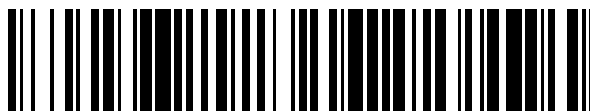


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 315**

51 Int. Cl.:

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 47/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2006 E 06820561 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1988877**

54 Título: **Composiciones terapéuticas que comprenden ingenol-3-angelato**

30 Prioridad:

16.12.2005 GB 0525680

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

19.05.2014

73 Titular/es:

**LEO LABORATORIES LIMITED (100.0%)
285 Cashel Road, Crumlin
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

**BROWN, MARC BARRY;
CROTHERS, MICHAEL EDWARD DONALD y
NAZIR, TAHIR**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 461 315 T3

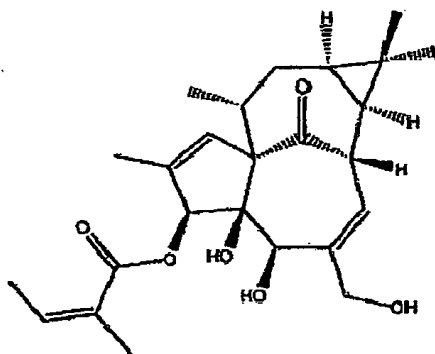
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

Composiciones terapéuticas que comprenden ingenol-3-angelato

- 5 La presente invención se refiere a composiciones de compuestos obtenibles a partir de especies de *Euphorbia* que son útiles en el tratamiento de cánceres de piel.

10 El compuesto ingenol angelato puede ser aislado de diversas especies de *Euphorbia*, y particularmente de *Euphorbia peplus* y *Euphorbia drummondii*. Ingenol angelato existe en tres isoformas; ingenol-3-angelato (isoforma 'b'), ingenol-5-angelato (isoforma 'a') e ingenol-20-angelato (isoforma 'c'). El primero de estos también se denomina en la presente descripción como I3A y tiene la siguiente estructura:



- 15 Se encontró que el ingenol angelato es muy tóxico para las células de cáncer de la piel a través de la rápida alteración mitocondrial y muerte celular por necrosis primaria, sin afectar a las células sanas.

20 US-A-6432452 describe compuestos presentes en un principio activo derivado de plantas de las especies *Euphorbia peplus*, *Euphorbia hirta* y *Euphorbia drummondii*, que muestran citotoxicidad selectiva contra varias líneas celulares de cáncer diferentes. Los compuestos son útiles en el tratamiento eficaz de cánceres, particularmente melanomas malignos y carcinomas de células escamosas (SCC). Los compuestos se seleccionan de jatrofanos, pepluanos, paralianos e ingenanos. El compuesto preferido es un ingenano sustituido con angeloilo obtenido de la savia de *Euphorbia peplus*.

25 Otra técnica anterior relevante incluye: Ogbourne S. M. y otros, Antitumor Activity of 3-Ingenyl Angelate: Plasma Membrane and Mitochondrial Disruption and Necrotic Cell Death, *Cancer Research* 64, 2833-2839, 2004.

30 Cantidades microgramo de ingenol angelato son típicamente terapéuticamente eficaces. Sin embargo, la tendencia de la isoforma 'b' a experimentar reordenamiento de la isoforma 'a' y posteriormente a la isoforma 'C' presenta un problema de formulación, donde se desea restringir la formulación a cualquiera de una isoforma específica o a una relación de isoformas. Esto es particularmente un problema con I3A, ya que las diferentes isoformas tienen diferentes solubilidades.

35 Existe una necesidad de un tratamiento tópico eficaz para el cáncer de piel, ya que los tratamientos sistémicos que implican otros fármacos necesariamente resultan en la exposición de las células sanas susceptibles, en partes no objetivo del cuerpo, a los productos químicos citotóxicos. Adicionalmente, los tratamientos sistémicos contra el cáncer, tanto si se administran por vía oral o por inyección, tienen una menor aceptación del paciente.

Hay una necesidad de proporcionar una formulación estable de ingenol angelato, preferentemente para la administración tópica.

40 Se ha encontrado ahora, sorprendentemente que el ingenol angelato puede solubilizarse, prácticamente sin reordenamiento entre isoformas, en un solvente aceptable en presencia de un tampón ácido aceptable, miscible.

45 Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una formulación de ingenol angelato para usar en terapia, en donde el ingenol angelato se disuelve en un solvente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol, metil etil cetona, acetato de etilo, éter dietílico, alcohol bencílico, y mezclas de estos, dicha formulación comprende además un agente acidificante farmacéuticamente aceptable que es al menos parcialmente compatible con el solvente y el cual proporciona la formulación con un pH aparente de no más de 4.5 y no menos de 2.5.

La presente invención contempla formulaciones de cualquiera de las isoformas de ingenol angelato, o mezclas de estos. En la actualidad, la isoforma preferida es la isoforma 'b', también denominada aquí I3A. Se debe entender que las referencias al 'ingenol angelato' e 'I3A' incluyen referencia a otras isoformas y mezclas de estas, a menos que sea aparente de otra forma.

5 El ingenol angelato puede disolverse en muchos solventes, y varios solventes se ilustran en el Ejemplo 1 acompañante. Sin embargo, el ingenol angelato es generalmente susceptible a reordenamiento en solventes próticos, y cualquier grado de reordenamiento sustancial, típicamente más allá de aproximadamente 1% para los productos derivados de plantas, pero con mayor preferencia aproximadamente 0.5%, es indeseable en la formulación farmacéutica.

10 En solventes apróticos, que generalmente son solventes que no aportan protones a una solución, tal como polietilenglicol, la disolución puede tomar un tiempo considerable y esto, junto con las temperaturas requeridas, puede llevar además al reordenamiento en una extensión por encima de niveles aceptables.

15 Las sustancias tales como acetona y acetonitrilo son capaces de disolver el I3A, pero generalmente no son farmacéuticamente aceptables, y pueden no ser adecuados para el almacenamiento a largo plazo. Las sustancias tales como metil etil cetona, acetato de etilo, o dietil-éter pueden ser más aceptables pero generalmente se prefiere el alcohol bencílico.

20 Un número de sustancias son adecuados para disolver el I3A, pero no garantizan la estabilidad, y puede observarse niveles de reordenamiento generales inaceptables después de períodos que oscilan entre tan sólo 12 horas y hasta seis meses o un año.

25 En ausencia de agua, u otro solvente prótico, no habrá un pH medible. Bajo tales condiciones, y especialmente a temperaturas elevadas, el reordenamiento es probable. Así, se encontró que es generalmente posible inhibir el reordenamiento por la presencia de un ácido adecuado.

30 Los ácidos adecuados son generalmente ácidos orgánicos, ya que se ha establecido que el I3A puede descomponerse mucho por debajo de aproximadamente un pH de 3, mientras que el reordenamiento es probable que se produzca por encima de un pH de aproximadamente 4.5. Cuando se pretende almacenar la formulación durante períodos de cualquier longitud, como por ejemplo un mes o más, entonces se prefiere que el ácido esté en forma de un tampón. Los tampones adecuados incluyen tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato y tampón de citrato-fosfato, aunque otros tampones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Particularmente, el tampón proporciona un pH aparente de la formulación de no más de 4.5 y no menos de 2.5. Un pH de la formulación de menos de 4 es más preferido, y se prefiere particularmente que el pH aparente de la formulación sea 3.8 o menos, preferentemente alrededor de 3.5, o menos. Un pH aparente de alrededor de 3 es útil. Se encontró que un tampón con un pH de 2.75 es particularmente ventajoso, y confiere un pH aparente de aproximadamente pH 3.5 a la formulación final cuando se usa en las cantidades como se ilustra en los Ejemplos adjuntos. Un intervalo preferido de pH del tampón es entre 2.6 y 2.85, preferentemente pH 2.7 - pH 2.8, y es preferentemente un tampón de citrato. Se apreciará que el ácido generalmente estará en forma de una solución acuosa, preferentemente en agua desionizada, a menos que se indique de cualquier otra forma. Se prefiere el tampón de citrato.

40 Cuando se usa el tampón de acetato, este puede tener típicamente un intervalo de pH de 3.5 a 5.5, mientras que el tampón de citrato-fosfato puede tener típicamente un intervalo de pH de 2.75 a 7.0.

45 Se debe entender que una solución en la que el solvente es aprótico no puede tener un pH, ya que esto es una medida del ion H^+ . Sin embargo, cuando una solución de este tipo es al menos parcialmente miscible con un ácido, o tampón ácido, y este está presente, entonces los intentos de medir el pH producirán un resultado. Las formulaciones preferidas de la invención se elaboran en formas de administración tópica, y comprenderán generalmente una mayoría de tampón, o solución iónica, pero siempre comprenderán solvente aprótico, tal que sólo se puede medir un pH aparente, en lugar de absoluto, ya que el pH medido se refiere solamente al componente iónico. Un medio adecuado para medir el pH aparente es con el medidor de pH Jenway 3320. Como consecuencia, el resultado no puede tener el significado que normalmente se le asigna a una solución iónica, especialmente cuando la cantidad de ácido o tampón es pequeña, pero la importancia es que, en la medida en que algún ambiente iónico se presente, este ambiente es ácido. Como aumenta la cantidad de ácido, entonces el pH aparente se torna más equivalente al pH. Sin estar limitado por la teoría, es probable que ingenol angelato se disuelva principalmente en el solvente aprótico, ya que tiene muy baja solubilidad en agua. La adición posterior de la solución ingenol angelato en el solvente de una solución iónica acidificada permite que se prepare una solución iónica adecuada de ingenol angelato, opcionalmente acuosa, evitando de ese modo la disolución de ingenol angelato directamente en un solvente prótico, que es cuando la mayor cantidad de reordenamiento parece tener lugar. Así, el contacto con un solvente prótico puede resultar inmediatamente en la formación de otras isoformas, pero esto se puede minimizar si se añade una pequeña cantidad de ácido o tampón ácido, cuyos términos se usan como sinónimos en la presente a menos que de cualquier otra forma sea evidente. Incluso el acto de disolución con disolventes próticos, dada la longitud de tiempo y

55

las condiciones necesarias, puede conducir a niveles indeseablemente altos de formación de isoformas, tal es la susceptibilidad del ingenol angelato al reordenamiento.

5 El solvente y el ácido son al menos parcialmente compatibles, ya que se puede formar una preparación estable de los dos. El solvente y el ácido son preferentemente miscibles, y son preferentemente miscibles en todas las proporciones. Particularmente, se prefiere generalmente añadir una pequeña cantidad de tampón al solvente durante, o poco después de la solubilización del ingenol angelato, para mantener el pH a un nivel relativamente bajo. A continuación, puede ser deseable conformar el ingenol angelato solubilizado con un exceso de tampón que se usó durante la solubilización inicial. Las preparaciones estables preparadas con un exceso de tampón se ilustran en el Ejemplo 9, más abajo.

10 Se apreciará que se prefiere que el ácido y el solvente sean suficientemente miscibles para ser capaces de formar una sola fase, aunque los solventes y ácidos no miscibles, o menos miscibles se pueden preparar en forma de emulsiones o microemulsiones. Tales emulsiones pueden ser estables, pero la provisión de una mezcla de solvente y ácido como una sola fase minimiza generalmente aún más cualquier riesgo de reordenamiento del angelato.

15 Los solventes que son particularmente útiles en la presente invención son aquellos que exhiben rasgos tanto hidrófilos y lipófilos, tales como sistemas de anillos que son preferiblemente homocíclico, y que tienen grupos hidroxilo sustituido en el mismo, pero separado por al menos un átomo de carbono de la estructura de anillo. Un ejemplo particularmente preferido de un solvente de este tipo es el alcohol bencílico.

20 Aunque es posible utilizar un ácido en lugar de un tampón, en general se prefiere usar un tampón ácido para minimizar la fluctuación en el pH. Como tal, se apreciará que, aunque que el término "tampón" generalmente se usa en este documento, este término también abarca ácidos y preparaciones de ácido, cuando sea adecuado. Un tampón particularmente preferido es el tampón de citrato, pH 3 o inferior, preferentemente pH 2.75. En alcohol bencílico, una cantidad 2.5% p/p de tampón de citrato pH 2.5 generalmente producirá un pH aparente no medible pero, a cantidades superiores produce un pH de alrededor de pH 3. La relación entre el pH del tampón y el pH aparente se explora en los Ejemplos adjuntos. A bajas cantidades de tampón cuando se disuelve I3A en el solvente, se prefiere simplemente mantener el ambiente ácido, y la naturaleza del tampón preferido en estos niveles es similar a la naturaleza del tampón preferido cuando se diluye la formulación posteriormente para uso. Generalmente se prefiere acidificar el solvente, preferentemente alcohol bencílico, con una cantidad de tampón ácido, preferentemente entre 1 y 10% en peso, con mayor preferencia entre 2 y 5%, antes de la adición de I3A.

30 Aunque la formulación no tiene que ser diluida para su uso, generalmente es el caso que el I3A es una sustancia potente y las soluciones madre de I3A en solvente, preferentemente alcohol bencílico, pueden prepararse para el almacenamiento, preferentemente a 8°C o por debajo. Tales soluciones madre pueden diluirse después, preferentemente con tampón, según se desee, cuando se prepara cualquier formulación o preparación final.

35 La cantidad de tampón que se usa cuando se solubiliza el ingenol angelato puede variar entre aproximadamente 0 y 100%. Cuando la cantidad es 0, se prefiere añadir una cantidad de tampón poco después de añadir el ingenol angelato al solvente, para minimizar la probabilidad de cualquier reordenamiento que tenga lugar. Se prefiere generalmente evitar el uso de cantidades de tampón mayores que 100% en peso del solvente, ya que la disolución directamente en el tampón generalmente no es fácilmente alcanzable. Se prefiere emplear el tampón como un medio para mantener el pH aparente del solvente en un nivel bajo, sin proporcionar cualquier cantidad sustancial de solvente prótico durante la disolución del ingenol angelato. Una vez que el ingenol angelato se ha disuelto sustancialmente, es posible entonces, e incluso puede ser deseable, conformar la formulación con un exceso de tampón que comprende, si se desea, otros constituyentes opcionalmente próticos, tales como antibióticos, por ejemplo. Los niveles preferidos de tampón están en la región de 0.5%-10%, y preferentemente entre 1% y 5%, y se prefiere más aún aproximadamente 2-3% durante la fase de disolución. La fase de disolución comprende disolver al menos una mayoría de ingenol angelato en el solvente, y preferentemente al menos 95% p/p ingenol angelato en el solvente, con mayor preferencia al menos 99% p/p.

40 Las formulaciones de la presente invención se pueden usar directamente, o se pueden almacenar para uso futuro. Adicionalmente, las formulaciones de la presente invención pueden proporcionar una formulación base que puede modificarse después ante del uso. Por ejemplo, como se describió anteriormente, la formulación puede prepararse con un exceso de tampón o se puede formular en un gel, por ejemplo.

45 También se ha encontrado que las formulaciones de la presente invención son generalmente más estables a temperaturas inferiores. Particularmente las formulaciones preferidas de la presente invención, tales como las que comprenden alcohol bencílico y tampón de citrato, pueden exhibir estabilidad sustancial a temperaturas tal altas como 40°C pero, generalmente, un aumento de la estabilidad se observa a temperaturas por debajo de la presión y temperatura ambiente (RTP), y la mayor estabilidad se observa a temperaturas por debajo de aproximadamente 8°C. La congelación no parece mejorar la estabilidad

de modo que, generalmente, la mayor estabilidad se logra simplemente mediante la colocación de las formulaciones de la invención en un refrigerador convencional a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y 8°C.

5 La presente invención proporciona además un proceso para preparar una solución de ingenol angelato, que comprende disolver el ingenol angelato en un solvente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol, metil etil cetona, acetato de etilo, éter dietílico, alcohol bencílico, y mezclas de estos, dicha formulación comprende además un agente acidificante farmacéuticamente aceptable que es al menos parcialmente compatible con el solvente y el cual proporciona la formulación con un pH aparente de no más de 4.5 y no menos de 2.5, dicho ácido se

10 En una alternativa, la presente invención proporciona un proceso para preparar una solución de ingenol angelato, que comprende disolver el ingenol angelato en un solvente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol, metil etil cetona, acetato de etilo, éter dietílico, alcohol bencílico, y mezclas de estos, dicho proceso comprende la adición de un agente acidificante farmacéuticamente aceptable que es al menos parcialmente compatible con el solvente y el cual proporciona la formulación con un pH aparente de no más de 4.5 y no más de 2.5, dicho agente acidificante se adiciona con, antes, o después del ingenol angelato. El agente acidificante es preferentemente un tampón.

15 Se prefiere añadir el ácido, o tampón, suficientemente pronto después de la adición del I3A para asegurarse de que no más de aproximadamente 1%, y preferentemente no más de aproximadamente 0.5%, de la isoforma 'b' se reorganice en la isoforma 'a'. Preferentemente, el ácido o tampón se añade al solvente antes de añadir el I3A, aunque los tres ingredientes se pueden combinar a la vez. Esta última es la opción menos preferida.

20 Este proceso se puede usar además para la preparación de formulaciones de ingenol angelato utilizando otros compuestos y solventes, tal como polietilenglicol, donde la solubilización directa puede estar asociada con un nivel inaceptable de reordenamiento. Aunque I3A se puede disolver en PEG, este requiere en la región de una hora a temperatura elevada, que generalmente conduce a la generación de niveles inaceptables de la isoforma 'a'. Si el I3A se disuelve primero en alcohol bencílico tamponado, después este se puede introducir directamente en el PEG, sin la exposición prolongada al calor. Como sólo se necesita suficiente alcohol bencílico para solubilizar el I3A, entonces la cantidad total de alcohol bencílico en la formulación final PEG solo necesita estar en la región de 1 % p/p o menos.

25 Estas formulaciones pueden mantenerse durante períodos prolongados, especialmente si se mantienen a una temperatura de 8°C o inferior. Las composiciones preferidas contemplan no más de aproximadamente 1%, y preferentemente no más de aproximadamente 0.5%, de reordenamiento de la isoforma 'b' en la isoforma 'a' después de 3 meses, con mayor preferencia 6 meses.

30 La invención proporciona además una formulación para usar en el tratamiento de un cáncer de piel.

35 La invención proporciona además el uso de ingenol angelato en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un cáncer de piel, en donde el ingenol angelato se disuelve en un solvente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol, metil etil cetona, acetato de etilo, éter dietílico, alcohol bencílico, y mezclas de estos, dicha formulación comprende además un agente acidificante farmacéuticamente aceptable que es al menos parcialmente compatible con el solvente y el cual proporciona la formulación con un pH aparente de no más de 4.5 y no menos de 2.5.

40 Los cánceres adecuados para el tratamiento de acuerdo con la presente invención incluyen cánceres de células escamosas y basales.

Se apreciará que 'tratamiento', como se usa en la presente, incluye la terapia y la profilaxis.

45 La presente invención proporciona además un método para tratar un sujeto que sufre de una afección cancerosa de la piel, que comprende la aplicación tópica de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención en el área de la afección cancerosa.

50 Los sujetos adecuados para el tratamiento son los mamíferos, incluyendo seres humanos, primates, animales de ganado (incluyendo vacas, caballos, ovejas, cerdos y cabras), los animales de compañía (incluyendo perros, gatos, conejos, conejillos de indias), los animales salvajes en cautiverio, y los animales de laboratorio, tales como conejos, ratones, ratas, conejillos de indias y hámsters. Las composiciones de la presente invención son particularmente adecuadas para el tratamiento de cánceres de piel humana.

5 Se apreciará que las formulaciones de la presente invención pueden usarse en cualquier profilaxis o tratamiento adecuado de cáncer. Las formas de administración pueden ser cualquiera adecuada, e incluyen cremas, geles, pomadas, lociones, aerosoles, lacas y pinturas para aplicación tópica, polvos, soluciones y suspensiones para las vías respiratorias, soluciones y emulsiones para inyección, cápsulas, jarabes y elixires para la administración oral, y óvulos vaginales y supositorios. Otras formas de administración adecuadas serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y pueden incluir parches transdérmicos, por ejemplo. En una modalidad preferida de la presente invención, las formulaciones de ingenol angelato se formulan para administración tópica.

10 En todos los casos, la formulación inicial es como una formulación de la invención. La formulación se puede preparar en la forma final justo antes de su uso tan pronto como se desea después de la preparación de la formulación, pero por lo general permanece como una formulación de la invención en todo momento.

15 Las formulaciones pueden comprender ingredientes adicionales, como se discute más abajo. Se prefiere particularmente emplear antioxidantes, ya que estos parecen proporcionar una estabilidad mejorada de las formulaciones. Los ejemplos adecuados de antioxidantes incluyen retinol, ácido ascórbico, licopeno, hidroxitolueno butilado, y tocoferol.

20 La cantidad de ingenol angelato requerida para la eficacia farmacéutica resultará evidente para los expertos en la técnica, y pueden adaptarse de conformidad con parámetros fisiológicos, tales como la edad, el peso y el sexo del paciente, así como el tamaño de cualquier lesión. Generalmente puede emplearse una cantidad de ingenol angelato adecuada para proporcionar entre aproximadamente $0.01 \mu\text{g cm}^{-2}$ a aproximadamente 1 mg cm^{-2} , y ese prefiere un intervalo de 0.1 mg cm^{-2} a aproximadamente $100 \mu\text{g cm}^{-2}$. En los Ejemplos adjuntos, se usó una formulación que proporciona $15 \mu\text{g cm}^{-2}$, pero se encontró que las formulaciones de $1 \mu\text{g cm}^{-2}$, o menos, son eficaces. En la alternativa, las formulaciones de la invención pueden contener I3A en una cantidad de 0.001 % (p/p) a 0.15% (p/p), con mayor preferencia hasta aproximadamente 0.1-0.12% (p/p).

25 Las formulaciones tópicas son una modalidad preferida de la presente invención. Con respecto a esto, una propiedad no reconocida anteriormente del ingenol angelato es particularmente útil, ya que se encontró que tienen propiedades vasoconstrictoras. En consecuencia, la distribución sistémica del ingrediente activo se minimiza, debido a la reducción del flujo sanguíneo en la vecindad de tratamiento.

30 Se apreciará que la naturaleza de la formulación determinará la velocidad de permeación a través de la piel. Como tal, se prefiere generalmente que la formulación se prepare de tal manera que se alcance una tasa de permeación de al menos aproximadamente $11 \text{ ng cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$. No hay límite superior especial, aunque se prefiere generalmente que este no exceda de alrededor de $1 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$.

35 Las formulaciones tópicas pueden tener cualquier forma adecuada. Generalmente, se prefiere que exhiban algún nivel de viscosidad, para que puedan dirigirse al área deseada sin que se corran. En consecuencia, se prefiere generalmente formular el ingenol angelato como cremas, geles, ungüentos, y pinturas. Dada la potencia del ingenol angelato, pueden emplearse pinturas, ya que se pueden aplicar con moderación, dependiendo de los niveles de ingrediente activo.

40 Los poloxámeros pueden usarse en las formulaciones preferidas de la presente invención. Son copolímeros que consisten en una molécula hidrófoba de poloxipropileno (POP) intercalada entre dos moléculas hidrófilas de poloxietileno (POE). Así, tienen la capacidad de solubilizar fármacos lipófilos dentro del núcleo hidrófobo. Además, las formulaciones de gel de base acuosa del poloxámero presentan propiedades termo-reológicas, que pueden ser ventajosas para la liberación localizada, sostenida de fármacos. Por encima de una cierta temperatura, conocida como la temperatura micelar crítica (CMT), la viscosidad del gel de poloxámero aumenta dramáticamente. Un aumento de la viscosidad conduce a una disminución en la difusión de cualquiera de los fármacos disueltos en el gel que retrasa la administración del fármaco a partir del gel y conduce a la liberación sostenida. El aumento de la viscosidad puede proporcionar además un 'depósito' prolongado, localizado en el sitio de acción.

45 La cmt es dependiente de un número de variables tales como la concentración de poloxámero y otros aditivos tal como propilenglicol. Idealmente, la CMT debe estar a una temperatura tal que la formulación se puede inyectar en la lesión como un líquido (facilidad de administración) y después del contacto con la temperatura del cuerpo se forma un gel con el objetivo de lograr una liberación localizada, sostenida del fármaco. Cinco poloxámeros se listan en la USP, e incluyen el poloxámero 188 y poloxámero 407. El poloxámero 188 se aprobó como un excipiente para las formulaciones IV (<http://www.accessdata.fda.gov>).

50 Los geles de poloxámero se han usado para la administración subcutánea de insulina (Barichello y otros, 1999) y otros sistemas de entrega de fármacos para uso percutáneo (Tobiyama y otros, 1994). Un copolímero particular, el poloxámero 407 se administró subcutáneamente para la liberación lenta de péptidos y proteínas terapéuticas, que incluyen interleucina-2

y hormona del crecimiento humana (Morikawa y *otros*, 1987; Katakama y *otros*, 1997). Después de la administración, los geles liberan lentamente las moléculas de proteínas atrapadas durante un período de 1-2 días. Además, una fracción sustancial de este poloxámero eventualmente se sometió a la excreción renal.

5 Los poloxámeros son generalmente vistos como materiales no tóxicos y no irritantes. Los estudios de toxicidad animal, con perros y conejos, demostraron los poloxámeros que son no irritantes y no sensibilizantes cuando se aplican, en concentración de 5% p/v y 10% p/v, a los ojos, encías y piel. En un estudio de 14 días de administración intravenosa a conejos, en concentraciones de hasta 0.5 g/kg/día, no se observaron efectos adversos evidentes. Un estudio similar con los perros no mostró también efectos adversos a niveles de dosis de hasta 0.5 g/kg/día. Además, no se observó hemólisis de las células sanguíneas humanas durante 18 horas a 25°C, con 0.001-10% p/v de soluciones de poloxámero (Wade y Weller, 1994). Sin embargo, la hiperlipidemia en ratas se informó cuando se introdujo una inyección intraperitoneal (IP) (1.0 g/kg) de poloxámero 407 (Wasan y *otros*, 2003).

15 Los aceites se pueden usar además en la presente invención. El uso de una emulsión basada en la formulación intralesional se informó para el tratamiento de la soriasis (Ho y *otros*, 1990). Antes de la administración, un vehículo, tal como aceite de ricino polioxietilado, se diluye normalmente con solución salina para formar la emulsión. Sin embargo, nuestros estudios demostraron que la dilución de I3A con solución salina normal aumenta la conversión de isoforma 'b' en 'a'. Esta conversión puede ser minimizada si el tiempo de administración de la formulación es corto.

20 Hay una serie de productos lipófilos que se formulan como soluciones oleosas para las administraciones intramusculares (IM), por ejemplo enantato de prolixina (Bristol Myers Squibb). El vehículo (aceite) usado varía ampliamente de los aceites vegetales tal como aceite de araquís (usado con benzoato de bencilo en la inyección de dimercaprol B.P.) y aceite de sésamo (usado en inyecciones de depósito de la inyección de enantato de flufenazina B.P.). El uso de vehículos oleaginosos puede demorar la absorción debido a la partición retrasada del fármaco desde el aceite hasta los fluidos corporales acuosos (Ford, 1987). Cuando se inyecta en un medio acuoso (tal como el tejido muscular) un fármaco relativamente lipofílico tal como I3A, disuelto en una fase de aceite, tendrá una tendencia de no dejar el aceite y particionarse 'instantáneamente' en la fase acuosa. De esta manera un efecto de liberación sostenida se puede lograr.

30 Pueden emplearse formulaciones bucales. La administración por vía transmucosa de agentes terapéuticos es una forma de administración popular, debido a que las membranas mucosas son relativamente permeables, permitiendo la rápida absorción de un fármaco en la circulación sistémica y evitando el primer paso del metabolismo. Los productos transmucosa pueden ser diseñados para ser administrados a través de la vía nasal y vía oral/bucal usando mucoadhesivos. En el desarrollo de estos sistemas de administración de fármacos, la mucoadhesión del dispositivo/formulación es un elemento clave. El término 'mucoadhesivo' es de uso general para los materiales que se adhieren a la capa de mucina de una membrana biológica. Los polímeros mucoadhesivos se han usado en muchas formas de dosificación diferentes, en esfuerzos para alcanzar la liberación sistémica y localizada de fármacos a través de las diferentes mucosas. Estas formas de dosificación incluyen tabletas, parches, cintas, películas, semisólidos y polvos.

40 Para servir como polímeros mucoadhesivos, los polímeros deben poseer características fisicoquímicas tales como que sean predominantemente aniónicos con numerosos grupos de formación de enlaces de hidrógeno, propiedades superficiales adecuadas de superficies de moco humectante/tejido de mucosa y suficiente flexibilidad y longitud (peso molecular) para penetrar en la red de moco o hendiduras del tejido. Diversas clases de polímeros se reportan como mucoadhesivos potenciales tales como carbómeros (ácidos poliacrílicos), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) así como también polímeros de origen natural, tales como ácido hialurónico y quitosana.

45 La preparación de formulaciones adecuadas está dentro de la experiencia de los expertos en la técnica, y los excipientes adecuados para la inclusión en cualquiera de estas formulaciones incluyen, por ejemplo, gelificantes, viscosificadores, potenciadores de penetración, conservantes, tales como antibióticos y antifúngicos, e ingredientes cosméticos, tales como aromas y colorantes.

50 Los agentes gelificantes adecuados incluyen: polímeros derivados de celulosa solubles en agua, tales como polímeros de hidroxialquilcelulosa (por ejemplo hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa), carboximetilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa y metilcelulosa, carbómero (por ejemplo carbopol); y carrageninas. El agente gelificante se puede añadir en cualquier cantidad adecuada, tal como 1-5% (p/p). Los agentes gelificantes preferidos son derivados de celulosa, con la máxima preferencia hidroxialquilcelulosa, particularmente hidroxietilcelulosa.

60 Los conservantes adecuados resultarán evidentes para los expertos en la técnica, e incluyen los parabenos (metilo, etilo, propilo y butilo), ácido benzoico y alcohol bencílico. Los conservantes empleados solamente para ese propósito formarán generalmente 1% (p/p) o menos de la formulación tópica final.

Los potenciadores de penetración adecuados incluyen alcohol isopropílico, sulfóxidos (tales como dimetilsulfóxido, DMSO), Azonas (por ejemplo laurocaprama), pirrolidonas (por ejemplo 2-pirrolidona), alcoholes (por ejemplo, decanol), y glicoles (por ejemplo, propilenglicol).

5 Las composiciones preferidas de la invención comprenden:

- a) I3A;
- b) potenciador de penetración;
- c) conservante;
- 10 d) agente gelificante; y
- e) tampón;

en donde la composición tiene un pH aparente de entre 3 y 4, inclusive.

15 Una composición particularmente preferida comprende:

- a) 0.1 % (p/p) I3A;
- b) 30% (p/p) alcohol isopropílico;
- c) 0.9% (p/p) alcohol bencílico;
- 20 d) 1.5% (p/p) hidróxido de etil celulosa; y
- e) 67.5% (p/p) tampón de citrato pH 3, preferentemente pH 2.75.

La invención se describirá ahora con referencia a las Figuras adjuntas, en donde:

25 **Figura 1:** muestra una representación esquemática de una célula Franz.

Figura 2: Porcentaje de la isoforma 'b' en gel de isopropanol (pH 6.5).

Figura 3: Porcentaje de I3A 'b' en 30% IPA/tampón de citrato (pH 3).

Figura 4: Porcentaje I3A 'b' en 100% alcohol bencílico a 2-8 °C, RTP y 40 °C.

Figura 5: Porcentaje I3A 'b' en 100% fenoxietanol a 2-8 °C, RTP y 40 °C.

30 **Figura 6:** muestra un diagrama de flujo para la preparación de 0.1% p/p I3A Formulación 16 y el respectivo placebo. *Para la formulación del placebo se añadieron 0.25 g de alcohol bencílico a 24.75 g de la formulación base.

Figura 7: Valores relativos de G' y G'' para las Formulaciones 4, 14, 15, 16 y 17 (n=5 ± DE).

Figura 8: Valores tan δ correspondientes para las Formulaciones 4, 14, 15, 16 y 17

35 **Figura 9:** Gráfico de cantidad media liberadas después de 26 h (µg/cm²) de I3A 'b' a partir de las formulaciones de 0.1% p/p gel de poloxámero y PEG 400, (n=3 ± SE).

Figura 10: Gráfico de cantidad media liberadas después de 26 h (µg/cm²) de I3A 'b' a partir de las formulaciones de 0.1% p/p de aceite y PEG 400, (n=3 ± SE).

La presente invención se ilustra adicionalmente con respecto a los siguientes Ejemplos, no limitantes.

40

EJEMPLO 1

La estabilidad de I3A se investigó en varios sistemas de solventes, incluyendo acetona, acetonitrilo, metanol/agua, agua, DMSO, tampones de fosfato (rango de pH 4.5 a 7) y tampón de amonio, (pH 4.5) y se demostró que era estable en acetona, acetonitrilo, DMSO, tampón de fosfato pH 4.5 y tampón de amonio (pH 4.5). El reordenamiento del ingenol angelato parece ocurrir en orden de reordenar el isómero 'b' reorganizar a isómero 'a' y después a isómero 'c'. Debido a las pequeñas cantidades de sustancia activa usada, la medida de la estabilidad del compuesto se calculó como la relación del área del pico 'b' respecto al área del pico 'a'.

50 **MATERIALES**

Tabla 1. Suministradores de materiales utilizados en este Ejemplo

Materiales	Suministrador
I3A (ingenol angelato) lote núm. 080402 y lote núm. 300502	Suministrado por Peplin Limited, Australia
β-ciclodextrina sulfobutil éter, 7 sal sódica (Captisol [®]) Lote núm. CY-03A-010244	Cydex Incorporated, USA

Materiales	Suministrador
2-Hidroxiopropil-β-ciclodextrina (Cavaso [®] W7 HP) lote núm. 74BO08 Miglyol 810N Lote núm. 980403 Propilenglicol lote núm. 286991	Wacker-Chemie GmbH & Co., Alemania
Aceite mineral lote núm. 128H0136	Sigma Chemical Co., Reino Unido
Ácido oléico lote núm. 9736588428 Span 80 Lote. núm. 120H0454 Tween 80 lote núm. 44H0121 Polietilenglicol 300 lote núm. 60H0463 DMSO	
Hialuronato de sodio (HA) lote núm. KX00282	Kyowa Hakko Pharmaceuticals Japón
Fosfato monopotásico lote núm. 14286	Aldrich Chemical Co., Reino Unido
Acetato amónico lote núm. A147753001 acético ácido glacial	BDH Laboratory Supplies, Reino Unido
Acetona-grado HPLC Acetonitrilo-grado HPLC Metanol-grado HPLC	Rathburn Chemicals Ltd, Reino Unido
Agua desionizada (Elgastat Option 3A)	Elga Ltd., Reino Unido
Parafilm [®]	American National Cam [™] , Estados Unidos

Todos los excipientes usados en la formulación final de I3A de grado compendial.

MÉTODOS

5

Estudio de estabilidad del I3A en solventes/excipientes

Un estudio de estabilidad del I3A en las siguientes combinaciones solvente/excipientes/excipiente se llevó a cabo durante 14 días (excepto donde se declare lo contrario) a temperatura ambiente:

10

Acetona
Acetonitrilo
Metanol
Metanol/ agua (70/30)

15

Agua
Tampón de fosfato pH 4.5, pH 5.5, pH 6.5, pH 7.0
DMSO*

20

Aceite mineral
Miglyol 810
Polietilenglicol 300
Propilenglicol
Ácido oléico

25

2-Hidroxiopropil-β-ciclodextrina (Cavaso[®]/H₂O)
2-Hidroxiopropil-β-ciclodextrina (Cavaso[®]/PO₄ pH 4.5)

30

Tween 80/Span 80/H₂O
Tween 80/Span 80/PO₄ pH 4.5
β-ciclodextrina sulfobutil éter (Captisol[®])/H₂O**
β-ciclodextrina sulfobutil éter (Captisol[®])/PO₄ pH 4.5**
Hialuronato de sodio (HA)/ PO₄ pH 4.5 ***
Hialuronato de sodio (HA)/H₂O pH 4.5 ***

*10 días de estudio **7 días de estudio ***2 días de estudio

Se preparó una solución madre de I3A en acetonitrilo 0.5 mg/ml. Las alícuotas de 1.0 ml se transfirieron a viales de vidrio para muestras individuales con una bureta; las soluciones se secaron mediante chorro de aire y después se añadió a los viales 1.0 g de la combinación solvente/excipiente/excipientes respectiva. En el día 0, día 5 y día 14, se retiraron alícuotas de las muestras de estabilidad para el análisis por HPLC usando las condiciones cromatográficas descritas en "Estabilidad en DMSO", más abajo. La estabilidad se expresó como la relación de pico 'b' respecto al pico 'a' (y pico de 'c' si está presente), con una alta relación que indica estabilidad en un excipiente en particular.

Análisis por HPLC en la estabilidad de I3A de los excipientes en estudio

Un método HPLC alternativo se desarrolló para separar un "hombro" que aparece en el pico 'b' que se observó en algunas preparaciones de I3A.

Las condiciones cromatográficas empleadas para el estudio de estabilidad de los excipientes fueron como sigue:

Columna:	Hypercarb (ThermoQuest, Phenomenex) (S/no.3-34070)
Longitud de la columna:	100 x 4.60 mm
Temperatura de la columna:	25°C
Precolumna:	C ₁₈ Columbus (Phenomenex) (S/núm. 202678)
Longitud de la precolumna:	50 x 4.60 mm
Fase móvil:	50% v/v tampón de fosfato pH 4.5 / 50% v/v acetonitrilo
Régimen de flujo:	1.0 ml/min
Longitud de onda UV:	230 nm
Volumen de inyección:	10 µl
Tiempo de ejecución:	35 mins

Estudio de difusión preliminar *in vitro*

Una vez que se establecieron la estabilidad del I3A en los excipientes y potenciadores de penetración, un experimento preliminar *in vitro* de difusión puede llevarse a cabo para determinar la permeabilidad del estrato córneo en I3A de algunas formulaciones simples. La célula de Franz de difusión está diseñada para imitar las condiciones fisiológicas y anatómicas de la piel *in situ*. Es una célula estática de fase aire/fluido, que comprende un compartimento donador, compartimento receptor y un puerto con brazo lateral de muestreo (ver Figura 1). La piel quirúrgicamente extirpada se coloca entre las dos mitades con el estrato córneo orientado al compartimento donador para permitir la aplicación del fármaco.

Un experimento inicial de difusión *in vitro* se realizó usando una formulación simple de I3A en miglyol. No hubo flujo del fármaco a todos a través del estrato córneo lo que sugiere que el I3A no se formuló en su máxima actividad termodinámica en el miglyol. Esta formulación se usó en experimentos posteriores de difusión celular como un control negativo y sirvió además para confirmar la integridad del estrato córneo, ya que si no hay difusión del fármaco a partir de esta formulación, se puede asumir que el estrato córneo se mantiene intacto.

Fabricación de las formulaciones

Una formulación de I3A se preparó en tampón de fosfato (pH 4.5) con β-ciclodextrinas (Captisol®) añadidas para aumentar la solubilidad y la estabilidad de I3A, y el flujo del fármaco. Una segunda formulación en DMSO, un potenciador de penetración conocido, se preparó además con propósitos comparativos, así como una formulación en miglyol, que sirvió como control negativo. Se investigó la difusión de I3A través del estrato córneo a partir de estas formulaciones.

Se prepararon las siguientes formulaciones:

Formulación	Descripción
1	I3A / Captisol® (30 mM) / tampón de fosfato pH 4.5
2	Captisol® (30 mM) / tampón de fosfato pH 4.5 control
3	I3A / Miglyol
4	Miglyol control
5	I3A / DMSO / tampón de fosfato pH 4.5
6	DMSO / tampón de fosfato pH 4.5 control

La Tabla 2 muestra el % p/p de cada uno de los ingredientes presentes en las formulaciones. Los ingredientes se pesaron con precisión en viales de vidrio herméticos y agitaron vigorosamente con una barra agitador magnético durante varias horas a temperatura ambiente.

5

Tabla 2. Formulación de I3A para estudio de difusión *in vitro*

Formulación	I3A (300502)		Captisol®(30 mM)		PO ₄ tampón		Miglyol		DMSO		Total	
	Masa (g)	% p/p	Masa (g)	% p/p	Masa (g)	% p/p	Masa (g)	% p/p	Masa (g)	% p/p	Masa (g)	% p/p
1	0.0016	0.08	0.1299	6.54	1.8956	95.38	-	-	-	-	1.9875	100.00
2	-	-	0.1301	6.05	2.0203	93.95	-	-	-	-	2.1504	100.00
3	0.0016	0.08	-	-	-	-	2.0128	99.92	-	-	2.0144	100.00
4	-	-	-	-	-	-	2.0000	100.00	-	-	2.0000	100.00
5	0.0017	0.08	-	-	0.4035	20.04	-	-	1.6080	79.87	2.0132	100.00
6	-	-	-	-	0.4112	20.13	-	-	1.6320	79.87	2.0432	100.00

Selección del fluido receptor

10 2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina (Cavasol®, 1.38 mM) en tampón PO₄ (pH 4.5) fue el fluido receptor usado en este estudio para tratar de mantener las condiciones de inmersión. Una restricción en otros fluidos reservorios, tales como los sistemas de etanol/agua se impuso debido a que la 'retrodifusión' del etanol a través del estrato córneo podría haber degradado la I3A presente en las formulaciones.

15 Preparación de la piel

Una muestra reciente, quirúrgicamente extirpada de la piel humana se obtuvo directamente después de una abdominoplastia. El donador fue una hembra no fumadora de 56 años de edad, blanca de origen europeo. La grasa subcutánea se retiró cuidadosamente la muestra de piel usando pinzas y un bisturí, y después la porción de la piel se sumergió en agua a 60°C durante 45 segundos. La piel se inmovilizó después, la dermis hacia abajo, en un tablero de corcho y suavemente se retiró la epidermis (que comprende el estrato córneo y epidermis viable) de la dermis subyacente. La dermis se desechó y la membrana epidérmica flotó sobre la superficie del agua y se cogió sobre papel de filtro Whatman núm. 1. La hoja epidérmica resultante se secó completamente y almacenó plano en lámina de metal de aluminio a -20 °C hasta su uso.

25 Una sección de la hoja epidérmica (con papel de filtro hacia arriba) se pinzó e incubó durante 4 horas a 4 °C inmerso en 0.1% p/v de solución de tripsina. La piel se incubó adicionalmente además durante 1 hora a 37 °C. El estrato córneo se eliminó físicamente agitando suavemente la pinza con movimientos laterales. La capa de estrato córneo resultante se lavó dos veces con agua desionizada seguido de solución anti-tripsina 0.1 % p/v para bloquear la actividad enzimática y se lavó dos veces más con agua desionizada. El estrato córneo se secó y almacenó plano en lámina de metal de aluminio a -20 °C hasta su uso.

Estudio de difusión de células de Franz

Las células de difusión de Franz calibradas individualmente con un área de superficie difusional promedio de 0.56 ± 0.05 cm² y un volumen receptor promedio de 1.79 ± 0.06 ml se usaron para llevar a cabo los experimentos de difusión. El estrato córneo (preparado como se describió anteriormente) se lavó con tampón de fosfato (pH 4.5), se cortó con un barrenador 10" y montó sobre las células de Franz (ilustradas en la Figura 1). El fluido receptor empleado fue 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (Cavasol®)/ tampón de fosfato (pH 4.5) y este se incorporó a la célula de Franz, agitó constantemente con un agitador magnético y se mantuvo a 37°C. Las membranas se dejaron equilibrar con la fase receptora durante 30 minutos antes de aplicar las formulaciones. Una dosis infinita de cada formulación se aplicó sobre la superficie de la membrana usando una Finpipette® de desplazamiento positivo y las cámaras donadoras se protegieron con Parafilm®. Cinco tiempos de muestreo se investigaron (1, 2, 4, 6 y 24 h) mediante los cuales 200 µl del fluido receptor se retiró cuidadosamente del brazo de la célula de Franz; cada muestra extraída se sustituyó por un volumen igual de fluido receptor fresco (37°C). A lo largo del experimento, para mantener un volumen constante se reemplazaron las pérdidas del fluido receptor debido a la evaporación de la célula de Franz. Las muestras se analizaron *por* HPLC (*supra*).

15 Análisis por HPLC para estudio de difusión *in vitro*

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

Columna:	Hypercarb (ThermoQuest, Phenomenex) (S/no.3-34070)
Longitud de la columna:	100 x 4.60 mm
Temperatura de la columna:	25°C
Precolumna:	C ₁₈ Columbus (Phenomenex) (S/núm. 202678)
Longitud de la precolumna:	50 x 4.60 mm
Fase móvil:	50% v/v tampón de amonio pH 4.5 / 50% v/v acetonitrilo
Régimen de flujo:	1.0 ml/min
Longitud de onda UV:	230 nm
Volumen de inyección:	10 µl
Tiempo de ejecución:	35 mins

Resultados

20 Estabilidad del I3A en solventes y excipientes

La Tabla 3, más abajo, proporciona una indicación de la estabilidad del I3A en los diferentes sistemas solventes. La estabilidad de I3A en los solventes y excipientes después de 14 días (a menos que se indique lo contrario) a temperatura ambiente se cuantificó en términos de la relación de la isoforma 'b' con relación a las isoformas 'a' y 'c', con un predominio de 'b' que equivale a la estabilidad. Los resultados se resumen en la Tabla 3 a continuación: Se asume que para un excipiente en el que I3A no es estable, otros excipientes similares no serán adecuados.

Tabla 3. Resumen de los resultados del estudio de estabilidad de I3A en diversos solventes y excipientes

Solvente/Excipiente	Estable?	Comentarios
Acetona	√	
Acetonitrilo	√	
Metanol	X	Forma Isoforma 'a'
Metanol/agua (70/30)	X	Forman isoforma 'a' y después 'c'
Agua	X	Forman isoforma 'a' y después 'c'
DMSO*	√	
tampón de fosfato pH 4.5	√	
tampón de fosfato pH 5.5	X	Forma isoforma 'a'
tampón de fosfato pH 6.5	X	Forman isoforma 'a' y después 'c'
tampón de fosfato pH 7.0	X	Rápida formación de la isoforma 'c'

Solvente/Excipiente	Estable?	Comentarios
tampón de amonio pH 4.5	√	
Aceite mineral	√	La naturaleza viscosa hace difícil extraer el I3A para el análisis por HPLC
		Precipitación del I3A
Miglyol 810	√	
Polietilenglicol	√	
Propilenglicol	X	Formación de las isoformas 'a' y 'c'
Ácido oléico	X	Dificultad para cuantificar debido a muchos picos de interferencia en el cromatograma. isoforma 'a' presente, el hombro en 'b' ('c' en formación)
2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina (Cavasol®)/H ₂ O	X	Gran pico para isoforma 'c'
2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina (Cavasol®)/PO ₄ pH 4.5	√	Alguna precipitación de I3A
Tween 80/Span 80/H ₂ O	√	
Tween 80/Span 80/PO ₄ pH 4.5	√	
β-ciclodextrina sulfobutil éter (Captisol®)/H ₂ O **	X	Isoformas 'a' y 'c' presentes
β-ciclodextrina sulfobutil éter (Captisol®)/PO ₄ pH 4.5 **	√	
Hialuronato de sodio/H ₂ O***	X	Isoforma 'a' presente
Hialuronato de sodio/PO ₄ pH 4.5****	√	
*10 días de estudio **7 días de estudio ***2 días de estudio		

Estudio de difusión preliminar *in vitro*

5 La Tabla 4 da una comparación del flujo entre las formulaciones de I3A según determinado a partir de la cantidad acumulativa de I3A permeabilizada por unidad de superficie. DMSO es uno de los potenciadores de penetración más precoces y más ampliamente investigados, y se demostró que mejora la penetración percutánea de muchos experimentos de fármacos *in vitro* e *in vivo*. Como tal, DMSO fue un excipiente comparador útil para confirmar la penetración del estrato córneo por I3A. Sin embargo, dada la naturaleza altamente tóxica de este solvente y el hecho de que produce daño irreversible en la piel, DMSO no se puede usar en una formulación final. No hubo permeación del I3A observado con la 10 formulación de miglyol. Una posible explicación para esta pérdida de difusión de I3A a partir del Miglyol través del estrato córneo es que I3A es altamente soluble en este excipiente.

Tabla 4. Comparación del flujo entre las formulaciones de I3A como determinado a partir de la cantidad acumulativa de I3A permeabilizada por unidad de superficie (media ± s.e.m, n= 3 y 4, respectivamente)

Formulación	(µg/cm ² /h)
I3A / Captisol® / tampón de fosfato pH 4.5	1.92 ± 1.02
I3A / DMSO / tampón de fosfato pH 4.5	0.61 ± 0.13

15 Los resultados muestran que I3A difunde a través del estrato córneo (que forma la principal barrera para la difusión de la mayoría de los fármacos) a niveles detectables.

Estudio de estabilidad a 4-8°C

20

Se investigó la estabilidad de I3A en diversos disolventes a 4-8°C. Una solución madre de 1.26 mg de I3A se pesó y se disolvió en 2 ml de acetona. Esta solución madre se usó para preparar las muestras de estabilidad como sigue:

5 Las alícuotas de 100 µl de solución madre se transfirieron a viales de vidrio individuales de HPLC a través de una jeringa Hamilton, con lavado y secado cuidadoso de la jeringa entre cada muestra. Las muestras se secaron con chorro de aire y después se añadieron 0.5 ml del sistema de solvente prueba adecuado. Los sistemas de solventes se probaron por triplicado y se enumeran más abajo:

- 10 1. 100% v/v acetona
2. 100% v/v acetonitrilo
3. 100% v/v metanol
4. 70% v/v metanol: 30% p/p agua
5. 100% p/p agua

15 Muestras blanco se prepararon también por triplicado usando 100 µl de acetona en lugar de solución madre. Las muestras blanco se secaron después rápidamente y 0.5 ml de acetona se añadieron a cada vial. Los viales todos se ondularon, sellaron con parafilm® y colocaron a 4-8°C por la duración del estudio de estabilidad. El análisis por HPLC se realizó en las muestras del día 0, día 1, el día 5 y día 14 del estudio de estabilidad. Las muestras se prepararon para el ensayo en HPLC como se describe más abajo:

20 Las muestras de estabilidad se eliminaron de 4-8°C y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las alícuotas de 100 µl se transfirieron a viales de vidrio de HPLC frescos usando una jeringa Hamilton, con lavado y secado cuidadoso de la jeringa entre cada muestra. Para facilitar el secado de las muestras, 0.5 ml de acetona se añadió a cada vial y después, las muestras se secaron rápidamente por chorro de aire. Las muestras se reconstituyeron con 1 ml de acetonitrilo y se analizaron por HPLC usando la condiciones cromatográficas especificadas anteriormente.

Así, I3A es estable en acetona y acetonitrilo a 4-8°C, como se reflejó con el predominio de pico 'b' para ambos solventes durante los 14 días. En solventes próticos, la formación de isómeros 'a' y después isómero 'c' aumenta rápidamente.

30 Estabilidad a diversos pH

La estabilidad de I3A se investigó a pH 4.5 en dos tampones es decir fosfato monopotásico / fosfato disódico y ácido acético / acetato amónico por 24 h a temperatura ambiente. El análisis por HPLC mostró que I3A es estable en ambos tampones a pH 4.5 es decir hubo una predominancia de la isoforma 'b' (Figura 1) después de 24 h.

35 La estabilidad de I3A se investigó a pH 5.5, 6.5 y 7.0 durante 14 días a temperatura ambiente, y se encontró que disminuye con un aumento en el pH es decir, la formación de isoforma 'a' y posteriormente isoforma 'c' se produce en el día 14.

40 Estabilidad en DMSO

I3A se investigó para la estabilidad en DMSO a temperatura ambiente y a 37 °C durante un periodo de tiempo de 10 días. Una muestra control de I3A en acetonitrilo se mantuvo bajo las mismas condiciones que la muestra de prueba. Las muestras se analizaron por HPLC al inicio del experimento (día 0), después de las 48 horas (día 2) y de nuevo después de 10 días.

45 Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

Columna:	Hypercarb (ThermoQuest, Phenomenex) (S/no.3-34070)
Longitud de la columna:	100 x 4.60 mm
Temperatura de la columna:	25°C
Precolumna:	C ₁₈ Columbus (Phenomenex) (S/núm. 202678)
Longitud de la precolumna:	50 x 4.60 mm
Fase móvil:	50% v/v tampón de fosfato pH 4.5/50% v/v acetonitrilo
Régimen de flujo:	1.0 ml/min
Longitud de onda UV:	230 nm
Volumen de inyección:	10 µl

Tiempo de ejecución:	35 mins
Tiempo de retención:	15 mins, 24 mins

El I3A parece ser estable en DMSO a temperatura ambiente y a 37°C por 10 días.

EJEMPLO 2

5

Gel de isopropanol pH 6.5

Se investigó la estabilidad del I3A 'b' en una preparación de gel de isopropanol (pH 6.5) El protocolo fue como sigue:

10

Composición del gel de isopropanol (pH 6.5)

Excipiente	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p
Glicerina	5.0000 g	5.0000 g	5.02
Ciclometicona	0.5000 g	0.5000 g	0.50
Isopropil alcohol	25.0000 g	25.0000 g	25.10
Carbopol® 934	0.3000 g	0.3018 g	0.30
Alcohol propílico	25.0000 g	25.0000 g	25.10
Agua	43.7000 g	43.7000 g	43.87
Etanolamina	A pH 6.5	0.1000 g	0.10
Total:			100

15

El carbopol® se dispersó en agua y glicerina se y se disolvió al calentar a 40°C en un baño de agua. El alcohol propílico se añadió después a esta solución. La ciclometicona se disolvió en el alcohol isopropílico y esta segunda solución se mezcló bien con la solución de carbopol®, y después se añadió agua, con agitación, a 100%. El pH del gel se llevó a 6.5 con la adición gota a gota de etanolamina. El gel de isopropanol se almacenó a 2-8°C hasta el uso.

20

Para investigar la estabilidad de I3A 'b' en el gel de isopropanol (pH 6.5), una formulación de 0.02% (p/p) I3A 'b'/gel de isopropanol se preparó y dividió en tres muestras para almacenar a 2-8°C, RTP y 40°C. En los puntos de tiempo regulares se analizaron las muestras por duplicado para la estabilidad de I3A 'b' en términos de la formación de la isoforma 'a', con los resultados dados en la Figura 2. I3A 'b' se reorganiza en isoforma 'a' y posteriormente en isoforma 'c'. Esto se puede atribuir posiblemente al pH superior y la presencia de agua en el gel de isopropanol que facilita esta conversión del I3A 'b' a las isoformas 'a' y 'c'.

25

I3A 'b' en 30% p/p alcohol isopropílico/tampón de citrato pH 3.0

La estabilidad de I3A 'b' (lote núm. 240902) en 30% p/p IPA/tampón de citrato (pH 3) cuando se almacenó a 2-8°C y 40°C se investigó por duplicado, con los resultados que se dan en la Figura 3.

30

Conservantes

Varios conservantes se investigaron por su idoneidad para usar en las formulaciones de I3A 'b' a concentraciones que puedan pasar una prueba de eficacia de conservación. Inicialmente, los conservantes se prepararon en tampón de citrato (pH 3) y se analizaron por HPLC para chequear los picos en los cromatogramas que pudieran interferir con el ensayo de las isoformas de I3A. Los resultados se resumen en la Tabla 5 a continuación:

35

Tabla 5 Análisis por HPLC de los conservantes

Conservante	% p/p	Comentarios
Alcohol bencílico	1.0	No hay picos de interferencia
Metil parabén (M.P.)	0.2	Gran pico sobre la región de la isoforma 'a'

Conservante	% p/p	Comentarios
Propilparabén (P.P.)	0.02	Gran pico sobre la región de la isoforma 'a'
M. P. / P. P.	0.2 / 0.02	Gran pico sobre la región de la isoforma 'a'
Fenoxietanol	1.0	Pico pequeño sobre la región de la isoforma 'a'
Tampón de citrato control	0	No hay picos de interferencia

No es deseable tener muchos picos de interferencia en los cromatogramas de los conservantes, ya que esto conduce a dificultades en el análisis del fármaco en las formulaciones, y puede requerir la introducción de un ensayo separado para los conservantes.

5

El I3A 'b' (0.05% p/p) se disolvió por separado en los conservantes seleccionados (alcohol bencílico y fenoxietanol), se almacenó a 2-8°C, RTP y 40°C y comprobó la estabilidad por duplicado, en términos de la formación de la isoforma 'a' a intervalos regulares. Los resultados de este estudio de estabilidad se dan en las Figuras 4 y 5.

10 Los resultados indican que el alcohol bencílico es el conservante más adecuado de los evaluados.

Preparación de las formulaciones de I3A 'b'

Se prepararon las tres formulaciones siguientes y sus respectivos placebos:

15

- A. 0.1 % (p/p) I3A 'b'/crema macrocetil éter con 1.0% (p/p) alcohol bencílico como conservante
- B. 0.1% (p/p) I3A 'b'/30% (p/p) IPA/1.5% (p/p) HEC/1.0% (p/p) alcohol bencílico/citrato pH 3
- C. 0.1% (p/p) I3A 'b'/ 9.5% (p/p) ciclometicona/ 9.5% (p/p) IPM/1.0% (p/p) alcohol bencílico/ elastómero 10

20 Una solución madre de I3A 'b' se preparó en alcohol bencílico (Tabla 6) y esta materia prima se usó para preparar las formulaciones. Para los placebos, se usó alcohol bencílico solo en lugar de la materia prima I3A 'b'/alcohol bencílico. Las masas exactas de los componentes de las formulaciones del I3A 'b' se detallan en las Tablas 7-9. Las formulaciones y sus respectivos placebos se prepararon como sigue:

25 **Formulación A: I3A 'b'/crema macrocetil éter**

El ungüento emulsionante de macrocetil éter se pesó con precisión en un vial de vidrio y se fundió después en un baño de agua a 60°C. Tampón de citrato (pH 3) recién preparado se pesó con precisión en un vial de vidrio separado, se calentó en el baño de agua e incorporó después gradualmente en el ungüento emulsionante fundido con agitación constante hasta que se enfría. Este proceso produce la crema de macrocetil éter. Para preparar la formulación, I3A 'b' en alcohol bencílico se pesó con precisión en un vial de vidrio y la crema de macrocetil éter se pesó con precisión y gradualmente en este, con agitación constante.

35 **Formulación B: I3A 'b'/30% gel de IPA**

El I3A 'b'/alcohol bencílico se pesó con precisión en un frasco de vidrio. Los restantes componentes se pesaron con precisión sobre esta solución en el orden de IPA, después, tampón de citrato y después HEC, con el mezclado vigoroso entre cada adición.

40 **Formulación C: I3A 'b'/siliconas**

El I3A 'b'/alcohol bencílico se pesó con precisión en un frasco de vidrio. Los restantes componentes se pesaron con precisión sobre esta solución en el orden de Elastómero 10, después ciclometicona y después MIP, con el mezclado vigoroso entre cada adición.

45

Análisis de la formulación

Las formulaciones se analizaron en el inicio del estudio para confirmar la concentración de I3A 'b' (p/p) en las formulaciones y se encontraron que eran ca 0.1% (p/p) de I3A 'b'. Del contenido total de I3A 'b', hubo menos de 0.7% de la isoforma 'a' y ninguna isoforma 'c' en las formulaciones. Las formulaciones se chequearon para la aparición de la isoforma 'a' en el momento de la conclusión del estudio y mostraron tener menos de 0.3 % de la isoforma 'a' cuando se almacenaron a 2-8°C. No se detectó la isoforma 'c' en ninguna de las formulaciones.

50

Tabla 6. Solución madre I3A 'b'/alcohol bencílico

	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p
I3A 'b' (Lote núm. 240902)	0.0650 g	0.0650 g	0.15
Alcohol bencílico	0.6500 g	0.6547 g	99.85
Total:	0.7150 g	0.7197 g	100.00

5

Tabla 7. Formulación A

	Formulación			Placebo		
	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p
Excipientes para la crema base						
Ungüento de emulsificación de macrocetil éter	7.5000 g	7.5015 g	30.00	6.0000 g	6.0589 g	30.50
Tampón de citrato	17.5000 g	17.5030 g	70.00	13.8000 g	13.8049 g	69.50
Total:	25.0000 g	25.0045 g	100	19.8000 g	19.8638 g	100
Crema base de macrocetil éter	19.8000 g	19.8860 g	98.96	19.8000 g	19.8638 g	98.99
I3A 'b'/alcohol bencílico	0.2000 g	0.2088 g	1.04	0	0	0
Solamente alcohol bencílico	0	0	0	0.2000 g	0.2020 g	1.01
Total:	20.0000 g	20.0948 g	100.00	20.0000 g	20.0658 g	100.00

Tabla 8. Formulación B

	Formulación			Placebo		
	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p
Excipientes						
I3A 'b'/alcohol bencílico	0.2000 g	0.2035 g	1.02	0	0	0
Solamente alcohol bencílico	0	0	0	0.2000 g	0.2019 g	1.01
IPA	6.0000 g	6.0027 g	29.97	6.0000 g	6.0002 g	29.99
Tampón de citrato pH 3	13.5000 g	13.5158 g	67.49	13.5000 g	13.5018 g	67.49
HEC	0.3000 g	0.3040 g	1.52	0.3000 g	0.3029 g	1.51
Total:	20.0000 g	20.0260 g	100	20.0000 g	20.0068	100

Tabla 9. Formulación C

	Formulación			Placebo		
	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p
Excipientes						
I3A 'b'/alcohol bencílico	0.2000 g	0.2011 g	1.00	0	0	0
Solamente alcohol bencílico	0	0	0	0.2000 g	0.2109 g	1.05
Cicloticona	1.9000 g	1.9040 g	9.51	1.9000 g	1.9026 g	9.49
IPM	1.9000 g	1.9068 g	9.53	1.9000 g	1.9156 g	9.56
Elastómero 10	16.0000 g	16.0026 g	79.96	16.0000 g	16.0099 g	79.89

Excipientes	Formulación			Placebo		
	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p	Masa objetivo	Masa Actual	% p/p
Total:	20.0000 g	20.0145 g	100	20.0000 g	20.0390 g	100

La estabilidad de las isoformas I3A en los sistemas del solvente de ensayo durante 72 h

5 La estabilidad de las isoformas I3A 'a', 'b' y 'c' en los tres sistemas de muestreo durante 72 h (equivalente a la longitud máxima posible de tiempo que las muestras pueden mantenerse en el automuestreador durante una larga corrida analítica en HPLC) se confirmó como sigue. Los estándares de las tres isoformas de I3A (aproximadamente 100 µg/ml) se prepararon recientemente en acetonitrilo, tampón de acetonitrilo/citrato (pH 3) y tampón de acetonitrilo/acetato de amonio (pH 4.5) y se analizaron inmediatamente por HPLC. Los estándares se dividieron cada uno después en tres volúmenes iguales y colocaron a 2-8°C, temperatura ambiente y 40°C durante 72 horas y se volvieron a analizar después por HPLC.

10 Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 10. La mayor conversión de I3A 'b' a isoforma 'a' a temperatura ambiente ocurrió con la muestra preparada en el 100% v/v de acetonitrilo mientras que el I3A 'b' estándar en acetonitrilo/citrato (pH 3) mostró muy poca conversión a isoforma 'a' incluso a 40°C, lo que sugiere que este sistema de solvente puede ser el más adecuado para garantizar las muestras permanezcan estables durante el tiempo de muestreo.

15

Tabla 10. Estabilidad de las isoformas 'a', 'b' y 'c' en diferentes sistemas solventes

Acetonitrilo									
	Isoforma 'a'			Isoforma 'b'			Isoforma 'c'		
Tiempo	% 'a'	% 'b'	% 'c'	% 'a'	% 'b'	% 'c'	% 'a'	% 'b'	% 'c'
0	96.82	2.24	0.29	0.39	99.27	0	1.28	0.41	97.30
72h 2-8°C	90.63	5.71	2.55	3.94	95.45	0	1.62	0	96.69
72h RTP	86.58	7.8	3.65	5.83	93.51	0	1.55	0.27	97.19
72h 40°C	16.36	47.01	35.74	15.52	83.35	0	0.6	0	97.09
Tampón de acetonitrilo/acetato de sodio (pH 4.5)									
	Isoforma 'a'			Isoforma 'b'			Isoforma 'c'		
Tiempo (h)	% 'a'	% 'b'	% 'c'	% 'a'	% 'b'	% 'c'	% 'a'	% 'b'	% 'c'
0	96.65	2.16	0.23	0.34	98.88	0.01	1.34	0.45	97.02
72h 2-8°C	96.47	2.83	0	0.63	99.02	0	1.41	0.27	97.17
72h RTP	95.25	4.22	0	1.16	98.41	0	0.83	0	97.97
72h 40°C	82.51	16.62	0	6.35	93.13	0	0	0	97.75
Tampón de acetonitrilo/ citrato (pH 3)									
	Isoforma 'a'			Isoforma 'b'			Isoforma 'c'		
Tiempo (h)	% 'a'	% 'b'	% 'c'	% 'a'	% 'b'	% 'c'	% 'a'	% 'b'	% 'c'
0	97.91	1.63	0	0.13	99.64	0	1.12	0.20	98.41
72h 2-8°C	98.31	1.46	0	0.18	99.49	0	0.87	0.16	98.84
72h RTP	98.84	1.08	0	0.13	99.76	0	0.53	0	99.24
72h 40°C	98.13	1.79	0	0.34	99.63	0	0	0	98.7

20

EJEMPLO 3

Un estudio de estabilidad de pH de I3A 'b' en geles de IPA preparados con tampón de citrato en el intervalo de pH 2.5 a 4.0 se realizó a 2-8°C y 40°C (estabilidad acelerada).

5

MATERIALES

Materiales	Suministrador
I3A 'b' (ingenol angelato)	Peplin Limited, Australia
Lote núm. 070303	
Lote núm. 0319	
Citrato de sodio dihidrato (grado USP) lote R009243	Raught Ltd, Reino Unido
Ácido cítrico monohidrato (grado USP) lote R11115	
Ácido acético glacial Lote K2953917	BDH Laboratory Supplies, Reino Unido
Acetato sódico Lote TA1044704	
Alcohol bencílico (grado USP) Lote núm. K31593981	Merck, Alemania
Alcohol isopropílico (grado USP) lote núm. K31802995310	
Natrosol® 250 HHX lote núm. Z-0177	Honeywell y Stein, Reino Unido
Acetonitrilo-grado HPLC	Fisher Chemicals, Reino Unido
Agua desionizada	MilliQ, Reino Unido

MÉTODOS

10

Preparación de geles de I3A 'b' y placebos usando tampón de citrato en el intervalo de pH 2.5 a 4.0.

15

Las composiciones de los geles IPA activo y placebo preparados para el estudio de estabilidad en el intervalo de pH se dan en las Tablas 11 y 12, respectivamente. Se prepararon grandes cantidades de placebo para facilitar la medición del pH de los geles de placebo en el Tiempo 0. Pequeñas cantidades del gel activo es decir, se prepararon 30 g de cada uno ya que la cantidad de fármaco disponible para el estudio era limitada. Los estudios de estabilidad previos realizados en el gel I3A IPA, en cual el pH aparente del placebo y el gel activo se controlaron durante 12 meses, demostraron que no hay diferencia notable entre los dos. Además, se midió el mismo pH aparente, tanto para los geles activos como placebo. Así, se midió sólo el pH de los geles placebo, para determinar el pH aparente de los geles en al inicio del estudio de estabilidad. Después de la hidratación toda la noche, se analizaron los geles para el punto de tiempo T=0 y se midieron los valores de pH aparente de los placebos. Las muestras se dividieron igualmente en 7 ml viales de vidrio de soda para evitar los ciclos de temperatura del material cuando se muestrea en los diferentes puntos de tiempo y los viales se almacenaron a 2-8°C y 40°C (estabilidad acelerada), respectivamente.

25

30

35

Tabla 11. Composición de los geles de IPA activos preparados con tampón de citrato en el intervalo de pH 2.5 a 4.0

Excipiente	Masa objetivo (g)	Tampón de citrato pH 2.5	Actual % p/p	Tampón de citrato 2.75	de pH	Actual %p/p	Tampón de citrato pH 3.0	Actual % p/p	Tampón de citrato pH 3.5	Actual % p/p	Tampón de citrato pH 4.0	Actual %p/p
I3A BN 070303	0.0300	0.03004	0.10	0.03003		0.10	0.03005	0.10	0.03003	0.10	0.03000	0.10
Alcohol bencílico	0.2700	0.27112	0.90	0.27055		0.90	0.27060	0.90	0.27278	0.91	0.27193	0.91
IPA	9.0000	9.00340	30.00	9.01909		30.04	9.00107	30.00	9.00243	30.00	9.00158	30.00
Tampón de citrato	20.2500	20.25235	67.50	20.25345		67.46	20.25086	67.50	20.25061	67.49	20.2533	67.49
HEC HHX	0.4500	0.45063	1.50	0.45041		1.50	0.45031	1.50	0.45053	1.50	0.45041	1.50
Total	30.0000	30.00754	100.00	30.02353		100.00	30.00289	100.00	30.00638	100.00	30.00722	100.00

5 Tabla 12 Composición de los geles de IPA Placebo preparados con tampón de citrato en el intervalo de pH 2.5 a 4.0

Excipiente	Masa objetivo (g)	Tampón de citrato pH 2.5	Actual % p/p	Tampón de citrato 2.75	de pH	Actual % p/p	Tampón de citrato pH 3.0	Actual % p/p	Tampón de citrato pH 3.5	Actual % p/p	Tampón de citrato pH 4.0	Actual %p/p
Alcohol bencílico	0.9000	0.9070	0.91	0.9003		0.90	0.9046	0.90	0.9036	0.90	0.9042	0.90
IPA	30.0000	30.0035	30.00	30.0016		30.00	30.0233	30.00	30.0136	30.00	30.0201	30.01
Tampón de citrato	57.6000	67.6107	67.59	67.6108		67.60	67.6400	67.59	67.6211	67.60	67.6139	67.58
HEC HHX	1.5000	1.5022	1.50	1.5065		1.50	1.5086	1.51	1.5031	1.50	1.5064	1.51
Total	100.0000	100.0234	100.00	100.0192		100.00	100.0765	100.00	100.0414	100.00	100.0446	100.00

Medición del pH aparente de los geles de IPA placebos preparados usando tampón de citrato en el intervalo de pH de 2.5 a 4.0

- 5 El pH aparente de los geles de IPA placebo preparados usando tampón de citrato en el intervalo de pH 2.5 a 4.0 se midió usando un pH metro Jenway 3320.

Extracción de I3A a partir de los geles de IPA

- 10 El fármaco se extrajo de los geles de IPA como sigue. Un gramo de cada uno de los geles o sus respectivos placebos se pesó con precisión en un frasco volumétrico de 10 ml por duplicado o triplicado. Las muestras se mezclaron primero con 1 ml de tampón de citrato (pH 3) con mezclado vigoroso y repetitivo en un mezclador de vórtice ajustado a la máxima velocidad y después se dejaron agitar en un agitador orbital durante 30 minutos a 400 rpm. Los frascos volumétricos se llenaron después hasta la marca de volumen con acetonitrilo de grado-HPLC y las muestras se sometieron de nuevo al mezclado vigoroso con mezclado repetitivo en un mezclador de vórtice ajustado a la velocidad máxima y después se dejaron agitar en un agitador orbital durante 60 minutos a 400 rpm. Alícuotas se transfirieron a viales de HPLC para su análisis.

- 20 La extracción de I3A a partir del gel se realizó por triplicado es decir, tres pesajes separados con inyecciones duplicadas para puntos de Tiempo 0 y Tiempo= tres meses (muestras de 2-8°C) y por duplicado, es decir dos pesaje s separados con inyecciones duplicadas para el Tiempo= una semana y cuatro semanas (muestras de 40°C).

Análisis por HPLC

- 25 El análisis se realizó usando los sistemas y condiciones siguientes:

Instrumentos

- 30 Módulo de separaciones Waters Alliance 2695 (S/núm. B98SM4209M)
 Detector de absorbancia λ dual de Waters 2487 (S/núm. M97487050N).
 Módulo de separaciones Waters Alliance 2695 D (S/núm. G98SM8039N)
 Detector de absorbancia λ dual de Waters 2487 (S/núm. L02487106M)

Software Pro Empower™ de Empower

- 35 Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

Columnas:	Hypercarb (ThermoQuest, Phenomenex) S/núm. 3-34070 y S/núm. 1034024A
Longitud de la columna:	100 x 4.60 mm
Temperatura de la columna:	Ambiente
Precolumnas:	C ₁₈ Columbus (Phenomenex) S/núm. 202678 y S/núm. 74554-7
Longitud de la precolumna:	50 x 4.60 mm
Fase móvil:	50% v/v tampón de acetato de sodio pH 4.5 / 50% acetonitrilo (v/v)
Régimen de flujo:	1.0 ml/min
Longitud de onda UV:	230 nm
Volumen de inyección:	30 µl
Tiempo de ejecución:	35 mins
Temperatura del automuestreador:	8°C ± 2°C

Tiempos de retención:	13 mins ± 2 mins isoforma 'a'; 22 mins ± 2 mins isoforma 'b'; 23 mins ± 2 mins isoforma 'c'; pico no asignado con tiempo de retención relativo para la isoforma 'b' de 0.93 ± 0.02.
-----------------------	---

RESULTADOS

5 Medición del pH aparente de los geles de placebo al tiempo 0

Los resultados para la medición del pH aparente de los geles de placebo se dan en la Tabla 13. No se tomaron mediciones de pH en ninguno de los puntos de tiempo de estabilidad.

10 **Tabla 13. Medición del pH aparente de los geles de placebo de IPA (n=1)**

pH del Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente del gel de placebo
2.50	3.07
2.75	3.34
3.00	3.62
3.50	4.22
4.00	4.74

Determinación del porcentaje de purezas pico de las isoformas de I3A en los geles activos

15 El porcentaje de purezas pico de I3A 'b' en los geles activos al inicio del estudio de estabilidad (T=0), y después de una semana de almacenamiento a 40°C, cuatro semanas de almacenamiento a 40°C, y después de tres meses de almacenamiento a 2-8°C, se dan en la Tablas 14, 15, 16 y 17, respectivamente. El porcentaje de pureza pico de I3A 'b' fue mayor que 98% mientras que el porcentaje de pureza pico de la isoforma 'a' fue menor que 1.2% para todos los geles después de tres meses de almacenamiento a -28°C. Para el estudio de estabilidad acelerado a 40°C, la mayor disminución del porcentaje de pureza pico de 'b' durante las cuatro semanas se observó con el gel con valor de placebo aparente de 20 4.74. Como I3A 'b' demostró convertirse a la isoforma 'a', la formación de la isoforma 'a' se examinó además como un marcador de estabilidad. Los aumentos en el porcentaje de purezas pico de la isoforma 'a' a partir del Tiempo 0 después de una semana y cuatro semanas de almacenamiento a 40°C, y después de tres meses de almacenamiento a 2-8°C se calcularon, con los resultados que se dan en la Tabla 18.

25 **Tabla 14 Porcentaje de purezas pico de las isoformas de I3A en los geles activos (n=3, medio ± desviación estándar, UAP = pico no asignado, RRT= tiempo de retención relativo) en el tiempo 0**

pH de Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente del gel de placebo	Porcentaje de pureza pico					Total otros UAPs
		Isoforma 'a'	Isoforma 'b'	Isoforma 'c'	UAP RRT para la isoforma 'b' 0.93 ± 0.02		
2.50	3.07	0.44 ± 0.03	99.20 ± 0.11	0.00 ± 0.00	0.20 ± 0.04	0.16 ± 0.07	
2.75	3.34	0.24 ± 0.06	99.70 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.04	
3.00	3.62	0.52 ± 0.01	99.16 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.02	0.19 ± 0.06	
3.50	4.22	0.47 ± 0.02	99.36 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.04	
4.00	4.74	0.44 ± 0.03	99.30 ± 0.10	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.16 ± 0.07	

Tabla 15. Porcentaje de purezas pico de las isoformas de I3A en los geles activos (n=2, medio ± intervalo, UAP = pico no asignado, RRT= tiempo de retención relativo) después de una semana de almacenamiento a 40°C

pH de Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente del gel de placebo	Porcentaje de pureza pico				
		Isoforma 'a'	Isoforma 'b'	Isoforma 'c'	UAP RRT para la isoforma 'b' 0.93 ± 0.02	Total otros UAPs
2.50	3.07	1.01 ± 0.02	98.83 ± 0.05	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.13 ± 0.03
2.75	3.34	0.53 ± 0.34	99.06 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.35 ± 0.31
3.00	3.62	1.61 ± 0.05	98.26 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.04
3.50	4.22	2.56 ± 0.04	97.27 ± 0.22	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.04	0.12 ± 0.15
4.00	4.74	4.68 ± 0.03	95.12 ± 0.07	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.02	0.12 ± 0.04

5 **Tabla 16. Porcentaje de purezas pico de las isoformas de I3A en los geles activos (n=2, medio ± intervalo, UAP = pico no asignado, RRT= tiempo de retención relativo) después de cuatro semanas de almacenamiento a 40°C**

pH de Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente del gel de placebo	Porcentaje de pureza pico				
		Isoforma 'a'	Isoforma 'b'	Isoforma 'c'	UAP RRT para la isoforma 'b' 0.93 ± 0.02	Total otros UAPs
2.50	3.07	2.70 ± 0.01	96.24 ± 0.09	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.02	0.99 ± 0.06
2.75	3.34	2.91 ± 0.02	96.44 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.02	0.59 ± 0.11
3.00	3.62	4.74 ± 0.02	94.75 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.08 ± 0.02	0.44 ± 0.09
3.50	4.22	7.68 ± 0.02	92.01 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.04	0.25 ± 0.08
4.00	4.74	13.34 ± 0.02	86.47 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.03	0.13 ± 0.09

10 **Tabla 17. Porcentaje de purezas pico de las isoformas de I3A en los geles activos (n=3, medio ± desviación estándar, UAP = pico no asignado, RRT= tiempo de retención relativo) después de tres meses de almacenamiento a 2-8°C**

pH del Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente del gel de placebo	Porcentaje de pureza pico				
		Isoforma 'a'	Isoforma 'b'	Isoforma 'c'	UAP RRT para la isoforma 'b' 0.93 ± 0.02	Total otros UAPs
2.50	3.07	0.56 ± 0.01	99.34 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.03
2.75	3.34	0.20 ± 0.08	99.71 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.05
3.00	3.62	0.73 ± 0.01	99.15 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.12 ± 0.01

pH del Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente del gel de placebo	Porcentaje de pureza pico				
		Isoforma 'a'	Isoforma 'b'	Isoforma 'c'	UAP RRT para la isoforma 'b' 0.93 ± 0.02	Total otros UAPs
3.50	4.22	0.91 \pm 0.01	99.00 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.09 \pm
4.00	4.74	1.16 \pm 0.09	98.73 \pm 0.13	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.11 \pm 0.05

Tabla 18. Aumento calculado en porcentaje de puridades pico de la isoforma 'a' de I3A a partir del Tiempo 0 en los geles de IPA

pH del Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente del gel de placebo	Aumento en el porcentaje de pureza pico de la isoforma 'a' a partir del Tiempo 0 (Tabla 5):		
		Almacenado a 40°C		Almacenado a 2-8°C
		T=1 semana	T=4 semanas	T=3 meses
2.50	3.07	0.57	2.26	0.12
2.75	3.34	0.29	2.67	0.00
3.00	3.62	1.09	4.22	0.21
3.50	4.22	2.09	7.21	0.44
4.00	4.74	4.24	12.90	0.72

5 Los datos sugieren que el pH tiene un efecto sobre la formación de la isoforma 'a' incluso cuando el gel se almacena a 2-8°C por tres meses. Un aumento en el porcentaje de área pico de la isoforma 'a' de 0.21% se midió con el gel preparado con tampón de citrato de pH 3.00 comparado con un aumento de 0.44% en el porcentaje de área pico de la isoforma 'a' para el gel preparado con el tampón de citrato de pH 3.5. Por T=4 semanas a 40°C, las diferencias entre los geles en términos del aumento en el porcentaje de puridades pico de la isoforma 'a' se amplificaron.

10

EJEMPLO 4

Formulaciones de aceite

15

MATERIALES

Material	Suministrador
I3A	Peplin Limited, Australia
Lote núm. 0302	
Alcohol bencílico Ph Eur, BP, NF lote núm. K31593981 301	Merck KGaA, Alemania
Crodamol GTC/C (Triglicéridos de cadena media) lote núm. GE03907	Croda, Singapur
Citrato de sodio dihidrato Lote núm. 27833.261	Merck Chemicals, Reino Unido
Ácido cítrico Lote núm. 111K0142	Sigma Chemical Co., Reino Unido
Ácido acético glacial Acetato sódico Lote 102363P	BDH Laboratory Supplies, Reino Unido
Acetonitrilo-grado HPLC Ácido trifluoroacético (TFA) Lote núm. 03 92851	Fisher Scientific, Reino Unido
Agua desionizada	Millipore, Reino Unido

MÉTODOS**Selección de aceites/excipientes adecuados**

- 5 El aceite de sésamo, aceite de nuez de coco fraccionado (Triglicéridos de cadena media), aceite de soja, aceite de maíz, y aceite de cacahuete, se identificaron como vehículos para la administración parenteral. Cada uno puede usarse hasta un nivel de 100%.
- 10 Otros excipientes, que pueden incluirse en las formulaciones de aceite parenteral, se muestran más abajo, junto con las concentraciones máximas usadas.

Excipiente (uso)	Concentración máxima usada (%)
Alcohol bencílico (solubilizador/conservante)	3.0
Etanol (solubilizador)	70
Hidroxianisol butilado (antioxidante)	0.03
Hidroxitolueno butilado (antioxidante)	0.03

Preparación de I3A y formulaciones placebo para estudios de estabilidad preliminar

15 Esterilización de aceite de nuez de coco fraccionado

- Aproximadamente 50 g del aceite de coco fraccionado (CRODAMOL GTC/C) se pesaron en un frasco cónico de 100 ml (vidrio de borosilicato), se tapó (tapón de vidrio de borosilicato) y se coloca dentro de un horno pre-calentado (Gallenkampf Hot box Oven con ventilador, Tamaño 2) a $173 \pm 5^\circ\text{C}$ por 1 h. Después de este procedimiento, el aceite se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su uso.

Adición de I3A al aceite esterilizado

- 25 Aproximadamente 10 mg de I3A se pesaron con precisión en un frasco de vidrio de 28 ml y se añadió a aproximadamente 200 mg de alcohol bencílico (se anotó el peso exacto), que se había filtrado previamente a través de un filtro MILLEX-GV de $0.22 \mu\text{m}$. Esta mezcla se agitó periódicamente por aproximadamente 2 h hasta que el I3A se disolvió en el alcohol bencílico. A esta mezcla se añadió aproximadamente 9.79 g de aceite esterilizado y se agitó por aproximadamente 5 minutos hasta que se obtuvo una solución homogénea. El placebo se preparó de manera similar excepto que aproximadamente 9.80 g (en contraposición a 9.79 g) del aceite esterilizado (se anotó el peso exacto) se usaron para compensar el I3A. Pesos exactos y composiciones porcentuales se muestran en las Tablas 19 y 20 para las formulaciones activas (I3A) y placebo.

Tabla 19 Cantidades objetivo y reales (y % p/p) para la formulación de aceite I3A

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
I3A	10 mg	0.10	10.15 mg	0.101
Alcohol bencílico	200 mg	2.0	200.16 mg	1.998
Aceite de nuez de coco fraccionado	9.79 g	97.9	9.80854 g	97.901
Total	10 g	100	10.01885 g	100
*Redondeado hasta 3 d.p.				

Tabla 20 Cantidades objetivo y reales (y % p/p) para la formulación de aceite placebo

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
Alcohol bencílico	200 mg	2.0	200.89 mg	1.971
Aceite de nuez de coco fraccionado	9.8 g	98.0	9.99313 g	98.029
Total	10 g	100	10.19402 g	100
*Redondeado hasta 3 d.p.				

Condiciones de almacenamiento de las formulaciones de I3A y placebo

Las alícuotas de cada formulación (placebo o activa) se dispensaron en frascos de vidrio ámbar con tapa de rosca de 2 ml (vidrio de borosilicato), sellado y almacenado a dos condiciones de almacenamiento a saber 2-8°C y 25 ± 2°C. Las formulaciones se probaron usando el método descritos más abajo a tiempos de almacenamiento de hasta e incluyendo un mes.

Estabilidad preliminar de I3A en aceite de nuez de coco fraccionado

La Tabla 21 resume la estabilidad de I3A en aceite de nuez de coco fraccionado almacenado a 2-8°C y 25 °C durante 43 días. El dato de estabilidad indica que parece no haber aumentos en el porcentaje de la isoforma 'a' durante el almacenamiento a 2-8 y 25°C después de 43 días, com parable con el porcentaje de la isoforma 'a' a partir de un lote fresco de I3A a t=0 y t=43 días.

Tabla 21. El porcentaje de la isoforma 'a' como un porcentaje de la isoforma 'a' e I3A 'b' almacenado a dos condiciones por 43 días.

	% I3A 'a'
Muestra fresca de I3A en acetonitrilo en el tiempo cero	2.50
Tiempo 0	1.90
Tiempo 5 días (2-8°C)	1.86
Tiempo 5 días (25°C)	1.97
Tiempo 20 días (2-8°C)	1.94
Tiempo 20 días (25°C)	1.93
Tiempo 28 días (2-8°C)	1.93
Tiempo 28 días (25°C)	1.94
Tiempo 43 días (2-8°C)	1.95
Tiempo 43 días (25°C)	1.91
Muestra fresca de I3A en acetonitrilo en el Tiempo 43 días	2.14

RESULTADOS

No hubo diferencia significativa (p>0.05) en el área pico y el tiempo de retención de las isoformas 'a' y 'b' de I3A entre las muestras inyectadas en acetonitrilo o acetonitrilo/aceite.

De la lista de aceites disponibles dos fueron considerados adecuados para la formulación del I3A a saber, aceite de nuez de coco fraccionado y aceite de sésamo. La esterilización recomendada de aceite de sésamo es 2 horas a 170°C, mientras que para el aceite de coco fraccionado es 1 h a 170°C. Esto tiene ventajas con respecto a la cantidad de tiempo y energía gastada en la preparación de la formulación. Debido a la inestabilidad de I3A al calor (comprobado experimentalmente, datos no mostrados), el aceite tiene que ser esterilizado por separado y el I3A añadido asépticamente (filtrado) como una solución disuelta en alcohol bencílico. Un medio de filtro se identificó para ser adecuado para la filtración de la mezcla I3A/alcohol bencílico específicamente un filtro MILLEX-GV de 0.22 µm, sin embargo, la adsorción de I3A sobre la membrana del filtro aún requiere investigación. Si se desea, debido a la relativamente baja viscosidad de este aceite (aproximadamente 30 mPas comparado con el aceite de sésamo que tiene una viscosidad de aproximadamente 44 mPas) la formulación puede prepararse además *in situ* con I3A/alcohol bencílico y la formulación completa se esteriliza por filtración.

EJEMPLO 5

Formulaciones Orales

Se seleccionó un número de excipientes para la formulaciones bucales, y 17 formulaciones no acuosas se prepararon y se evaluaron visualmente para la consistencia y solvatación.

Una variedad de polímeros fue como potenciales vehículos mucoadhesivos. Debido a la inestabilidad inherente de I3A en sistemas acuosos, las formulaciones investigadas fueron no acuosas, sustituyendo glicerina y polietilenglicol (PEG) por la fase acuosa.

5 **MATERIALES**

Material	Suministrador
I3A	Peplin Limited, Australia
Lote núm. 0319	
Alcohol bencílico Ph Eur, BP, NF	Merck KGaA, Alemania
Lote núm. K31593981 301	
Polietilenglicol 400 (PEG 400)	Merck KgaA, Alemania
Lote núm. 8.17003.1000	
Glicerina	Sigma Chemical Co., Reino Unido
Lote núm. 121K0152	
Ácido cítrico	
Lote núm. 111K0142	
Mucina porcina - Tipo III	
Lote núm. 68H7480	
Carbopol 934	Serva, Alemania
Lote núm. 15885	
Metilcelulosa (MC)	Fluka, Reino Unido
Lote núm. 404006/1	
Hidroxietilcelulosa HX (HEC)	Hercules, USA
Hidroxipropilcelulosa (HP)	
Metanol grado HPLC ácido trifluoroacético (TFA) Lote núm. 0392851	Fisher Scientific, Reino Unido
Agua desionizada (18.2M ohm cm)	Millipore, Reino Unido

10 **MÉTODOS**

10 Detección visual preliminar de formulaciones de placebo

15 Diecisiete formulaciones de placebo se prepararon inicialmente y se seleccionaron visualmente para la consistencia y solvatación (Tabla 22). En resumen, las cantidades necesarias de PEG 400 y carbopol 934 se agitaron en frascos de vidrio de 28 ml por 10 minutos con una espátula y los otros ingredientes se añadieron en el siguiente orden, glicerina, alcohol bencílico y metilcelulosa o HEC o HPC. Las formulaciones se mezclaron a continuación con un agitador Silverson 14RT a aproximadamente 10,000 rpm durante aproximadamente 2-3 minutos. Todas las formulaciones de placebo mezcladas se dejaron solvatar toda la noche (>24 h) antes de la detección visual.

20

Tabla 22. Composición de las formulaciones de placebo por evaluación visual

	Formulación Número / % p/p excipiente añadido																
Excipiente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
PEG 400	26.0	25.0	26.0	26.5	25.0	26.0	26.8	26.5	27.0	27.5	27.0	28.0	26.5	26.5	26.0	26.5	26.0
Glicerina	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
Alcohol bencílico	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Metilcelulosa	1.0	1.0					0.2	2.0	1.0	1.0				1.0	1.5		
Carbopol	2.0	3.0	2.0	1.5	3.0	2.0	2.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	0.5	1.5	1.5	1.5	1.5
HEC			1.0	1.0	1.0												
HPC						1.0					1.0	0.5	2.0			1.0	1.5

Selección reológica de formulaciones de placebo (mucoadhesión)

- 5 Un enfoque para el estudio de la mucoadhesión es la caracterización reológica de la interfaz mucoadhesiva. Se basa en la suposición de que el grado de interpenetración puede detectarse mediante la medición de las diferencias en los parámetros reológicos entre los geles de polímeros y sus mezclas con mucina. El aumento sinérgico de la viscosidad se ha propuesto como un índice de fuerza de cohesión de bioadhesión. A partir de la observación visual, se escogieron cinco formulaciones de placebo basado en la viscosidad y solvatación, para otras evaluaciones reológicas usando mucina porcina. Las formulaciones escogidas se enumeran en la Tabla 23.

Tabla 23. Formulaciones escogidas para selección reológica

	Formulación Número / %p/p excipiente añadido				
Excipiente	4	14	15	16	17
PEG 400	26.5	26.5	26.0	26.5	26.0
Glicerina	70.0	70.0	70.0	70.0	70.0
Alcohol bencílico	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Metilcelulosa		1.0	1.5		
Carbopol	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
HEC	1.0				
HPC				1.0	1.5

Preparación de muestras para evaluación reológica.

15

Preparación de mucina porcina

- 20 En resumen, 15 g de polvo de mucina porcina se pesaron en un vaso y se llevaron hasta 150 g usando agua desionizada para dar una concentración final de 10% p/p de mucina. Esto se dejó hidratar a 2-8°C por aproximadamente 2-3 h. La mucina hidratada se diluyó después con agua desionizada para obtener una concentración final de 5% p/p de mucina en agua desionizada. Esto se dejó hidratar durante la noche en la nevera a 2-8°C.

Preparación de mezcla de formulación/mucina

- 25 Las formulaciones seleccionadas (Tabla 23) se prepararon como se describió anteriormente. A cada una de las formulaciones se añadió una peso igual de 10% p/p de mucina y se agitó suavemente con una espátula. Esto se dejó hidratar a 2-8°C toda la noche. Adicionalmente, las formulaciones seleccionadas se diluyeron además (50:50 p/p) con agua desionizada y se dejó hidratar toda la noche en la nevera a 2-8°C.

Procedimiento de prueba de reología dinámica (oscilante)

La revisión reológica se llevó a cabo usando un reómetro Carrimed CSL². Aproximadamente 0.5 g de la muestra de prueba se colocó entre la plataforma y la geometría de placas paralelas. Una vez que la muestra se comprimió entre la plataforma y la placa, cualquier exceso de muestra se retiró cuidadosamente con una espátula en los ángulos rectos a la geometría. Cada muestra se probó un total de cinco veces resultando en un espectro mecánico. Los parámetros resultantes obtenidos G' , G'' y $\tan \delta$ se usaron para evaluar la fuerza mucoadhesiva de las formulaciones, donde G' es el módulo elástico, G'' el módulo viscoso y la $\tan \delta$ la relación de G' a G'' .

Optimización y preparación de formulaciones activas y placebo seleccionadas

Después de las pruebas reológicas se seleccionaron dos formulaciones para una mayor optimización (Formulación 16 y 17) con respecto a la preparación del lote de formulación para la estabilidad. El proceso de fabricación optimizado se usó para preparar los lotes de formulaciones activas (conteniendo I3A) y placebo (25 g de cada una). La Figura 6 muestra la preparación de la Formulación 16 activa y placebo con las cantidades objetivo de excipientes/fármaco usadas. En resumen, la cantidad requerida de carbopol 934 se añadió a PEG 400 en una botella de borosilicato y se calentó a 50°C por aproximadamente 2 h hasta que la mezcla se solvató completamente. Esta mezcla se enfrió a temperatura ambiente; la cantidad requerida de glicerol añadida y la mezcla se calentó a aproximadamente 60°C en un baño de agua por 2 h hasta que se formó una pasta homogénea. Se añadió la cantidad requerida de HEC y se agitó en la mezcla enfriada usando un mezclador Silverson L4RT a aproximadamente 10,000 rpm por 2-3 minutos. Esta mezcla se dejó solvatar completamente durante la noche (aprox. 12 h) a temperatura ambiente. Como se muestra en la Figura 6 esto produjo una 'Formulación base'.

La formulación activa se preparó disolviendo inicialmente el I3A en alcohol bencílico. La cantidad requerida de I3A/alcohol bencílico se añadió a la formulación de base solvatada y con una espátula para dar una concentración final de 0.1% p/p I3A. Del mismo modo, la formulación de placebo se preparó añadiendo el alcohol bencílico a la mezcla solvatada y se agitó suavemente. La Formulación 17 se preparó de manera similar. La Tabla 24 muestra el %p/p objetivo de excipientes/I3A en las formulaciones de placebo y activas.

Aproximadamente 1 g de las formulaciones placebo y activas se alicuotaron en frascos con tapas de rosca de 2 ml y se colocaron en estabilidad a 2-8°C, 25°C y 40°C (la última temperatura se utilizó para los estudios de estabilidad acelerada a corto plazo).

Tabla 24. %p/p objetivo (a 1 d.p.) en las formulaciones placebo y activa optimizadas

Excipiente/fármaco	Formulación 16		Formulación 17	
	Activo	Placebo	Activo	Placebo
PEG 400	26.5	26.5	26.0	26.0
Carbopol	1.5	1.5	1.5	1.5
Glicerina	69.9	70.0	69.9	70.0
HPC	1.0	1.0	1.5	1.5
Alcohol bencílico	1.0	1.0	1.0	1.0
I3A (0319)	0.1		0.1	

Análisis de I3A en la formulación

Extracción de I3A a partir de la formulación activa

A los efectos de la evaluación del producto fármaco se creó un método de extracción para evaluar la degradación del I3A 'b' para isoforma 'a' (pureza pico cromatográfica). La extracción de I3A a partir de la formulación activa fue como sigue (el mismo procedimiento se usó además para la formulación de placebo). En resumen, aproximadamente 1 g de la formulación se pesó con precisión en un frasco volumétrico de 10 ml seguido de 1 ml de tampón de citrato (pH 3). Esto se agitó suavemente a mano por aproximadamente 5 minutos hasta que fue homogéneo y se llevó hasta un volumen con metanol de grado HPLC. El frasco se agitó después en un agitador mecánico por aproximadamente 2 h. Los contenidos del frasco se transfirieron después a un tubo de polipropileno de 15 ml y centrifugaron por 5 minutos a 2200 rpm. El sobrenadante se alicuotó en frascos de HPLC y se analizó.

Datos preliminares de recuperación (no mostrados) indicaron que aprox. 80% o más de I3A 'b' se recuperó de la formulación activa y más significativamente, no hubo interferencia de ninguno de los excipientes en la formulación.

5 Método HPLC

El método de análisis para el análisis de I3A en la formulación bucal se muestra más abajo.

Columna:	Symmetry C ₁₈ - 5 µm (Waters) (S/núm.T636515 07, P/núm. WAT054205)
Longitud de la columna:	150 x 3.90 mm
Temperatura de la columna:	30°C
Precolumna:	Symmetry C ₁₈ - 5 µm (Waters) (P/no.WAT054225)
Longitud de la precolumna:	20 x 3.90 mm
Fase móvil:	0.02% v/v TFA en agua (A); 0.02% v/v TFA en acetonitrilo (B)
	A : B; 50: 50 (composición de partida) (GRADIENT, ver tabla más abajo)
Régimen de flujo:	1.0 ml/min
Longitud de onda UV:	230 nm (PDA)
Volumen de inyección:	10
Tiempo de ejecución:	20 minutos
Temperatura del automuestreador:	8°C

10 Las muestras y los placebos se probaron en el tiempo cero. A aproximadamente 1-2 semanas, las muestras almacenadas a 40°C se probaron además para obtener algún dato de estabilidad acelerada.

RESULTADOS

Selección Visual

15 La observación visual se llevó a cabo cualitativamente y proporcionó un método relativamente eficiente de pre-selección de un número de formulaciones con respecto a viscosidad y solvatación. Las formulaciones de placebo se evaluaron por dos evaluadores independientes y se rechazaron sobre la base de que la viscosidad era demasiado alta o demasiado baja. Además, cualquier formulación, que no se había solvatada completamente, también fue rechazada. Era bastante evidente que de acuerdo con el método de preparación de una concentración de Carbopol 934 mayor que 1.5% p/p produce geles no acuosos que eran demasiado viscoso y/o no completamente solvatados. Una reducción en la cantidad de Carbopol 934 a 0.5% p/p y la adición de metilcelulosa a una concentración de 2.0% p/p produjo un gel de baja viscosidad. Sin embargo, el aumento de la concentración de carbopol 934 a 1.0% p/p y la reducción concomitante de la concentración de metilcelulosa a 1.0% p/p dio aun un gel que tenía baja viscosidad. A partir de las observaciones visuales, parece que la adición de metilcelulosa no tuvo influencia sobre la viscosidad en gran medida en comparación con la adición de Carbopol 934. Sin embargo, la metilcelulosa demostró tener propiedades mucoadhesivas y por lo tanto se prepararon formulaciones adicionales que contuvieron 1.0 y 1.5% p/p metilcelulosa en combinación con 1.5 % p/p de Carbopol 934. La evaluación visual de estas formulaciones mostró que eran homogéneas y tenían la consistencia necesaria para su evaluación adicional. Del mismo modo, HPC no se encontró que afecta la viscosidad con relación a la adición de Carbopol 934. Sin embargo, desde que HPC se implicó además como un mucoadhesivo potencial, las formulaciones que contienen HPC en 1.0 y 1.5 % p/p junto con Carbopol 934 al 1.5 %/p/p se encontraron visualmente aceptables para la evaluación reológica adicional. La Formulación 4 se encontró además que era visualmente aceptable con respecto a la viscosidad y la solvatación y esto incluyó HEC (otro potencial polímero mucoadhesivo). Por lo tanto cinco formulaciones (Formulación 4, 14, 15, 16 y 17) se evaluaron reológicamente por su fuerza mucoadhesiva usando mucina de cerdo.

Evaluación reológica de las Formulaciones 4, 14, 15,16 y 17

El módulo elástico G' es una medida de la resistencia de la muestra a la deformación elástica (es decir, un reflejo de la conectividad de la red de polímero) y G'' es una medida de la resistencia de la muestra a la deformación viscosa.

5 La media de G' y G'' a 5 Hz, promediado de 5 muestras se extrajeron a partir de los datos resultantes para permitir las comparaciones entre diferentes formulaciones. Una expresión que tiene en cuenta la determinación de las diferencias sinérgicas, en términos de G' y G''; entre la mezcla de formulación/mucina y los componentes individuales de esa mezcla se da en la Ecuación 1. Mientras superior, los valores de G' relativo mayor interacción de la formulación con la mucina.

$$G' \text{ Relativo} = \frac{G'_{(\text{formulación mucina})} - (G'_{(\text{formulación})} + G'_{(\text{mucina})})}{(G'_{(\text{formulación})} + G'_{(\text{mucina})})} \quad \text{Ecuación 1}$$

10

15 Una ecuación similar se puede usar para calcular G''. La tan δ se calculó mediante el uso de los valores G' y G'' relativos usando la Ecuación 2.

$$\tan \delta = \frac{\text{Promedio } G'' \text{ relativo}}{\text{Promedio } G' \text{ relativo}} \quad \text{Ecuación 2}$$

20 La figura 7 muestra los valores G' y G'' relativos para todas las cinco formulaciones probadas y la Figura 8 muestra los correspondientes valores tan δ.

Basado en la evaluación reológica, el orden para el aumento en la fuerza mucoadhesiva se encontró que era Formulación 17 > Formulación 16 > Formulación 14 > Formulación 15 > Formulación 4. Sin embargo, las Formulaciones 14 y 15 muestran grandes variaciones (como se observa con las grandes desviaciones estándar). Esto se podría deber a las interacciones no-homogéneas de estas formulaciones con mucina. Además, la G' generada para las formulaciones en agua desionizada se encontró además que tiene grandes variaciones lo que indica así que estas formulaciones muestran hidratación no homogénea. La Formulación 4 se encontró que tiene los valores más altos de G' cuando se mezcla con la mucina, sin embargo, el valor G' fue significativamente inferior (p < 0.05) comparado con todas las otras formulaciones probadas. Esto se atribuyó al hecho de que los valores G' para la Formulación 4 dispersada en agua fueron considerablemente superiores en comparación con todas las formulaciones dispersadas en agua. Parece que la Formulación 4 produjo un gel viscoelástico en agua relativamente bueno (en comparación con las otras formulaciones en agua), sin embargo pareció allí haber una interacción relativamente pequeña con la mucina ya que el valor G' relativo que elimina el efecto de la formulación (así como el efecto de mucina) fue significativamente inferior. Basado en los valores G' relativos, las Formulaciones 16 y 17 mostraron la mayor interacción con la mucina de cerdo deduciendo que estas dos formulaciones se podrían usar como potenciales formulaciones mucoadhesivas. Las Formulaciones 14 y 15 mostraron alguna interacción con la mucina, sin embargo la hidratación/interacción de estas formulaciones podría ser no homogénea como se juzga por las grandes desviaciones estándar. La Formulación 4 mostró el valor G' relativo más bajo y por lo tanto la interacción más baja. Los valores tan δ correspondientes son una medida relativa de la viscoelasticidad, el tan δ inferior indica un entrelazado relativamente superior y por el contrario el tan δ superior indica un entrelazado relativamente bajo (debido a un componente viscoso relativamente más grande) y así apoyan estas observaciones.

Optimización y preparación de formulaciones activas y placebo seleccionadas.

45 El procedimiento de optimización se llevó a cabo para reducir el tiempo de preparación para las formulaciones desde aprox. 24 h a por debajo de aprox. 12 h. Las formulaciones 16 y 17 se escogieron para los estudios de optimización y de estabilidad.

Análisis HPLC de las formulaciones de I3A

Tabla 25 muestra el porcentaje de purezas pico para I3A 'b' así como también el porcentaje del área de la isoforma 'a' y otros picos no asignados (UAP) para las Formulaciones 16 y 17 tomados en el tiempo cero. Se muestra además como un comparador el porcentaje de pureza pico de una muestra 0.1% p/p I3A de gel de IPA en el tiempo cero. Todos los picos para las formulaciones bucales se integraron manualmente y se compararon con las formulaciones de placebo respectivas.

Tabla 25. Porcentaje de purezas pico de las formulaciones en el tiempo cero.

Formulación	% pureza pico I3A 'b'	% isoforma 'a'	% Total UAP
16	99.6	0.3	0.1
17	99.7	0.3	0.0
0.1% p/p gel de IPA	99.2	0.5	0.3

La Tabla 26 muestra el porcentaje de purezas pico para I3A 'b', así como el porcentaje del área de la isoforma 'a' y otros picos no asignados (UAP) para las Formulaciones 16 y 17 tomadas en aproximadamente dos semanas después del almacenamiento a 2-8 °C y 40 °C (estabilidad acelerada). Tabulado además como un comparador está el porcentaje de pureza pico de 0.1 % p/p I3A de gel de IPA almacenado a 40 °C por una semana. Todos los picos de las formulaciones bucales se integran manualmente en comparación con las respectivas formulaciones de placebo.

Tabla 26. Porcentaje de purezas pico cromatográfico de formulaciones al tiempo aprox. 1-2 semanas almacenado a 2-8°C y 40°C.

Formulación	% pureza pico I3A 'b'		% isoforma 'a'		% Total UAP	
	2-8°C	40°C	2-8°C	40°C	2-8°C	40°C
16	99.8	99.2	0.2	0.4	0.0	0.4
17	99.8	99.3	0.2	0.4	0.0	0.3
*0.1% p/p gel de IPA	ND	98.3	ND	1.6	ND	0.1
*Pureza pico después de una semana; ND - no determinado						

No parece haber ninguna diferencia aparente en el porcentaje de pureza pico de I3A en cualquiera de las formulaciones, en el tiempo cero al valor inicial en el recibo (99.3% I3A 'b', reporte PB21001/24). Además, el porcentaje del área de la isoforma 'a' en el recibo fue 0.40%, que es similar al porcentaje de área pico para la isoforma 'a' en el tiempo cero (Tabla 25).

No hubo un aumento notable en el porcentaje de la isoforma 'a' después de aproximadamente 1-2 semana de almacenamiento de las formulaciones bucales, a 2-8°C (Tabla 26), mientras que un aumento en el porcentaje de la isoforma 'a' se observó para todas las muestras bucales almacenadas a 40°C. Sin embargo, el aumento en el porcentaje de la isoforma 'a' observado para el 0.1 % p/p gel de IPA fue superior (1.60%) después de 1 semana de almacenamiento a 40°C. Basado en el porcentaje de las purezas pico, este dato preliminar parece indicar que las formulaciones I3A bucales son al menos tan estable como gel de IPA 0.1 % de I3A y posiblemente aún más estable.

EJEMPLO 6

Formulaciones de poloxámero

Cuatro formulaciones de poloxámero se investigaron.

MATERIALES

Material	Suministrador
I3A 'b'	Peplin Limited, Australia.
Lote núm. 0319.	
Ácido cítrico monohidrato BP Lote núm. R11115	Raught Ltd, Reino Unido
Citrato trisódico dihidrato BP Lote núm. R0092143	Raught Ltd, Reino Unido

Material	Suministrador
Agua desionizada	Millipore, Reino Unido
Poloxámero 407 (Lutrol F127) Lote núm. WPTY562B	BASF, Alemania
Etanol (Analar) 99.7-100% p/p Lote núm. L354007	BDH, Reino Unido
Polietilenglicol 400 (PEG 400) Lote núm. 53820403 312	Merck, Alemania
Propilenglicol Lote núm. K32254378 336	Merck, Alemania
Acetonitrilo (ACN) Gradiente HPLC Grado Lote núm. 0309807	Fisher Scientific, Reino Unido
Ácido trifluoroacético (TFA) Lote núm. 0263747	Fisher Chemicals, Reino Unido
Alcohol bencílico Ph Eur, BP, NF Lote núm. K31593981 301	Merck KGaA, Alemania

MÉTODOS

Selección de los excipientes

- 5 Antes de los estudios de preformulación, se identificaron varios excipientes adecuados para las formulaciones de poloxámero, y se enumeran más abajo junto con las concentraciones máximas recomendadas.

Excipientes	Concentración
<i>Propilenglicol</i>	75.2 %p/v (IM); 60.0 %v/v (IV)
<i>*PEG 400</i>	65.0 %p/v (IV); 18 %v/v (IM)
Alcohol bencílico	3.0 %p/v (IV)
Ácido cítrico	1.0 % p/v (IM)
Citrato sódico	2.85% p/v (IM)
*Usado para la formulación de control	

Preparación de formulaciones para estudios reológicos

- 10 Varias formulaciones placebo de poloxámero 407 se prepararon usando los excipientes enumerados anteriormente para evaluar el comportamiento reológico.

Preparación del tampón de citrato pH 3

- 15 Ácido cítrico monohidrato (PM 211g/mol) se preparó en agua desionizada a una concentración de 0.1 M. Una solución de citrato trisódico dihidratado, 0.1 M, (PM 294.1 g/mol) se preparó además en agua desionizada. Solución tampón de citrato pH 3 se preparó al mezclar 40% v/v de solución de ácido cítrico monohidrato (0.1 M), 10% v/v solución de citrato trisódico dihidrato (0.1 M) y 50% v/v agua desionizada y el pH final pH se midió usando un pH metro (3320 JENWAY).

20 Preparación de soluciones 'base' de poloxámero 407

Los estudios preliminares indicaron que las soluciones de poloxámero 407 a un intervalo de concentración entre 18-20% p/p fueron adecuados, para proporcionar un intervalo de viscosidades, con valores de cmt variables. Las soluciones de poloxámero se prepararon usando el método en frío reportado por Schmolka (1972).

- 25 En resumen, las cantidades necesarias de poloxámero 407 (Tabla 27) se añadieron ya sea al tampón de citrato pH 3 o propilenglicol/tampón de citrato pH 3 en botellas Duran de vidrio de borosilicato de 100 ml. El propilenglicol/tampón de citrato pH 3 se preparó previamente pesando la cantidad adecuada de propilenglicol y tampón de citrato pH 3 (Tabla 27) y se agitó por 1-2 minutos hasta que fue visualmente homogéneo. Las botellas Durán que contienen los ingredientes se taparon y colocaron en un baño de hielo/agua por 4 h con agitación frecuente cada 15 minutos, hasta que se produjeron las soluciones claras. Estas soluciones se almacenaron a 2-8°C hasta que fue necesario.
- 30

Procedimiento de esterilización

Dado que los geles se requieren para la terapia intralesional, la esterilización es importante. Para lograr la esterilización, los geles preparados se autoclavearon usando el método de BP, donde aproximadamente 100 g de cada uno de los geles enumerados en la Tabla 27 se colocó en botellas Durán de 100 ml y autoclaveó por 15 minutos a 121 °C. Después de este procedimiento, los geles se dejaron enfriar a temperatura ambiente, y se almacenaron después a 2-8 °C hasta que fue necesario.

Tabla 27. Cantidades reales y objetivo de las soluciones 'base' de poloxámero

	Polox-01		Polox-02		Polox-pg-01		Polox-pg-02	
Excipientes	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g
Poloxámero 407	18	18.03366	20	20.0138	18	18.04115	20	20.02152
Propilenglicol					10	10.01009	10	10.01882
Tampón de citrato pH 3	82	82.1126	80	80.1427	72	72.1025	70	70.0849
Total	100	100.146	100	100.157	100	100.154	100	100.125

Tabla 28. Cantidades reales y objetivo de formulaciones de placebo para la evaluación reológica

	Polox-01-placebo		Polox-02-placebo		Polox-pg-01-placebo		Polox-pg-02-placebo	
Excipientes	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g
Polox-01	9.90	9.90671						
Polox-02			9.90	9.90458				
Polox-pg-01					9.90	9.90885		
Polox-pg-02							9.90	9.90033
alcohol bencílico/ Tampón de citrato	0.10	0.10173	0.10	0.10115	0.10	0.10027	0.10	0.10161
Total	10.0	10.00844	10.0	10.00573	10.0	10.00912	10.0	10.00194

Preparación de formulaciones de poloxámero placebo para evaluación reológica

Debido a la inestabilidad de I3A a la esterilización por calor, las formulaciones que contienen I3A deben prepararse mediante la disolución de I3A en un solvente adecuado seguido por la adición aséptica (es decir filtración aséptica) a las soluciones de poloxámero 'base' autoclaveadas. El solvente de selección fue alcohol bencílico. Sin embargo, para la evaluación reológica solamente se prepararon formulaciones de poloxámero placebo que contenían alcohol bencílico debido a la limitada disponibilidad de I3A.

Preparación de la solución de alcohol bencílico/tampón de citrato pH 3

La cantidad de tampón de citrato añadida al alcohol bencílico fue 2.5% p/p, la que estuvo por debajo de la solubilidad del tampón de citrato pH 3 en alcohol bencílico. En resumen, aproximadamente 0.5 g de tampón de citrato pH 3 se añadieron a 19.5 g de alcohol bencílico para dar un porcentaje final de tampón de citrato de 2.5 %p/p en alcohol bencílico. Esta solución se filtró después a través de un filtro Millipore (0.22 µm MILLEX-GV, MILLIPORE) para imitar la condición de filtración aséptica.

Adición de solución de alcohol bencílico/tampón de citrato pH 3 a soluciones 'base' de poloxámero

Las formulaciones de placebo (Tabla 28) se prepararon mediante la adición de la cantidad requerida de alcohol bencílico/tampón de citrato filtrada pH 3 a las soluciones 'base' de poloxámero esterilizadas preparadas anteriormente. En resumen, aproximadamente 9.90 g (se anotó el peso exacto en la Tabla 28) de cada solución 'base' de poloxámero se pesó en un frasco de vidrio de soda de 20 ml y esto se enfrió en hielo/agua para formar un líquido (a temperatura ambiente estas soluciones forman geles). A la 'base' de poloxámero enfriada aproximadamente 0.10 g (peso exacto mostrado en la Tabla

28) de alcohol bencílico/tampón de citrato filtrado pH 3 se añadió y agitó con vórtice por 2 minutos hasta que se obtuvo una solución homogénea visualmente clara. Estas formulaciones se almacenaron después a 2-8°C hasta que fue necesario.

Evaluación reológica

La evaluación reológica se llevó a cabo usando un reómetro Carrimed CSL². Aproximadamente 0.4 g de la muestra de prueba se colocó entre la plataforma y la geometría de placas paralelas. Una vez que la muestra se comprimió entre la plataforma y la placa, cualquier exceso de muestra se retiró cuidadosamente con una espátula en los ángulos rectos a la geometría. Cada muestra se probó un total de tres veces y las viscosidades resultantes se registraron en función de la temperatura.

Preparación de formulaciones activas y placebos relativos para los estudios de estabilidad y liberación

A continuación de la evaluación reológica, las formulaciones de poloxámero activa (I3A) y placebo se prepararon para los estudios la estabilidad y liberación. Además, las formulaciones PEG 400 placebo y activas (0.1% p/p I3A) se prepararon además como formulaciones de control para las pruebas de liberación.

Preparación de I3A concentrada en alcohol bencílico/tampón de citrato

Aproximadamente 50 mg (cantidad objetivo) de I3A se pesó con precisión en un frasco bijou de vidrio de 7 ml junto con 500 mg (cantidad objetivo) de alcohol bencílico/Tampón de citrato pH 3. Esta mezcla se agitó con vórtice periódicamente por 5 minutos hasta que el I3A se disolvió.

Preparación de formulaciones de poloxámero placebo y activo.

Las formulaciones de placebo se prepararon como se describió anteriormente (Tabla 28). Las formulaciones de poloxámero activo (I3A) que contienen una concentración objetivo de 0.1 % p/p I3A 'b' se prepararon de manera similar a las formulaciones de placebo excepto que el peso extra debido a la adición del I3A 'b' se compensó por una reducción similar en la cantidad de solución 'base' de poloxámero añadido (Tabla 29). En resumen, aproximadamente 110 mg (se anotó el peso exacto) de I3A/alcohol bencílico/Tampón de citrato pH 3 se añadió a 9.89 g de la solución 'base' de poloxámero esterilizada, enfriada, y se agitó con vórtice por aprox. 2 minutos hasta que se obtuvo una solución homogénea visualmente clara. Los pesos exactos y pesos objetivos se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Cantidades reales y objetivo de las formulaciones de poloxámero activo para estudios de estabilidad y liberación

	Polox-01-activo		Polox-02-activo		Polox-pg-01-activo		Polox-pg-02-activo	
Excipientes	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g
Polox-01	9.89	9.89261						
Polox-02			9.89	9.89098				
Polox-pg-01					9.89	9.89461		
Polox-pg-02							9.89	9.89704
*I3A/alcohol bencílico/ tampón de citrato	0.11	0.11051	0.11	0.109.99	0.11	0.11496	0.11	0.11338
Total	10.0	10.00312	10.0	10.00097	10.0	10.00957	10.0	10.01042

*Exacto I3A en alcohol bencílico/tampón de citrato pH 3 = 0.09118 g/g

Tabla 30. Cantidades reales y objetivo de las formulaciones PEG400 control placebo y activas para estudios de liberación

	PEG 400-placebo		PEG 400-activo	
Excipientes	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g
PEG400	7.92	7.92151	7.912	7.91457

Excipientes	PEG 400-placebo		PEG 400-activo	
	peso objetivo/g	peso real/g	peso objetivo/g	peso real/g
Tampón de citrato pH 3	1.98	1.97021	1.978	1.99458
Alcohol bencílico	0.10	0.10592		
*I3A/alcohol bencílico			0.11	0.11274
Total	10.0	10.02189	10	10.02189
Exacto I3A en alcohol bencílico = 0.09155 g/g				

Preparación de formulaciones PEG400 control

5 Siguiendo un procedimiento similar, se añadió 12.5 mg de I3A a 125 mg de alcohol bencílico, que había sido previamente filtrado a través de un filtro Millipore (0.22 μm MILLEX-GV, MILLIPORE). Esta solución se agitó con vórtice por aproximadamente 5 minutos hasta que el I3A se disolvió completamente. Para preparar las formulaciones de control activas aproximadamente 110 mg de esta mezcla se añadió a una solución de 7.912 g de PEG400 y 1.978 g de tampón de citrato pH 3. Los placebos se prepararon de manera similar, excepto que aproximadamente se usaron 7.92 g de PEG400 y 1.98 g de tampón de citrato y 100 mg de alcohol bencílico esterilizado. Los pesos exactos y pesos objetivos se muestran en la 10 Tabla 6 de las formulaciones PEG 400 placebo y activas, respectivamente.

Condiciones de almacenamiento para formulaciones de poloxámero activas y placebo

15 Las alícuotas de cada una de la formulación poloxámero 407 (placebo o activo) se dispensaron en frascos de vidrio ámbar con tapa de rosca de 2 ml (vidrio de borosilicato), sellaron y almacenaron a tres condiciones de almacenamiento a saber 2-8 $^{\circ}\text{C}$, 25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ y 40 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ para estudios de estabilidad.

Prueba de estabilidad del I3A en formulaciones de poloxámero

20 Para el propósito de evaluación del producto fármaco un método de extracción se fijó para evaluar la degradación de I3A 'b' a la isoforma 'a' (pureza pico cromatográfico). La extracción de I3A a partir de la formulación activa fue como sigue (el mismo procedimiento se usó además para la formulación placebo). En resumen, aproximadamente 0.5 g de la formulación se pesó con precisión en un frasco volumétrico de 5 ml y completó hasta la marca con acetonitrilo grado HPLC/tampón de citrato pH 3 (90:10 v/v). La solución se alícuotó en frascos de HPLC y se analizó. 25

Los datos preliminares de recuperación (no mostrados) indicaron que aprox. 80 % o más de I3A 'b' se recuperó a partir de la formulación activa y más significativamente, no hubo interferencia de ninguno de los excipientes de la formulación. Las formulaciones se analizaron en t = 0 y los estudios de estabilidad acelerada (40 $^{\circ}\text{C}$) se llevaron a cabo en t = 5 semanas.

30 Estudios preliminares de liberación de I3A

La liberación de I3A 'b' de las formulaciones a través de la membrana sintética se investigó usando las células de difusión de Franz bajo condiciones ocluidas.

35 Selección del fluido receptor

El fluido receptor empleado para tratar y mantener las condiciones de inmersión fue de 20% v/v de etanol/tampón de citrato (pH 3.0) y este se incorporó en la célula de Franz y se agitó constantemente con un agitador magnético. Se llevaron a cabo estudios preliminares de estabilidad en I3A en 20% v/v etanol/tampón de citrato (pH 3.0) a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante aprox. 18 h. El aumento del porcentaje de área pico en la isoforma 'a' después de 18 h se encontró que era 0.26%. Para el propósito del estudio célula de Franz esto se consideró aceptable. La solubilidad cinética de I3A en 20% v/v de etanol/tampón de citrato (pH 3.0) se determinó que era 509.7 \pm 3 $\mu\text{g/ml}$ a 25 $^{\circ}\text{C}$. 40

45 Estudios de liberación *in vitro* (célula de Franz)

Células de difusión de Franz calibradas individualmente con un área de superficie de difusión promedio de 0.53 cm^2 y un volumen del receptor promedio de 1.85 \pm 0.02 ml se usaron para realizar el estudio de liberación. Las membranas de celulosa regeneradas (MWCO 12000-14000) se prepararon, se cortaron y se montaron en las células de Franz. Las membranas se dejaron equilibrar con la fase receptora por 30 minutos antes de aplicar las formulaciones. Una dosis infinita

de 0.5 g de cada formulación se aplicó en la superficie de la membrana usando un desplazamiento positivo Finnpiette®. Una lectura de la muestra se investigó (26 h después de la aplicación del gel) de manera que 200 µl del fluido receptor se retiró cuidadosamente desde el brazo de la célula de Franz. A lo largo del experimento, se reemplazaron las pérdidas en el líquido receptor debido a la evaporación de las células de Franz para mantener un volumen constante. El experimento se realizó en condiciones ocluidas (la parte superior de los pocillos superiores de donantes se cubrió con Parafilm®), para todas las formulaciones (n=3 células de Franz por formulación activa y n=1 células de Franz por formulación placebo). Las muestras se analizaron a través de HPLC, como se describió en el Ejemplo 1, y la concentración de I3A 'b' liberada se evaluó usando una serie de estándares de calibración preparados en 80 % v/v de tampón de citrato/20 % v/v de etanol.

RESULTADOS

Esterilización de soluciones 'base' de poloxámero

Inmediatamente después de la esterilización de las soluciones 'base' de poloxámero, polox-01 y polox-02 -sin propileno mostraron separación de fase. Una vez enfriadas en hielo/agua estas soluciones se convirtieron en fases homogéneas, claras. Sin embargo, las soluciones 'base' que contienen propilenglicol, polox-pg-01 y polox-pg-02 no mostraron separación de fase inmediatamente después de la esterilización, lo que sugiere que la adición de propilenglicol inhibe este fenómeno.

Evaluación reológica

Los estudios reológicos se llevaron a cabo en formulaciones de poloxámero placebo y la viscosidad (Pa.s) se determinó en función de la temperatura (°C), con el intervalo de temperatura de 4-40°C. El valor ctm se determinó tomando el punto medio de la inflexión. Para todas las formulaciones de placebo hubo un pequeño aumento en la viscosidad con el aumento de temperatura hasta que en un punto determinado, en la cmt, hubo un aumento espectacular en la viscosidad con un pequeño aumento de la temperatura. Se encontró que el valor de la cmt era dependiente de la concentración, es decir, mientras menor es la concentración de poloxámero 407, el valor cmt será superior. Además, la adición de propilenglicol a las formulaciones poloxámero placebo redujo además la cmt. Sin embargo, por encima de la cmt, las viscosidades para las mismas muestras aumentaron aproximadamente 1.5-2 veces en comparación con las respectivas formulaciones libres de propilenglicol. Por ejemplo, a 37 °C, la viscosidad de Polox-01-placebo se encontró que era aprox. 1.2 Pa.s, mientras que la respectiva formulación placebo de propilenglicol (Polox-pg-01-placebo) se encontró que era 2.4 Pa.s. Por lo tanto, la adición de propilenglicol parece aumentar la viscosidad por encima del valor cmt, sin embargo, se reduce el valor real cmt. Tabla 31 resume los valores cmt y viscosidades a 37°C para todas las formulaciones.

Tabla 31. Valores cmt y viscosidades (a 37°C) para todas las formulaciones de poloxámero placebo (n=3 ± SEM)

	Polox-01-placebo	Polox-02-placebo	Polox-pg-01-placebo	Polox-pg-02-placebo
Cmt/°C	28.5 ± 0.07	21.9 ± 0.03	22.7 ± 0.00	18.2 ± 0.03
Viscosidad (Pa.s) a 37°C	1.2 ± 0.08	2.9 ± 0.06	2.4 ± 0.01	3.4 ± 0.04

Estudios de estabilidad del I3A en formulaciones de poloxámero

Tabla 32 muestra el porcentaje de purezas pico para I3A 'b' así como también el porcentaje del área de la isoforma 'a' y otros picos no asignados (UAP) para todas las formulaciones de poloxámero activas tomados en el tiempo cero. Se muestra además como un comparador el porcentaje de pureza pico de un gel de IPA 0.1% p/p I3A en el tiempo cero. Todos los picos se integraron manualmente y se compararon con las formulaciones de placebo respectivas.

Tabla 32. Porcentaje de purezas pico de las formulaciones en el tiempo cero.

Formulación	% pureza pico I3A 'b'	% isoforma 'a'	% Total UAP
Polox-01-activo	99.8	0.2	0.0
Polox-02-activo	99.8	0.2	0.0
Polox-pg-01-activo	99.8	0.2	0.0
Polox-pg-02-activo	99.8	0.2	0.0
0.1% p/p gel de IPA	99.2	0.5	0.3

Tabla 33 muestra el porcentaje de purezas pico para el I3A 'b' así como también el porcentaje del área de la isoforma 'a' y otros UAP para todas las formulaciones activas tomadas a las cinco semanas después del almacenamiento a 40°C (estabilidad acelerada). Se tabuló como un comparador además el porcentaje de pureza pico del gel de IPA 0.1% p/p I3A almacenado a 40°C por cuatro semanas. Todos los picos se integraron manualmente en comparación con la formulación de placebo respectiva.

Tabla 33. Porcentaje de purezas pico cromatográficas de formulaciones en el tiempo de cinco semanas, almacenado a 40°C.

Formulación	% pureza pico I3A 'b'	% isoforma 'a'	% Total UAP
Polox-01-activo	95.6	2.6	1.8
Polox-02-activo	93.3	2.8	3.9
Polox-pg-01-activo	92.2	2.7	5.1
Polox-pg-02-activo	93.3	3.0	3.7
*0.1% p/p gel de IPA	94.8	4.7	0.5
*Probado después de cuatro semanas de almacenamiento a 40°C usando el método HPLC 1			

No hay ninguna diferencia evidente en el porcentaje de pureza pico del I3A en ninguna de las formulaciones de poloxámero. En el tiempo cero, sin embargo, el porcentaje de la isoforma 'a' es inferior para estas formulaciones comparado con el gel de IPA I3A, posiblemente como resultado de la adición de una pequeña cantidad de tampón de citrato pH 3 añadido al alcohol bencílico durante la fabricación de las formulaciones.

Un aumento en el porcentaje de la isoforma 'a' se observó para todas las formulaciones de poloxámero activos después de cinco semanas de almacenamiento a 40°C. Sin embargo, el aumento en el porcentaje de la isoforma 'a' observado para el 0.1 % p/p de gel de IPA fue superior (4.7 %) después de cuatro semanas de almacenamiento a 40°C. Basado en los porcentajes de purezas pico estos datos parecen indicar que la estabilidad de las formulaciones de poloxámero I3A son comparables al gel de IPA 0.1 % I3A.

Estudios preliminares de liberación

La Figura 9 muestra la cantidad liberada ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) después de 26 h, de I3A a partir de formulaciones 0.1% p/p gel de poloxámero y PEG 400. No se encontró diferencia significativa en la liberación ($p>0.05$) entre ninguna de las formulaciones de poloxámero, sin embargo la liberación de todas las formulaciones de poloxámero fue significativamente más lenta ($p<0.05$) que la liberación de la formulación PEG400 control. La cantidad de I3A 'b' liberada promediada para todas las formulaciones de poloxámero fue aprox. $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ mientras que la cantidad liberada de la formulación PEG 400 control fue aprox. $53 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; esto representa una reducción de aprox. 70 % en la cantidad de I3A 'b' liberada de todas las formulaciones de poloxámero en comparación con el control después de 26 h.

RESULTADOS

Cuatro formulaciones de poloxámero se investigaron en este estudio. Estos geles de poloxámero dieron un aumento en la viscosidad (a 37 °C), donde la viscosidad de polox-01-placebo < polox-pg-01-placebo < polox-02-placebo < polox-pg-02-placebo. Además, la adición de propilenglicol parece aumentar la viscosidad por encima del valor cmt, sin embargo, se reduce el valor real cmt.

La estabilidad de los geles de poloxámero parece ser comparable con el gel de IPA 0.1 % I3A bajo condiciones aceleradas.

Estudios de liberación mostraron que no hubo diferencia significativa en la liberación ($p>0.05$) entre ninguna de las formulaciones de poloxámero; sin embargo, la liberación de todas las formulaciones de poloxámero fue significativamente más lenta ($p<0.05$) que la liberación de la formulación PEG 400 control. Además, se observó una reducción de aprox. 70% en la cantidad de I3A 'b' liberada de todas las formulaciones de poloxámero en comparación con el control, después de 26 h.

EJEMPLO 7

La liberación *in vitro* de I3A 'b' de formulaciones intralesionales basadas en aceite se investigó en comparación con la formulación PEG 400 control.

MATERIALES

Material	Suministrador
I3A 'b'	Peplin Limited, Australia.
Lote núm. 0319.	
Ácido cítrico monohidrato BP Lote núm. R11115	Raught Ltd, Reino Unido
Citrato trisódico dihidrato BP	
Lote núm. R0092143	
Agua desionizada	Millipore, Reino Unido
Crodamol GTC/C (Triglicéridos de cadena media)	Croda, Singapore
Lote núm. GE03907/3270	
Etanol (Analar) 99.7-100% p/p	BDH, Reino Unido
Lote núm. L354007	
Polietilenglicol 400 (PEG 400)	Merck, Alemania
Lote núm. 53 820403 312	
Alcohol bencílico Ph Eur, BP, NF	
Lote núm. K31593981301	Fisher Scientific, Reino Unido
Acetonitrilo (ACN) Gradiente grado HPLC	
Lote núm. 0309807	
Ácido trifluoroacético (TFA)	
Lote núm. 0263747	
Hidroxitolueno butilado (BHT)	Jan Dekker International, Países Bajos
Lote núm. CHASMP115	

MÉTODOS

5 **Preparación de I3a (activo) y formulaciones de placebo para estudios de liberación**

10 Se prepararon tres formulaciones de aceite con los placebos respectivos. La cantidad de alcohol bencílico se mantuvo a 1% p/p. La preparación de dos formulaciones involucra la adición de un antioxidante antes de la esterilización con calor del aceite o la adición de antioxidante después de la esterilización del aceite.

15 **Preparación de la formulación de aceite (como se reporta en PB23001/2) 'Croda-BA'**

20 **Esterilización de aceite de nuez de coco fraccionado**

Aproximadamente 100 g del aceite de nuez de coco fraccionado (CRODAMOL GTC/C) se pesó en un frasco cónico de 100 ml (vidrio de borosilicato), se tapó (tapón de vidrio de borosilicato) y se colocó dentro de un horno pre-calentado (Gallenkampf Hot box Oven con ventilador, Tamaño 2) a $170 \pm 2^\circ\text{C}$ por 1 h. Después de este procedimiento, el aceite se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su uso.

25 **Adición de I3A al aceite esterilizado**

Aproximadamente 15 mg de I3A se pesó con precisión en un frasco de vidrio de 20 ml y se añadió aproximadamente a 150 mg de alcohol bencílico (se anotó el peso exacto), que se había filtrado previamente a través de un filtro MILLEX-GV de 0.22 μm . Esta mezcla se agitó con vórtice periódicamente por aproximadamente 2 h hasta que el I3A se disolvió en el alcohol bencílico. A esta mezcla se añadió aproximadamente 14.835 g del aceite esterilizado y se agitó con vórtice por aproximadamente 5 minutos hasta que se obtuvo una solución homogénea. El placebo se preparó de manera similar

excepto que aproximadamente 14.85 g del aceite esterilizado (se anotó el peso exacto) se usó para compensar el I3A. Pesos exactos y composiciones porcentuales se muestran en la Tabla 34 y 35 para las formulaciones activas (I3A) y placebo.

5 **Tabla 34. Cantidades objetivo y reales (y % p/p) para la formulación de aceite Croda/BA de I3A**

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
I3A (0319)	15 mg	0.10	15.56 mg	0.104
Alcohol bencílico	150 mg	1.0	159.98 mg	1.065
Aceite de nuez de coco fraccionado	14.835 g	98.9	14.84625	98.831
Total	15 g	100	15.02179 g	100
*Redondeado hasta 3 d.p.				

Tabla 35. Cantidades objetivo y reales (y % p/p) para la formulación de aceite placebo Croda/BA

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
Alcohol bencílico	150 mg	1.0	149.84 mg	0.999
Aceite de nuez de coco fraccionado	14.85 g	99.0	14.85161 g	99.001
Total	15 g	100	15.00145 g	100
*Redondeado hasta 3 d.p.				

10

Preparación de formulación de aceite 'Croda-BA/Antiox'

El almacenamiento a largo plazo de los aceites puede conducir a la rancidez, que pueda perjudicar el producto fármaco. Por lo tanto, puede incluirse un antioxidante en la formulación (después de la esterilización por calor) para reducir este efecto. Formulaciones placebo y activas que contienen un antioxidante después de la esterilización por calor del aceite se prepararon de acuerdo con la metodología siguiente.

Preparación de la mezcla antioxidante/alcohol bencílico

20 Aproximadamente 60 mg de antioxidante (BHT) se disolvieron en 2 g de alcohol bencílico y se filtró a través de un filtro MILLEX-GV de 0.22 µm.

Adición de I3A al aceite esterilizado

25 Aproximadamente 15 mg de I3A (lote 0319) se pesó con precisión en un frasco de vidrio de 20 ml y se añadió a aproximadamente 154.5 mg de BHT/alcohol bencílico preparado como anteriormente. Esta mezcla se agitó con vórtice periódicamente aproximadamente 2 h hasta que el I3A se disolvió en el alcohol bencílico. A esta mezcla se añadió aproximadamente 14.8305 g del aceite esterilizado frío y se agitó con vórtice por aproximadamente 5 minutos hasta que se obtuvo una solución homogénea. El placebo se preparó de manera similar excepto que aproximadamente 14.8455 g del aceite esterilizado (se anotó el peso exacto) se usaron para compensar el I3A. Pesos exactos y composiciones porcentuales se muestran en la Tabla 36 y 37 para las formulaciones activas (I3A) y placebo.

30

Tabla 36. Cantidades objetivo y reales (y % p/p) para la formulación de aceite Croda-BA/Antiox de I3A.

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
I3A (0319)	15 mg	0.10	15.14 mg	0.101
Alcohol bencílico	150 mg	1.0	158.27 mg	1.055
BHT	4.5 mg	0.03	4.55 mg	0.030
Aceite de nuez de coco fraccionado	14.8305 g	98.87	14.83014 g	98.814
Total	15 g	100	15.0081 g	100

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
*Redondeado hasta 3 d.p.				

Tabla 37. Cantidades objetivo y reales (y % p/p) para la formulación de aceite placebo Croda-BA/Antiox

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
Alcohol bencílico	150 mg	1.0	150.56 mg	1.004
BHT	4.5 mg	0.03	4.55 mg	0.030
Aceite de nuez de coco fraccionado	14.8455 g	98.97	14.84591 g	98.966
Total	15 g	100	15.00102 g	100
*Redondeado hasta 3 d.p.				

Preparación de formulación de aceite 'Croda/Antiox-BA'

La esterilización por calor en seco de aceites puede conducir además a la rancidez, lo que degrada el producto fármaco. Por lo tanto, puede incluirse un antioxidante en la formulación para reducir este efecto antes de la esterilización por calor. Las formulaciones placebo y activas que contienen un antioxidante antes de la esterilización por calor del aceite se prepararon de acuerdo con la metodología siguiente.

Esterilización de la mezcla antioxidante/aceite

Aproximadamente 15 mg de antioxidante (BHT) se disolvió en aproximadamente 50 g de aceite en un frasco cónico de 100 ml (vidrio de borosilicato), se tapó (tapón de procedimiento de esterilización) y se colocó dentro de un horno pre-calentado (Gallenkampf Hot box Oven con ventilador, Tamaño 2) a $170 \pm 2^\circ\text{C}$ por 1 h. Después de este procedimiento, el antioxidante/aceite se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su uso.

Adición de I3A al aceite esterilizado

Aproximadamente 15 mg de I3A (lote 0319) se pesó con precisión en un frasco de vidrio de 20 ml y se añadió a aproximadamente 150 mg de alcohol bencílico, que se había filtrado previamente a través de un filtro MILLEX-GV de 0.22 μm . Esta mezcla se agitó con vórtice periódicamente por aproximadamente 2 h hasta que el I3A se disolvió en el alcohol bencílico. A esta mezcla se añadió aproximadamente 14.835 g de la mezcla de antioxidante/aceite esterilizada fría y se agitó con vórtice por aproximadamente 5 minutos hasta que se obtuvo una solución homogénea. El placebo se preparó de manera similar excepto que aproximadamente 14.8455 g del aceite esterilizado (se anotó el peso exacto) se usó para compensar el I3A. Pesos exactos y composiciones porcentuales se muestran en las Tablas 38 y 39 para las formulaciones activas (I3A) y placebo.

Tabla 38. Cantidades objetivo y reales (y % p/p) para la formulación de aceite Croda/Antiox-RA de I3A.

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
I3A (0319)	15 mg	0.10	15.09 mg	0.100
Alcohol bencílico	150 mg	1.0	146.92 mg	0.979
BHT	4.5 mg	0.03	4.42 mg	0.030
Aceite de nuez de coco fraccionado	14.8305 g	98.87	14.83568 g	98.891
Total	15 g	100	15.00211 g	100
*Redondeado hasta 3 d.p.				

Tabla 39. Cantidades objetivo y reales (y % p/p) para la formulación de aceite placebo Croda/Antiox-BA

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
Alcohol bencílico	150 mg	1.0	153.9 mg	1.025
BHT	4.5 mg	0.03	4.67 mg	0.031

	Peso objetivo	Objetivo % p/p	Peso real	*Real % p/p
Aceite de nuez de coco fraccionado	14.8455 g	98.97	14.85901 g	98.944
Total	15 g	100	15.01758 g	100
*Redondeado hasta 3 d.p.				

Las alícuotas de todas las formulaciones se almacenaron para los estudios preliminares de liberación y el resto se alícuotaron en frascos de vidrio borosilicato de color ámbar de 2 ml, sellaron y almacenaron a 2-8 °C y 25 °C para los estudios de estabilidad.

5

Estudios preliminares de liberación de I3A

La liberación de I3A 'b' de las formulaciones a través de la membrana sintética se investigó usando las células de difusión de Franz bajo condiciones ocluidas.

10

Selección del fluido receptor

El fluido receptor empleado para tratar y mantener las condiciones de inmersión fue de 20% v/v de etanol/tampón de citrato (pH 3.0) y este se incorporó en la célula de Franz y se agitó constantemente con un agitador magnético. Se llevaron a cabo estudios preliminares de estabilidad en I3A en 20% v/v etanol/tampón de citrato (pH 3.0) a 37°C durante aprox. 18 h. El aumento del porcentaje de área pico en la isoforma 'a' después de 18 h se encontró que era 0.26%. Para el propósito del estudio célula de Franz esto se consideró aceptable. La solubilidad cinética de I3A en 20% v/v de etanol/tampón de citrato (pH 3.0) se determinó que era 509.7 ± 3 µg/ml a 25 °C.

15

20

Estudios de liberación *in vitro* (célula de Franz)

Células de difusión de Franz calibradas individualmente con un área de superficie de difusión promedio de 0.53 cm² y un volumen del receptor promedio de 1.85 ± 0.02 ml se usaron para realizar el estudio de liberación. Las membranas de celulosa regeneradas (MWCO 12000-14000) se prepararon, se cortaron y se montaron en las células de Franz. Las membranas se dejaron equilibrar con la fase receptora por 30 minutos antes de aplicar las formulaciones. Una dosis infinita de 0.5 g de cada formulación se aplicó en la superficie de la membrana usando un desplazamiento positivo Finnpiette®. Una lectura de la muestra se investigó (26 h después de la aplicación del gel) de manera que 200 µl del fluido receptor se retiró cuidadosamente desde el brazo de la célula de Franz. A lo largo del experimento, se reemplazaron las pérdidas en el fluido receptor debido a la evaporación de las células de Franz para mantener un volumen constante. El experimento se realizó bajo condiciones ocluidas (la parte superior de los pocillos superiores de donantes se cubrió con Parafilm®), para todas las formulaciones (n=3 células de Franz por formulación activa y n=1 células de Franz por formulación placebo). Las muestras se analizaron por medio de HPLC y la concentración de I3A 'b' liberada se evaluaron usando una serie de estándares de calibración preparados en 80% v/v tampón de citrato/20% v/v etanol.

25

30

35

Método HPLC

El método HPLC previamente descrito en el Ejemplo 1 se usó para la determinación del I3A.

Resultados

40

Estudios preliminares de liberación

[0205] La figura 10 muestra la cantidad de I3A 'b' liberada (µg/cm²) después de 26 h, a partir de formulaciones 0.1% p/p aceite y PEG 400. No se encontró diferencia significativa en la liberación (p>0.05) entre ninguna de las formulaciones de aceite. Sin embargo, la liberación de I3A 'b' de todas las formulaciones de aceite fue significativamente menor (p<0.05) que la liberación de la formulación PEG 400 control. La cantidad de I3A 'b' liberada de todas las formulaciones de aceite fue de aprox 3.4 µg/cm² sin embargo la cantidad liberada de la formulación PEG 400 control fue aprox. 16 veces mayor (53 µg/cm²). Además, parece que la adición de BHT (antioxidante) no afectó significativamente la liberación de I3A 'b' de las formulaciones de aceite.

45

50

EJEMPLO 8

Estabilidad de las formulaciones de gel de IPA

Se determinó la estabilidad (T=12 meses) de I3A 'b' en formulaciones de gel de IPA preparadas usando diferentes pH de tampones de citrato. El intervalo de pH fue de 2.5 a 4.0.

5 MATERIALES

Materiales	Suministrador
Acetonitrilo (grado HPLC)	Fisher Chemicals, Reino Unido
Lote núm. 0444972	
Ácido Cítrico Monohidrato (grado UPS)	Merck, Alemania
Lote núm. K9129642	
Agua desionizada (MilliQ)	Millipore, Reino Unido
I3Ab (ingenol angelato)	Suministrado por Peplin Limited, Australia
Lote núm. PEP 0401	
Citrato trisódico dihidrato (grado UPS)	Merck, Alemania
Lote núm. K9125363	
Ácido trifluoroacético (grado HPLC)	Fisher Scientific, Reino Unido
Lote núm. 0434753	

MÉTODOS

10 Instrumentación y metodología HPLC

Se analizaron las soluciones de muestra para el porcentaje de pureza pico por HPLC. Las condiciones cromatográficas para el método de HPLC 2 se detallan más abajo:

15 Instrumentación:

Automuestreador Waters Alliance 2695 Separations Module plus (SN: L96SM4656N)
 Detector Waters 996 PDA (SN: MX7AM7987M)
 Software Millennium³², Versión 4.00

20

Condiciones cromatográficas:

Columna:	Symmetry C ₁₈ - 5 µm (Waters) (SN: T70641T 12)
Longitud de la columna:	150 x 3.90 mm
Temperatura de la columna:	30°C ± 2°C
Precolumna:	Symmetry C ₁₈ - 5 µm (Waters) (PN: WAT054225)
Longitud de la precolumna:	20 x 3.90 mm
Fase móvil:	0.02% v/v TFA en agua (A); 0.02% v/v TFA en acetonitrilo (B)
	A:B, 50:50 (composición de partida)
Régimen de flujo:	1.0 ml/min
Temperatura automuestreador:	del 8°C ± 2°C
Longitud de onda UV:	230 nm

Volumen de inyección:	10 µl
Tiempo de ejecución:	20 minutos

Gradientes

Etapa	Tiempo	Flujo	%A	%B	Curva
1		1.00	50.0	50.0	
2	2.00	1.00	50.0	50.0	6
3	5.00	1.00	40.0	60.0	6
4	12.00	1.00	20.0	80.0	6
5	16.00	1.00	20.0	80.0	6
6	16.50	1.00	50.0	50.0	6
7	20.00	1.00	50.0	50.0	6

5 **Extracción de I3Ab a partir de las formulaciones del gel de IPA**

El I3Ab se extrajo a partir de cada una de las formulaciones del gel de IPA como sigue; aproximadamente 0.5 g de cada formulación de gel activa o placebo se pesó con precisión en un frasco volumétrico de 5 ml grado A. Esto se realizó por triplicado para cada formulación. Tampón de citrato (pH=3.0, 0.5 ml) se añadió después a cada muestra de gel y se mezcló con vórtice a velocidad máxima durante 1 min y después se transfirió a un agitador orbital y se agitó a 400 rpm por 30 minutos. Se añadió acetonitrilo grado HPLC, hasta un volumen, a cada uno de los frascos volumétricos y mezcló con vórtice nuevamente a una velocidad máxima por 1 min. Por último, los frascos volumétricos se transfirieron a un agitador orbital y se agitaron a 400 rpm durante 60 minutos. Las alícuotas se transfirieron después a frascos de HPLC para el análisis.

15 **Medición del pH aparente de geles de placebo**

El pH aparente de los geles de placebo se midió usando un pH metro Jenway 3320 con una combinación de electrodos de pH. En resumen, aproximadamente 0.5 g de cada gel se transfirió a frascos de vidrio de 25 ml y se dejó reposar a temperatura ambiente por al menos 1 h. La combinación de electrodos de pH se colocó en el gel de IPA asegurando que toda la membrana del electrodo estuviera cubierta con el gel. La lectura en el pH metro se dejó asentar por un mínimo de 1 minuto y se registró el pH aparente del gel.

RESULTADOS

25 **Medición del pH aparente de geles de placebo a T=12 meses**

El pH aparente de los geles de placebo e IPA a T=0 y T=12 meses después del almacenamiento a 2-8°C se muestra en la Tabla 40.

30 **Tabla 40 pH aparente de los geles placebo de IPA a T=0 y T=12 meses**

pH tampón de citrato (±0.05)	pH aparente de gel de placebo T=0 (n=1)	pH aparente de gel de placebo T=12 meses (n=1)
2.50	3.07	2.97
2.75	3.34	3.19
3.00	3.62	3.57
3.50	4.22	4.23
4.00	4.74	4.75

Los datos de la Tabla 40 muestran que no hubo ningún cambio significativo en el pH aparente, después de 12 meses de almacenamiento a 2-8 °C, para los geles de IPA placebo preparados con tampones de citrato pH 3.00, 3.50 y 4.00. Sin embargo, para los geles de IPA placebo preparados con tampones de citrato pH 2.50 y 2.75 hubo una ligera reducción en el

pH observado después de 12 meses de almacenamiento a 28 °C. La reducción en el pH observado para estos geles pueden ser atribuible a la evaporación de IPA a partir del gel ya sea durante el almacenamiento o durante el análisis de la muestra.

Porcentaje de pureza pico de los isómeros de I3A en geles de IPA activos a T=12 meses

5

Tabla 41 muestra el porcentaje de pureza pico de los isómeros de I3A para las diferentes formulaciones de gel de IPA activos (0.1% p/p) después del almacenamiento por 12 meses a 2-8°C y la Tabla 42 muestra la comparación del porcentaje de pureza pico del I3Aa a T=0 y T=12 meses.

10 **Tabla 41 Porcentaje de pureza pico de los isómeros de I3A para los geles de IPA activo después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C**

pH del Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente de gel de placebo (T=12 meses)	Porcentaje de pureza pico (medio ±SD, n=3)		
		Porcentaje de pureza pico de la isoforma a	Porcentaje de pureza pico del I3Ab	Porcentaje de pureza pico de otros UAP
2.50	2.97	0.64 ± 0.22	99.12 ± 0.40	0.24 ± 0.20
2.75	3.19	1.07 ± 0.16	98.32 ± 0.61	0.31 ± 0.17
3.00	3.57	1.26 ± 0.24	98.66 ± 0.31	0.08 ± 0.12
3.50	4.23	2.09 ± 0.17	97.74 ± 0.27	0.17 ± 0.11
4.00	4.75	4.92 ± 0.05	94.84 ± 0.07	0.24 ± 0.04

Datos analizados usando el método HPLC 2

15

El dato en la Tabla 41 muestra que, después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C, hay un aumento en el porcentaje de pureza pico de la isoforma a con aumento del pH aparente de la formulación de gel placebo respectiva. Por ejemplo, un gel de IPA producido con tampón de citrato pH 2.75 tiene un porcentaje de pureza pico de la isoforma a de 1.07% comparado con una formulación de gel de IPA preparada con tampón de citrato pH 4.00 que tiene un porcentaje de pureza pico de la isoforma a de 4.92%. Estos datos resaltan el aumento de la estabilidad de I3A b en formulaciones de gel de IPA preparadas con tampones de citrato de pH inferior.

20

Tabla 42. Comparación del porcentaje de pureza pico de I3Aa a T=0 y T=12 meses

pH del Tampón de citrato (± 0.05)	pH aparente de gel de placebo (T=12 meses)	Porcentaje de pureza pico (medio ±SD, n=3)	
		Porcentaje de pureza pico de la isoforma a T=0	Porcentaje de pureza pico de I3Aa T=12 meses
2.50	2.97	0.44 ± 0.03	0.64 ± 0.22
2.75	3.19	0.24 ± 0.06	1.07 ± 0.16
3.00	3.57	0.52 ± 0.01	1.26 ± 0.24
3.50	4.23	0.47 ± 0.02	2.09 ± 0.17
4.00	4.75	0.44 ± 0.03	4.92 ± 0.05

T=0 datos analizados por el método de HPLC 1 y T=12 meses datos analizados por el método de HPLC 2

25

Los datos de la Tabla 42 muestran que hay un aumento en el porcentaje de pureza pico de la isoforma a en todas las formulaciones de gel de IPA activas después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C. Sin embargo, la formulación de gel de IPA preparada con tampón de citrato pH 2.50 mostró sólo un ligero aumento en el porcentaje de pureza pico de la isoforma a (0.22 %) en comparación con, por ejemplo, la formulación de gel de IPA preparada con tampón de citrato pH 4.00 que mostró el mayor aumento en el porcentaje de la pureza pico de la isoforma a (4.48 %). Una vez más, estos resultados resaltan el aumento de la estabilidad del I3A b en formulaciones de gel de IPA preparados con tampones de citrato de pH inferior. Como tal, la formulación del gel de IPA preparada con el tampón de citrato de pH más bajo parece permanecer dentro de la especificación (<1% isoforma a) por 12 meses a 2-8°C.

30

Así, después de 12 meses de almacenamiento a 2-8°C, las formulaciones del gel de IPA que proporcionaron las mejor estabilidad para I3Ab fueron aquellas que se prepararon con tampones de citrato de pH inferior (pH=2.5-3.0).

5 **EJEMPLO 9**

Estabilidad del i3a 'b' en soluciones premezcla de gel de pH y temperatura variable

10 Métodos

Preparación de soluciones premezcla de gel

Las soluciones premezcla de gel se prepararon de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- 15 1. Pesar el tampón de citrato directamente en una botella Duran limpia seca.
2. Pesar IPA directamente en una botella Duran de la Etapa 1.
3. Pesar la cantidad correcta de I3A 'b' en una botella de muestra limpia seca.
- 20 4. Pesar la cantidad correcta de alcohol bencílico en la botella de muestra de la Etapa 3.
5. Colocar la botella de muestra de la Etapa 4 en un agitador orbital y agitar a 400 rpm hasta que se disuelva todo el I3A 'b'.
- 25 6. Adicionar la solución de I3A 'b'/alcohol bencílico de la Etapa 5 a la botella Duran de la Etapa 2.
7. Mezclar aún la mezcla hasta obtener una solución homogénea.

30 Las composiciones de las soluciones premezcla de gel a preparar y colocar en estabilidad son:

Tabla 43 Solución premezcla de gel 1

Componente	Concentración p/p	Cantidad a pesar (g)
Tampón de citrato pH 2.75	69.0	13.80
Isopropil alcohol	30.0	6.00
Alcohol bencílico	0.9	0.18
I3A 'b'	0.1	0.02

Tabla 44 Solución premezcla de gel 2

Componente	Concentración p/p	Cantidad a pesar (g)
Tampón de citrato pH 3.00	69.0	13.80
Isopropil alcohol	30.0	6.00
Alcohol bencílico	0.9	0.18
I3A 'b'	0.1	0.02

Tabla 45 Solución premezcla de gel 3

Componente	Concentración p/p	Cantidad a pesar (g)
Tampón de citrato pH 3.50	69.0	13.80
Isopropil alcohol	30.0	6.00
Alcohol bencílico	0.9	0.18
I3A 'b'	0.1	0.02

Tabla 46 Solución premezcla de gel 4

Componente	Concentración p/p	Cantidad a pesar (g)
Tampón de citrato pH 4.00	69.0	13.80
Isopropil alcohol	30.0	6.00
Alcohol bencílico	0.9	0.18
I3A 'b'	0.1	0.02

5

Tabla 47 Solución premezcla de gel 5

Componente	Concentración p/p	Cantidad a pesar (g)
Tampón de citrato pH 2.75	69.09	69.09
Isopropil alcohol	30.00	30.00
Alcohol bencílico	0.90	0.90
I3A 'b'	0.01	0.01

Tabla 48 Solución premezcla de gel 6

Componente	Concentración p/p	Cantidad a pesar (g)
Tampón de citrato pH 3.00	69.09	69.09
Isopropil alcohol	30.00	30.00
Alcohol bencílico	0.90	0.90
I3A 'b'	0.01	0.01

10

Tabla 49 Solución premezcla de gel 7

Componente	Concentración p/p	Cantidad a pesar (g)
Tampón de citrato pH 3.50	69.09	69.09
Isopropil alcohol	30.00	30.00
Alcohol bencílico	0.90	0.90
I3A 'b'	0.01	0.01

Tabla 50 Solución premezcla de gel 8

Componente	Concentración p/p	Cantidad a pesar (g)
Tampón de citrato pH 4.00	69.09	69.09
Isopropil alcohol	30.00	30.00
Alcohol bencílico	0.90	0.90
I3A 'b'	0.01	0.01

Prueba de estabilidad de las formulaciones premezcla de gel

15

Las soluciones premezcla de gel preparadas anteriormente se colocaron en estabilidad a 2-8, 25 y 40°C y se probaron en los puntos de tiempo T=0 y 2 semanas. En cada punto de tiempo las soluciones premezclas se evaluaron para el contenido I3A 'b' según el procedimiento detallado más abajo.

20

1.1.3 Prueba de estabilidad de las formulaciones premezcla de gel

Las soluciones premezcla de gel preparadas se colocaron en estabilidad a 2-8, 25 y 40°C y se probaron en los puntos de tiempo T=0 y 2 semanas. En cada punto de tiempo las soluciones premezclas se evaluaron para el contenido de I3A 'b' mediante el cálculo del porcentaje de área pico por HPLC del I3A 'b' con relación a las áreas picos de las isoforma 'a' e isoforma 'c' de sustancias relacionadas con I3A 'b' como se describe más abajo.

Instrumentación y Metodología HPLC

Todas las muestras que se analizarán para I3A 'b' se analizaron usando el Método HPLC 2. La instrumentación y condiciones cromatográficas para el Método HPLC 2 son como siguen:

Instrumentación:

Automuestreador Waters Alliance 2695 Separations Module plus
 Detector Waters 996 PDA
 Software Empower, versión 2.00

Condiciones cromatográficas:

Columna: Symmetry C₁₈ - 5 µm (Waters)
 Longitud de la columna: 150 x 3.90 mm
 Temperatura de la columna: 30 °C ±2 °C
 Precolumna: Symmetry C₁₈- 5 µm (Waters) (PN: WAT054225)
 Longitud de la precolumna: 20 x 3.90 mm
 Fase móvil: 0.02%v/v TFA en agua (A); 0.02%v/v TFA en acetonitrilo (B)
 A:B, 50:50 (composición de partida) (Gradiente, ver Tabla 51 más abajo)
 Régimen de flujo: 1.0 ml/min
 Temperatura del automuestreador: 8 °C ± 2 °C
 Longitud de onda UV: 230 nm
 Volumen de inyección: 10/40 µl
 Tiempo de ejecución: 20 minutos

Tabla 51 Gradiente Tabla para el Método HPLC 2

Etapas	TIEMPO	Flujo	%A	%B	Curva
1		1.00	50.0	50.0	
2	2.00	1.00	50.0	50.0	6
3	5.00	1.00	40.0	60.0	6
4	12.00	1.00	20.0	80.0	6
5	16.00	1.00	20.0	80.0	6
6	16.50	1.00	50.0	50.0	6
7	20.00	1.00	50.0	50.0	6

Los datos de estabilidad para I3A 'b' en soluciones premezcla de gel en intervalo de pH 2.75 a 4.00 a 2-8, 25 y 40 °C (media, n=3)

ES 2 461 315 T3

Premezcla de gel #	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo (semanas)	% pureza pico de I3A 'b' con relación a I3A 'b', isoforma 'a' e isoforma 'c'	% pureza pico de la isoforma 'a' con relación a I3A 'b', isoforma 'c' e isoforma 'a'	% pureza pico de la isoforma 'c' con relación a isoforma 'a', isoforma 'c' e I3A 'b'
1	N/a	0	98.98	1.02	0.00
2	N/a	0	98.96	1.04	0.00
3	N/a	0	98.97	1.03	0.00
4	N/a	0	98.91	1.09	0.00
5	N/a	0	99.09	0.91	0.00
6	n/a	0	98.99	1.01	0.00
7	n/a	0	98.99	1.01	0.00
8	n/a	0	99.00	1.00	0.00
1	2-8	2	98.77	1.23	0.00
2	2-8	2	98.65	1.35	0.00
3	2-8	2	98.61	1.39	0.00
4	2-8	2	98.50	1.50	0.00
5	2-8	2	98.80	1.20	0.00
6	2-8	2	98.57	1.43	0.00
7	2-8	2	98.44	1.56	0.00
8	2-8	2	98.03	1.97	0.00
1	25	2	98.69	1.31	0.00
2	25	2	98.51	1.49	0.00
3	25	2	98.19	1.81	0.00
4	25	2	97.42	2.58	0.00
5	25	2	98.78	1.22	0.00
6	25	2	98.55	1.45	0.00
7	25	2	98.39	1.61	0.00
8	25	2	97.71	2.29	0.00
1	40	2	97.77	2.23	0.00
2	40	2	96.99	3.01	0.00
3	40	2	96.48	3.52	0.00
4	40	2	96.02	3.98	0.00
5	40	2	98.09	1.91	0.00
6	40	2	97.93	2.07	0.00
7	40	2	97.23	2.77	0.00
8	40	2	96.43	3.57	0.00

Conclusiones:

El almacenamiento de todas las soluciones premezcla de gel a 2-8 °C proporciona la mejor estabilidad para I3A 'b', basado en el porcentaje superior de la pureza pico por HPLC obtenido para I3A 'b' en comparación con el almacenamiento de las soluciones premezcla de gel a 25 y 40 °C.

5

Las dos soluciones premezcla de gel que proporcionan la mejor estabilidad para I3A 'b', basado en el porcentaje de la pureza pico por HPLC, fueron los números 1 y 5. Estas soluciones premezcla contuvieron el tampón de citrato al pH más bajo usado en el estudio (pH=2.75).

10

Las dos soluciones premezcla de gel que proporcionan la menor estabilidad para I3A 'b', basado en el porcentaje de la pureza pico por HPLC, fueron los números 4 y 8. Estas soluciones premezclas contienen el tampón de citrato en el pH más alto usado en el estudio (pH = 4.00).

15

La reducción de la temperatura y el pH del tampón de citrato en las soluciones premezcla de gel proporcionaron la mejor estabilidad para I3A 'b' donde el porcentaje de la pureza pico por HPLC de I3A 'b' se usó como un indicador de la estabilidad en este estudio.

REFERENCIAS:

20

Ho VC, Griffiths CEM, Ellis CN, Gupta AK, McCuaig CC, Nickoloff BJ, Cooper KD, Hamilton TA y Voorhees JJ. *J Am Acad Dermatol* 22:94-100, 1990.

Ford JL. Parenteral products In: *Pharmaceutics, The Science of dosage form design* (Ed ME Aulton), Churchill Livingstone, London, 1988.

25

Wade A y Weller PJ. *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 2a Edición. American Pharmaceutical Association, Washington, 1994.

30

Barichello JM, Morishita M, Takayama K y Nagai T, Absorption of insulin from pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int J Pharm* 184:189-198, 1999.

Tobiyama T, Miyazaki S, y Takada M, Use of pluronic F-127 gels as a vehicle for percutaneous absorption. *Yakuzaigaku* 54:205-213, 1994.

35

Morikawa K y otros, Enhancement of therapeutic effects of recombinant interleukin-2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release vehicle, Pluronic gel. *Cancer* 47:37-41, 1987

Katakama M y otros, Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamer gels. *J Control Rel* 49:21-26, 1997.

40

Wasan KM, Subramanian R, Kwong M, Goldberg IJ, Wright T y Johnston TP, Poloxamer 407 mediated alterations in the activities of enzymes regulating lipid metabolism in rats. *J. Pharm Sci.* 6 189-197, 2003.

45

Powell MF, Nguyen T y Baloian L. *Compendium of Excipients for Parenteral Formulations.* *PDA J Pharm Sci Tech* 52:238-311, 1998.

Schmolka IR, Artificial skin I. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for the treatment of burns. *J. Biomed. Mater. Res.*, 6, 571-582, 1972.

REIVINDICACIONES

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
1. Una formulación de ingenol angelato para usar en terapia, en donde el ingenol angelato se disuelve en un solvente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol, metil etil cetona, acetato de etilo, éter dietílico, alcohol bencílico, y mezclas de estos, dicha formulación comprende además un agente acidificante farmacéuticamente aceptable que es al menos parcialmente compatible con el solvente y el cual proporciona la formulación con un pH aparente de no más de 4.5 y no menos de 2.5.
 2. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente acidificante se añade subsecuente a la preparación de una solución de ingenol angelato en el solvente.
 3. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el ingenol angelato es ingenol 3-angelato.
 4. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el ingenol angelato presente en la formulación es al menos 99% de ingenol 3-angelato.
 5. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la cantidad de ingenol 3-angelato es al menos 99.5%.
 6. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el solvente consiste prácticamente de alcohol bencílico.
 7. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el agente acidificante es un ácido.
 8. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el agente acidificante es un ácido orgánico.
 9. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el agente acidificante es un tampón ácido.
 10. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el tampón es seleccionado del grupo que consiste de un tampón de citrato, tampón de fosfato, tampón de acetato, y tampón de citrato-fosfato.
 11. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el tampón es tampón de citrato.
 12. Una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde el pH del tampón, antes de la adición a la formulación, está entre pH 2.5 y pH 4, inclusive.
 13. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el pH del tampón está entre pH 2.7 y pH 3.5, inclusive.
 14. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el pH del tampón está entre pH 2.7 y pH 3.0 inclusive.
 15. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que tiene un pH aparente de entre pH 3 y pH 4.
 16. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 15, que tiene un pH aparente de 3.5.
 17. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que consiste en ingenol angelato, alcohol bencílico y pH 2.5 tampón de citrato, en donde el tampón está presente en una cantidad de entre 0.5 y 10% p/p de la formulación.
 18. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que además comprende un antioxidante.
 19. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el antioxidante es seleccionado del grupo que consiste de retinol, ácido ascórbico, licopeno, tocoferol, hidroxitolueno butilado, y mezclas de estos.
 20. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde el solvente y el agente acidificante son capaces de formar una sola fase.

21. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que además comprende un conservante seleccionado de: un parabén, ácido benzoico, alcohol bencílico, y mezclas de estos.
- 5 22. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que además comprende un potenciador de penetración.
- 10 23. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 22, en donde dicho potenciador de penetración es seleccionado del grupo que consiste de alcohol isopropílico, un sulfóxido, una azona, una pirrolidona, un alcanol, un glicol, un ácido graso, agua, un surfactante, un terpeno, un fosfolípido, y mezclas de estos.
24. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, que además comprende un mucoadhesivo.
- 15 25. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en forma de una preparación adecuada para administración tópica.
26. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 25, que comprende una mayor parte de un tampón ácido por peso.
- 20 27. Una preparación de acuerdo con la reivindicación 25 o 26, que además comprende un gelificante.
28. Una preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en forma de un gel, crema, ungüento o pintura.
- 25 29. Una preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ingenol angelato es al menos 99% ingenol 3-angelato y en donde no más de 1% de reordenamiento a la isoforma 'a' tiene lugar después de 3 meses.
- 30 30. Una preparación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ingenol angelato es al menos 99% ingenol 3-angelato y en donde no más de 0.5% de reordenamiento a la isoforma 'a' tiene lugar después de 3 meses.
31. Una formulación de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para usar en el tratamiento de un cáncer de piel.
- 35 32. Uso de ingenol angelato en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un cáncer de piel, en donde el ingenol angelato se disuelve en un solvente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol, metil etil cetona, acetato de etilo, éter dietílico, alcohol bencílico, y mezclas de estos, dicha formulación comprende además un agente acidificante farmacéuticamente aceptable que es al menos parcialmente compatible con el solvente y el cual proporciona la formulación con un pH aparente de no más de 4.5 y no menos de 2.5.
- 40 33. Uso de acuerdo con la reivindicación 32, en donde la formulación es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29.
- 45 34. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 32 y 33, en donde el cáncer de piel es un cáncer de células escamosas o basales.
- 50 35. Un proceso para preparar una formulación de ingenol angelato, que comprende disolver el ingenol angelato en un solvente farmacéuticamente aceptable seleccionado del grupo que consiste de polietilenglicol, metil etil cetona, acetato de etilo, éter dietílico, alcohol bencílico, y mezclas de estos, dicho proceso comprende la adición de un agente acidificante farmacéuticamente aceptable que es al menos parcialmente compatible con el solvente y el cual proporciona la formulación con un pH aparente de no más de 4.5 y no menos de 2.5, dicho agente acidificante se adiciona con, antes, o después del ingenol angelato.
- 55 36. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 35, en donde la formulación es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 28.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
37. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 35 o 36, en donde el ingenol angelato es sustancialmente ingenol 3-angelato, y la adición del agente acidificante y las condiciones se seleccionan de manera de evitar que más de 1% del ingenol 3-angelato se reordene en la isoforma 'a'.
 38. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en donde el ingenol angelato es sustancialmente ingenol 3-angelato, y la adición del agente acidificante y las condiciones se seleccionan de manera de evitar que más de 0.5% del ingenol 3-angelato se reordene en la isoforma 'a'.
 39. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, en donde el agente acidificante confiere un pH aparente de entre pH 3 y pH 3.5 en la formulación.
 40. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 39, en donde el agente acidificante se añade en una cantidad de entre 0.5 y 10% p/p de la formulación.
 41. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 35 a 40, en donde la formulación se elabora solamente con componentes definidos, antes de la adición de cualquier otro componente deseado.
 42. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 41 en donde un componente deseado adicional está en exceso del tampón ácido.
 43. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 41 o 42, en donde un componente deseado adicional es polietilenglicol.
 44. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, en donde un componente deseado adicional es un gelificante.
 45. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 41 a 44, en donde la formulación se almacena subsecuentemente a una temperatura de entre la congelación y 8 °C.

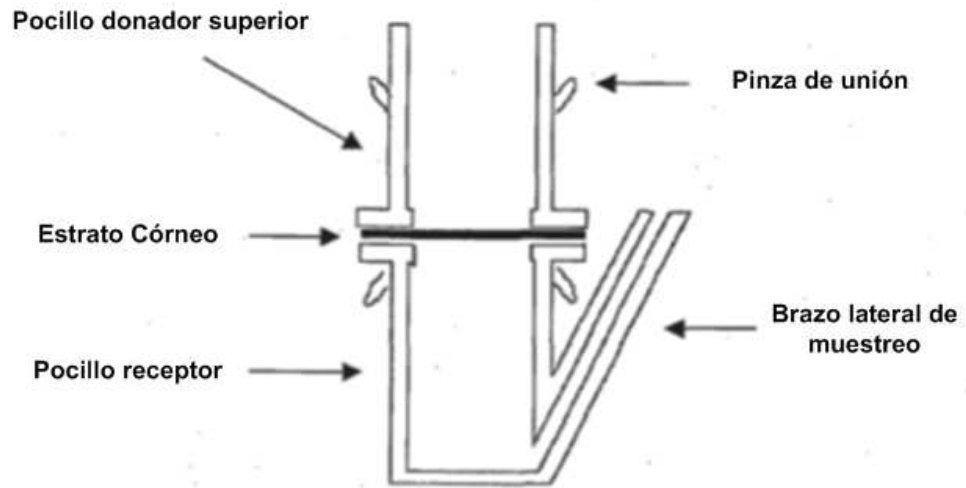


Figura 1

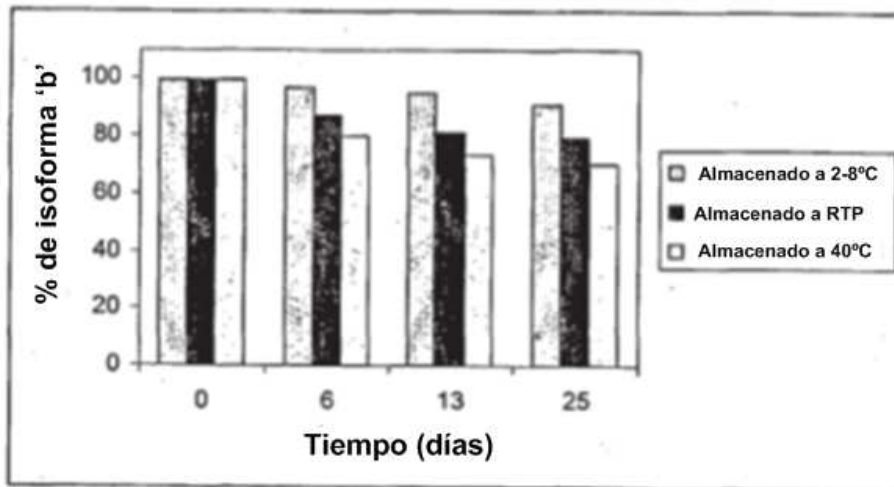


Figura 2

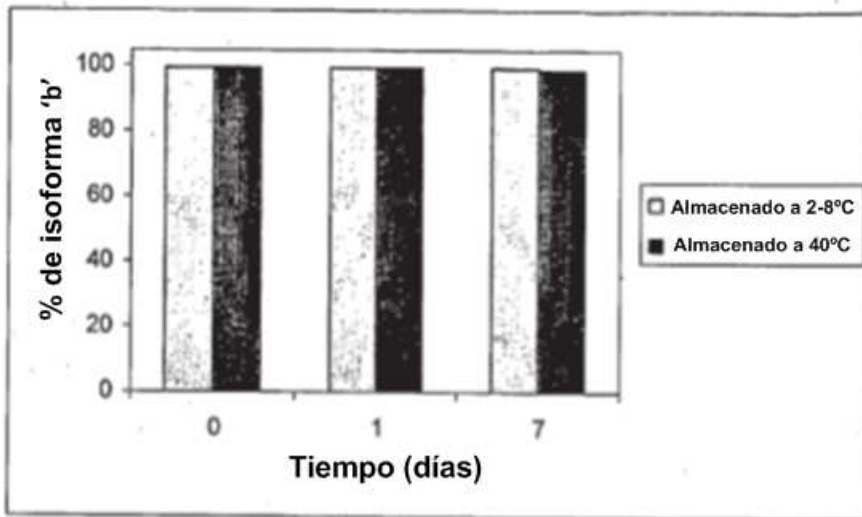


Figura 3

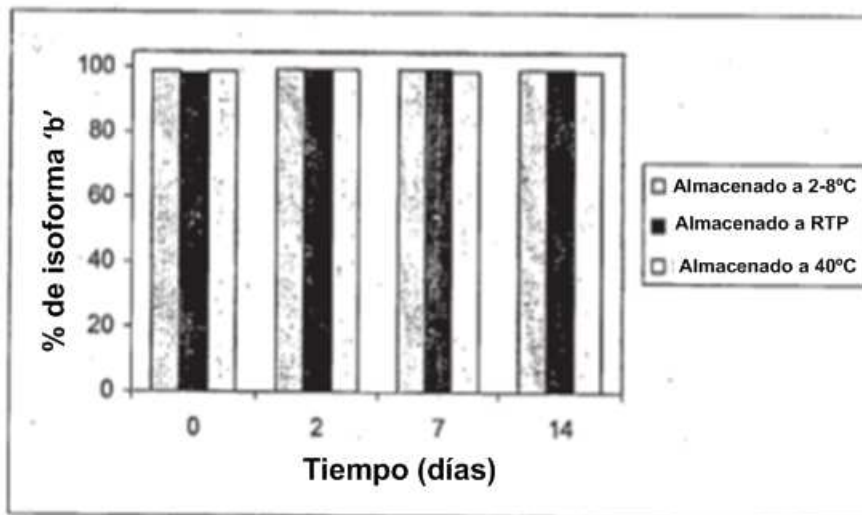


Figura 4

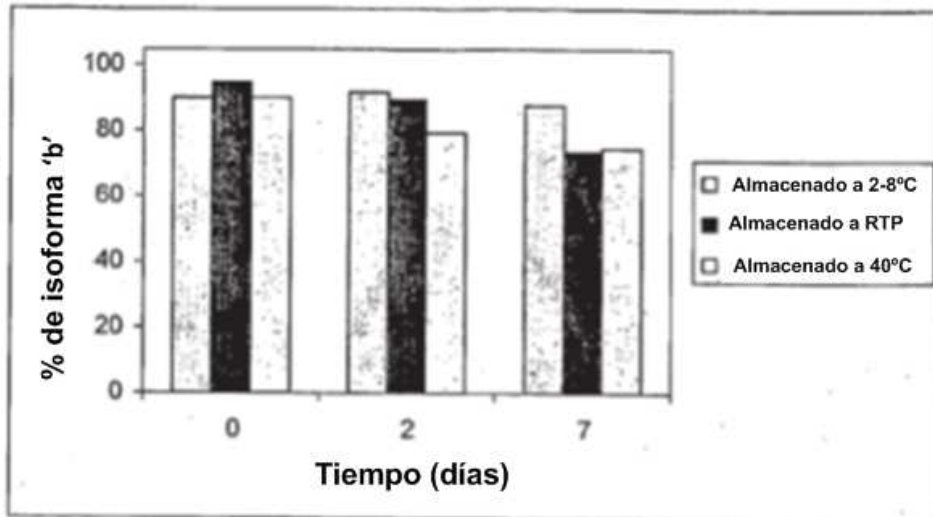


Figura 5

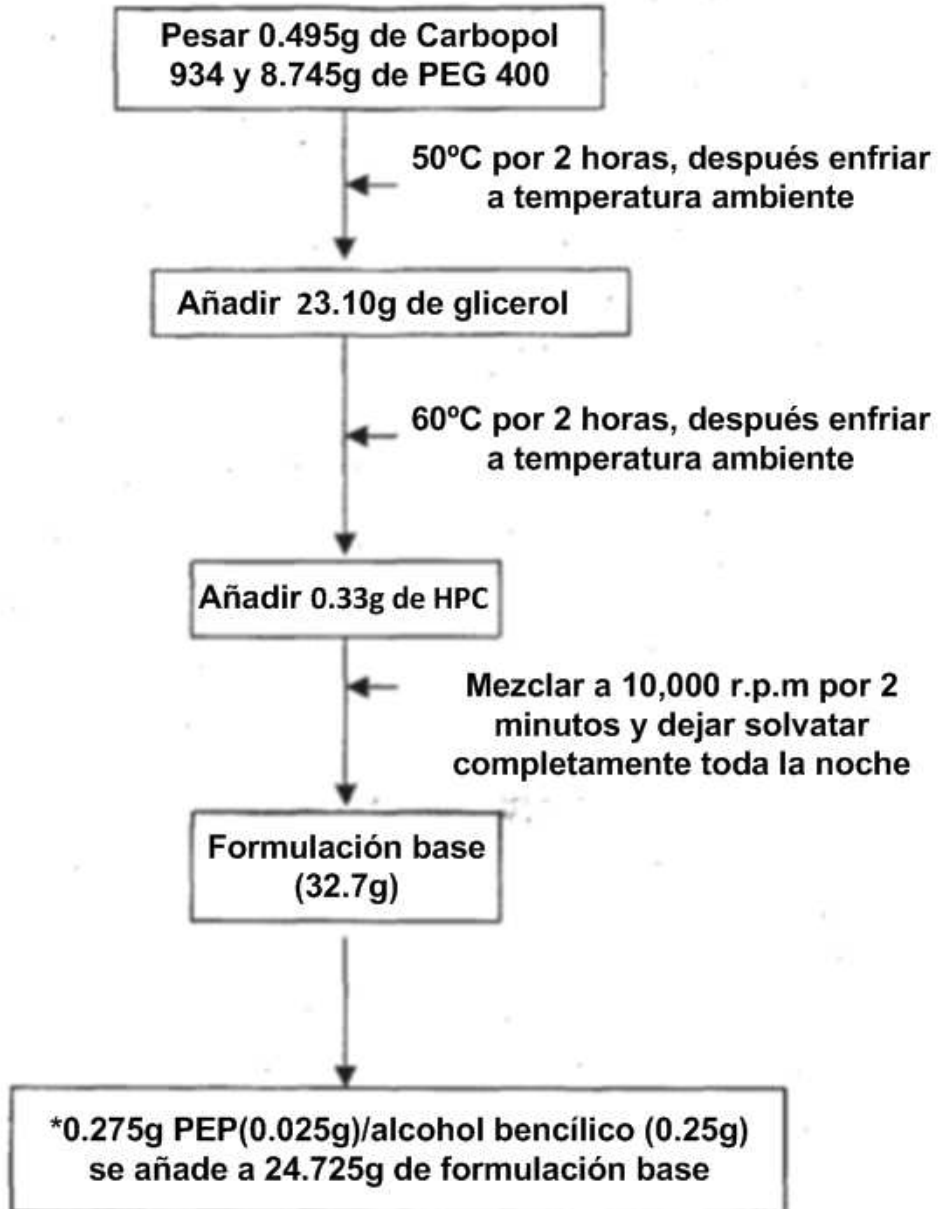


Figura 6

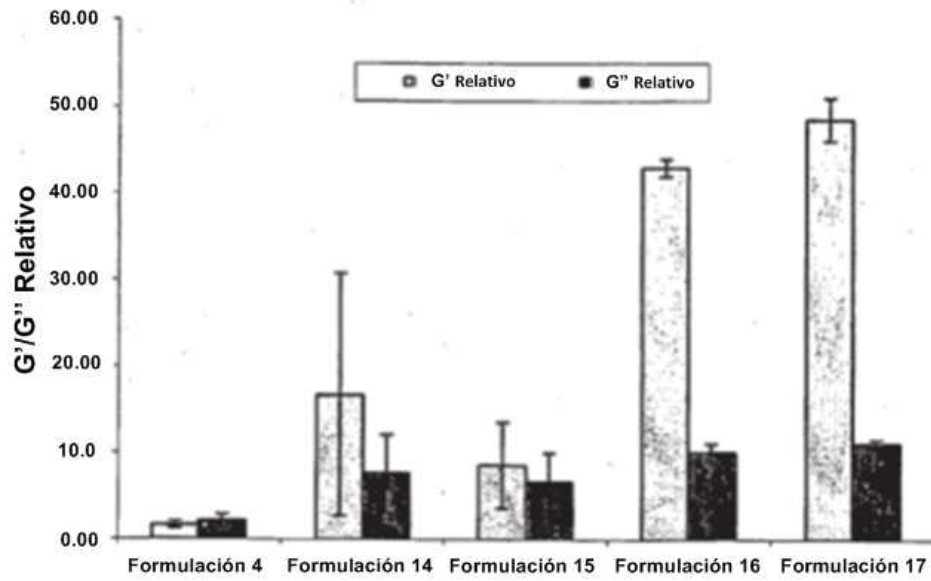


Figura 7

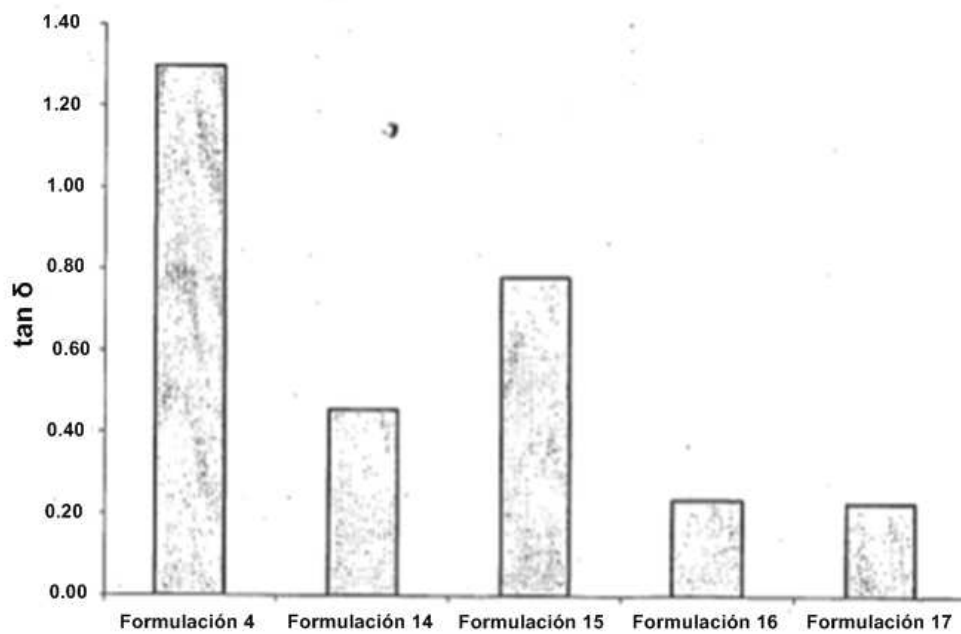


Figura 8

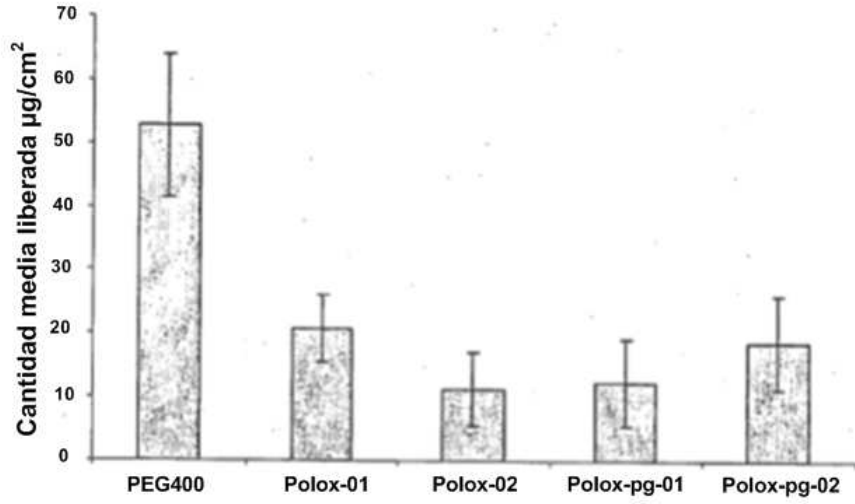


Figura 9

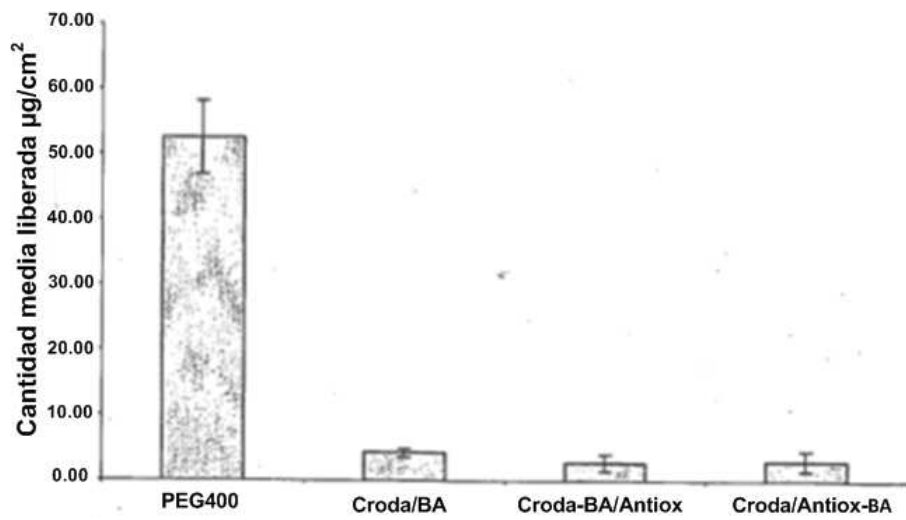


Figura 10