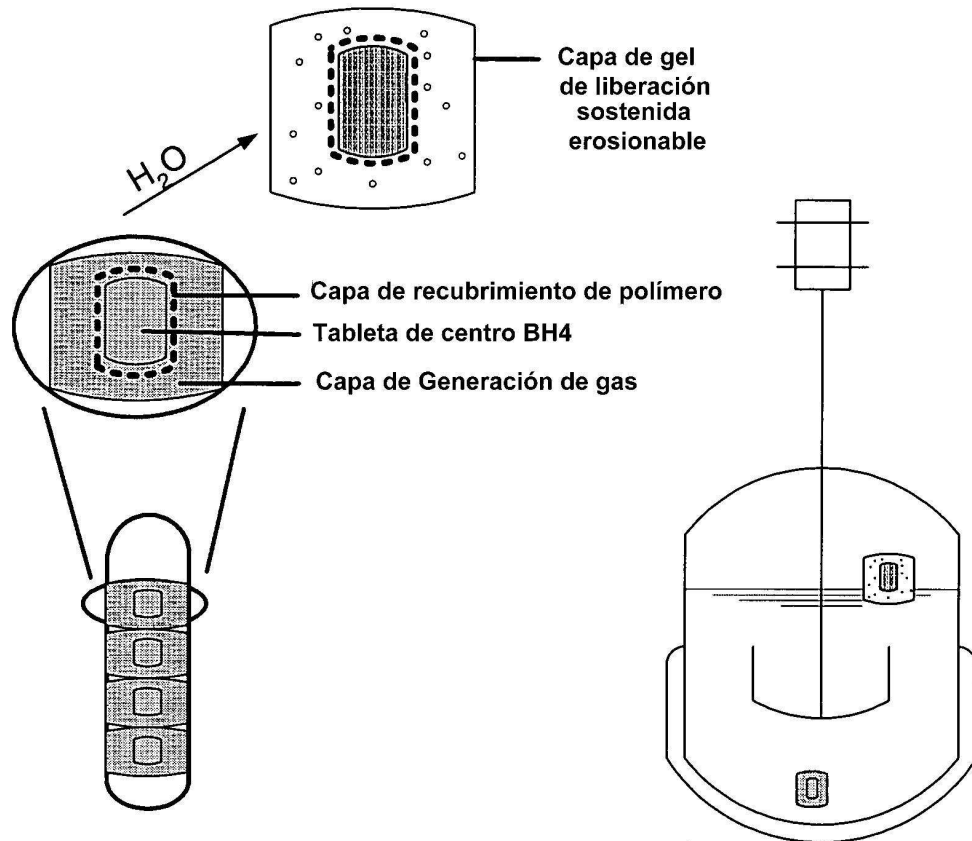


FIG. 35

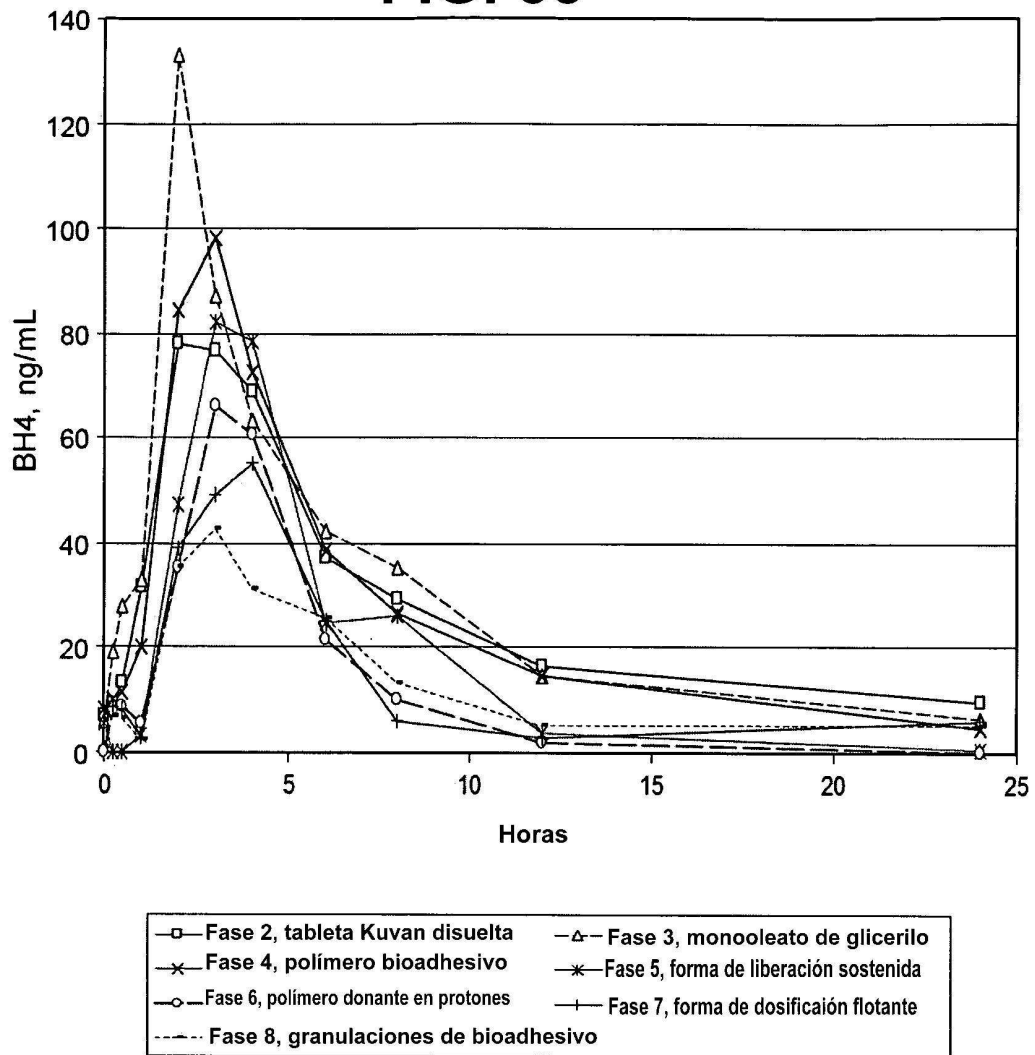
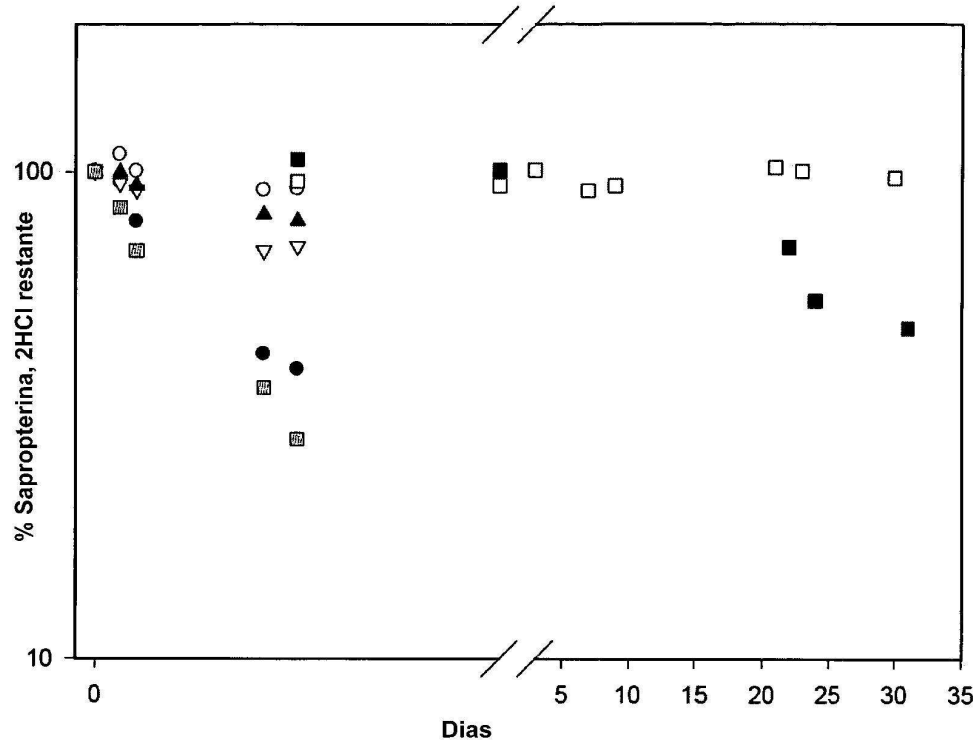


FIG. 36

Estabilidad de BH4 en amortiguador de pH 4 en la presencia y ausencia de antioxidantes y rociado con árgon



- Únicamente amortiguador
- Amortiguador + ácido ascórbico
- ▽ Amortiguador + cisteína
- ▲ Árgon rociado
- Oxígeno rociado
- Amortiguador + ácido ascórbico + L-cisteína
- Amortiguador + ácido ascórbico + L.cisteína + Argón rociado

FIG. 37

Estabilidad de BH4 en amortiguador de pH 7 en la presencia y ausencia de antioxidantes y rociado con argón

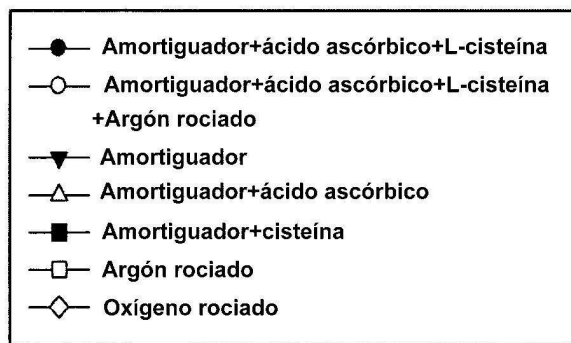
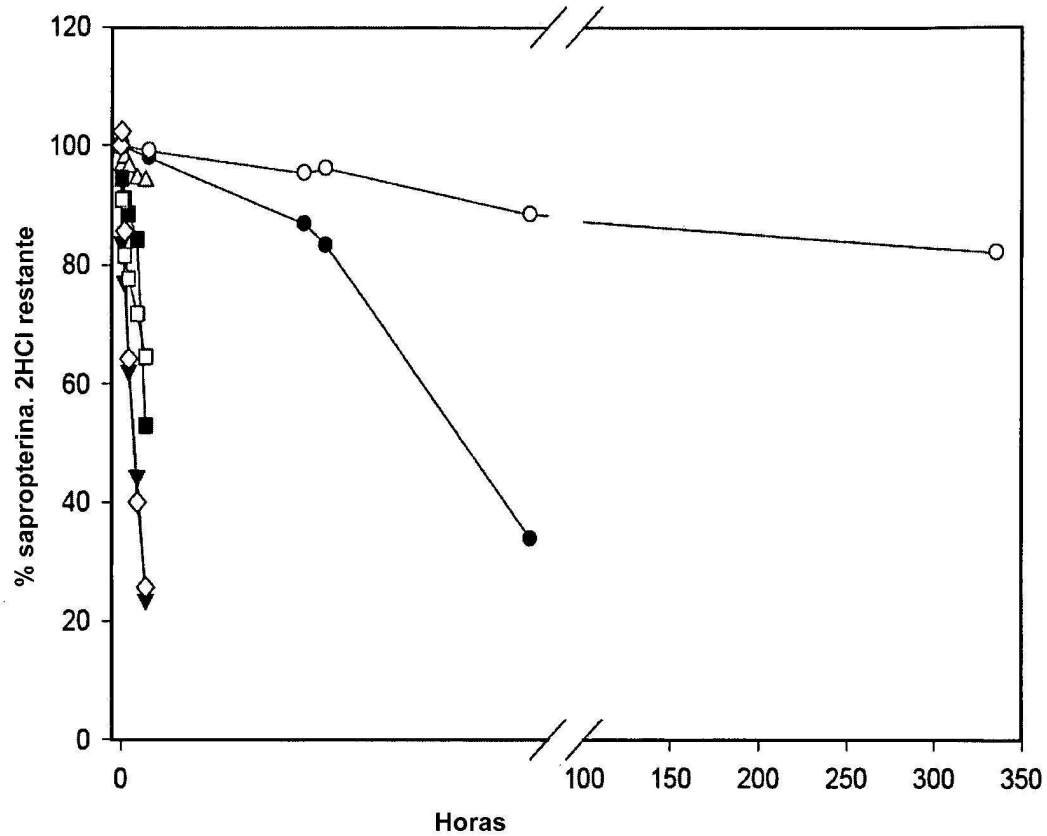


FIG. 38

Estabilidad de BH4 restante en solución de amortiguador pH 4
con tiempo como una función de concentración

