

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 177**

51 Int. Cl.:

A61K 47/34 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.01.2006 E 06719601 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 1845787**

54 Título: **Formulaciones para la inyección de butanos catecólicos, incluyendo compuestos de NDGA, en animales**

30 Prioridad:

27.01.2005 US 647495 P

27.01.2005 US 647648 P

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

21.05.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 536 177 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones para la inyección de butanos catecólicos, incluyendo compuestos de NDGA, en animales.

Antecedentes de la invención

5 Esta solicitud se refiere a composiciones, incluyendo formulaciones inyectables y métodos para la administración de tetra-O-metil-NDGA, a animales, tales como seres humanos, para el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, cáncer, psoriasis u otras enfermedades proliferativas o inflamatorias, enfermedades metabólicas tales como diabetes o enfermedades neuronales incluyendo enfermedades neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad de Parkinson.

10 El ácido nordihidroguayarático ("NDGA") se ha sometido a prueba para determinar sus aplicaciones terapéuticas en determinados animales de experimentación. Por ejemplo, Jordan *et al.* en el documento US 5.008.294 describieron el efecto de NDGA sobre carcinoma de mama humano, MX-1, que se implantó por vía subcutánea en ratones en el día 0 (ejemplo 2). A los ratones que desarrollaron tumores se les inyectaron diversas dosis de NDGA en el día 1, en una inyección intratumoral individual. No se dio a conocer el disolvente de solubilización para el NDGA en este ejemplo. En otro ejemplo, se usó una disolución madre de NDGA 10^{-2} M en 4 ml de DMSO (es decir, dimetilsulfóxido) y 6 ml de agua destilada para pruebas *in vitro* en células (ejemplo 5).

15 Huang *et al.* sometieron a prueba la aplicación terapéutica de determinados derivados de NDGA (es decir, "derivados de NDGA"), tal como se describe en el documento US 6.214.874. En un ejemplo, se disolvió un derivado de NDGA en DMSO (ejemplo 5).

20 El uso de DMSO para la administración a seres humanos ha sido controvertido. Además, el uso de DMSO se ha asociado con efectos secundarios no deseables tales como sedación, cefalea, náuseas, mareos, escozor o dolor ocular y mal aliento evidente. (Véase, por ejemplo, Brobyn, R.D., "The human toxicology of dimethyl sulfoxide", Ann. N.Y. Acad. Sci. 243: 497-506, 27 de enero de 1975). Si los butanos catecólicos, incluyendo NDGA o derivados de NDGA (de manera colectiva, "compuestos de NDGA") van a ser útiles como productos terapéuticos para seres humanos y otros animales, por ejemplo, tal como se describe en el documento PCT/US2004/016117, publicado el 29 de diciembre de 2004 como publicación internacional n.º WO 04/112696, sería altamente deseable desarrollar nuevas formulaciones, distintas de las formulaciones que contiene DMSO, para solubilizar tales butanos catecólicos, incluyendo los compuestos de NDGA tales como derivados de NDGA, por ejemplo, M₄N.

25 El documento WO 99/17761 A1 da a conocer formulaciones para la inyección que comprenden ácido nordihidroguayarático (NDGA) y un vehículo anfífilo, en las que el vehículo anfífilo es una mezcla de glicéridos poliglicolizados saturados.

30 El documento WO 2004/112695 A2 da a conocer composiciones para la administración intravenosa y el tratamiento de obesidad que comprenden butano catecólico con un portador seleccionado de aceites tales como aceite de maíz.

El documento WO 88/01509 A1 da a conocer una disolución de NDGA en polietilenglicol 400 que se inyectó por vía intraperitoneal en ratones desnudos.

35 Además, sería deseable si tales formulaciones no son sólo seguras sino también estables, tienen efectos secundarios mínimos tras la administración a animales. Además sería deseable desarrollar formulaciones para estos compuestos que permitan la distribución de una cantidad eficaz de estos compuestos a los tejidos diana deseados *in vivo* en seres humanos y otros animales. La presente invención proporciona estos beneficios deseables.

Breve resumen de la invención

40 Por tanto, uno de los objetos de la presente invención es proporcionar una o más formulaciones novedosas para la solubilización de tetra-O-metil-NDGA en el presente documento, en las que tales formulaciones no contienen DMSO y son adecuadas para la inyección en animales.

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

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

Uno de los objetos adicionales es proporcionar formulaciones tales como una o más de las anteriores que pueden administrarse por vía parenteral a animales.

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

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

Una composición para la inyección en animales que comprende un principio activo farmacéutico y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que el principio activo farmacéutico comprende tetra-O-metil-NDGA y el portador comprende propilenglicol, el propilenglicol está en ausencia de ácido ascórbico o hidroxitolueno butilado ("BHT"), y cuando el polietilenglicol es polietilenglicol 400, el polietilenglicol 400 está presente en ausencia de polietilenglicol 8000 y una ciclodextrina.

La presente invención también incluye un método de tratamiento de una enfermedad en un sujeto que comprende: (a) proporcionar la composición de la presente invención; y (b) administrar la composición inyectando la composición en el sujeto, en el que la composición comprende una cantidad eficaz del principio activo farmacéutico.

Adicionalmente, la presente invención incluye un kit que comprende la composición de la presente invención e instrucciones para el uso del mismo.

Breve descripción de los dibujos

El sumario anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se comprenderán mejor cuando se lean junto con los dibujos adjuntos. Con el fin de ilustrar la invención, en los dibujos se muestran realizaciones que se prefieren actualmente. Debe entenderse, sin embargo, que la invención no se limita a las realizaciones mostradas.

En los dibujos:

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

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

La figura 3 comprende las figuras 3A y 3B y es una representación gráfica del efecto de la concentración en suero de perro a lo largo del tiempo durante el día 1 tras una administración por vía i.v. a perros de M₄N en una formulación que incluía hidroxipropil-β-ciclodextrina ("HP-β-CD") al 30% (p/v) y PEG 300 al 25% (v/v). La figura 3A usa una escala no logarítmica, y la figura 3B usa una escala logarítmica de concentración.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención proporciona composiciones novedosas, kits y métodos para el tratamiento de enfermedades, incluyendo enfermedades proliferativas tales como cáncer y psoriasis, hipertensión, obesidad, diabetes de tipo I o tipo II, enfermedades del sistema nervioso central o enfermedades neurodegenerativas incluyendo, sin limitación, dolor, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, demencia, accidente cerebrovascular y enfermedad inflamatoria, neoplasia premaligna o displasia, infección incluyendo infecciones virales tales como virus de la inmunodeficiencia humana ("VIH"), virus linfotrópico de células T humanas ("VLTH"), virus del papiloma humano ("VPH"), virus de herpes simple ("VHS"), virus de la hepatitis B ("VHB"), virus de Epstein-Barr ("VEB"), varicela-zóster, adenovirus, parvovirus, virus de Jakob Creutzfeldt ("virus JC") u otros.

La presente invención proporciona composiciones novedosas que contienen los butanos catecólicos incluyendo compuestos de NDGA, tales como derivados de NDGA, por ejemplo M₄N, que se disuelven en determinados agentes de solubilización farmacéuticamente aceptables, que junto con otros diluyentes, excipientes y similares (de manera colectiva, "portador") constituyen formulaciones apropiadas para la inyección en sujetos, tales como seres humanos, para el tratamiento de enfermedades. Tales formulaciones son adecuadas para la inyección, tal como administración intravenosa. Un portador farmacéuticamente aceptable adecuado incluye el disolvente orgánico soluble en agua polietilenglicol ("PEG"), por ejemplo, PEG 300, PEG 400 o monolaurato de PEG 400 y ciclodextrina o ciclodextrina modificada tal como hidroxipropil-β-ciclodextrina ("HP-β-CD") o sulfobutil éter-β-ciclodextrina ("SBE-β-CD"). Cuando se usa PEG, se usa en ausencia de ácido ascórbico o BHT.

En una realización de la invención, los compuestos en el presente documento se disuelven en PEG 300, PEG 400 o un monolaurato de PEG 400 (los "compuestos de PEG"). Preferiblemente, cuando se usa PEG 400, está presente en ausencia de PEG 8000. En otra realización, los compuestos en el presente documento se disuelven en una ciclodextrina modificada, tal como HP-β-CD. Aún en otra realización, los presentes compuestos se solubilizan y se diluyen en una formulación de combinación que contiene uno o más de los compuestos de PEG y HP-β-CD. Para los

finen en el presente documento, la solubilización de los presentes compuestos puede realizarse a temperatura ambiente o tras calentamiento. Son particularmente útiles los solubilizantes que mantienen los presentes compuestos en disolución tras enfriarlos cuando se aplica calor en el procedimiento de solubilización.

5 Además, la presente invención incluye materiales adecuados para la inyección o infusión de la composición a un animal, tales como tubos intravenosos ("i.v."), que son compatibles para la administración de las presentes formulaciones. Los tubos adecuados incluyen los compuestos por polímeros tales como politetrafluoroetileno ("PTFE") solo o en combinación con un fluoroelastómero tal como CHEM-Sure (Barnant Company), polietileno, polipropileno, etileno-propileno fluorado ("FEP"), Teflon® y silicona curada con platino (de tamaño pequeño) (Cole-Parmer) y similares.

10 La presente invención puede entenderse más claramente a la luz de las siguientes definiciones, que se usan con otros términos tal como se definen en otra parte en el presente documento:

El término "principio activo farmacéutico", "API" o referencia a los "compuestos" tal como se usa en el presente documento significa cualquiera de los butanos catecólicos de fórmula tetra-O-metil-NDGA.

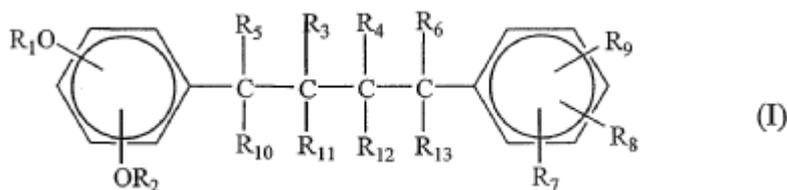
15 "Alquilen-dioxilo" tal como se usa en el presente documento se refiere un metilen- o metileno sustituido-dioxilo o etilen- o etileno sustituido-dioxilo.

20 "Residuo de aminoácido no sustituido o sustituido o sal del mismo" en referencia a uno de los grupos -R en la fórmula I o la fórmula II tal como se usa en el presente documento significa un residuo de aminoácido o un residuo de aminoácido sustituido incluyendo, pero sin limitarse a: alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina, 5-hidroxilisina, 4-hidroxiprolina, tiroxina, 3-metilhistidina, ε-N-metil-lisina, ε-N,N,N-trimetil-lisina, ácido aminoadípico, ácido γ-carboxiglutámico, fosfoserina, fosfotreonina, fosfotirosina, N-metilarginina, N-acetil-lisina, y un residuo de aminoácido sustituido con N,N-dimetilo, o una sal de cualquiera de los anteriores, tal como una sal de cloruro.

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

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

"Butano catecólico" tal como se usa en el presente documento significa un compuesto de fórmula I:



35 en la que R₁ y R₂ representan cada uno independientemente -H, un alquilo inferior, un acilo inferior, un alquileno; o -R₁O y -R₂O representan cada uno independientemente un residuo de aminoácido no sustituido o sustituido o sal del mismo; R₃, R₄, R₅, R₆, R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ representan cada uno independientemente -H o un alquilo inferior; y R₇, R₈ y R₉ representan cada uno independientemente -H, -OH, un alcóxilo inferior, un acilóxilo inferior, un residuo de aminoácido no sustituido o sustituido o una sal del mismo, o dos grupos adyacentes cualesquiera juntos pueden ser un alquilen-dioxilo.

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

45 Un "derivado" de NDGA tal como se usa en el presente documento significa un "derivado de NDGA" (véase a continuación).

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

10 “G₄N” o “tetra-N,N-dimetil-glicinil-NDGA” o “tetra-dimetil-glicinil-NDGA” tal como se usa en el presente documento es un derivado de NDGA de fórmula II (a continuación) en la que R₁₄, R₁₅, R₁₆ y R₁₇ representan cada uno independientemente

-O(C=O)CH₂N(CH₃)₂ o -O(C=O)CH₂N⁺(CH₃)₂·Cl⁻, o bien en forma sólida o bien en disolución; y R₁₈ y R₁₉ representan cada uno -CH₃.

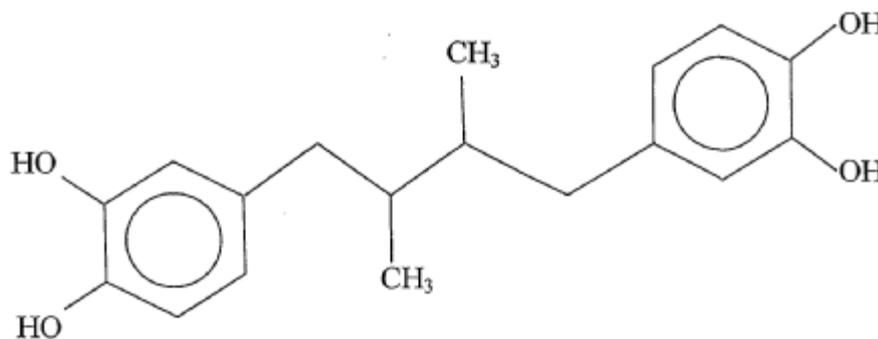
“Acilo inferior” tal como se usa en el presente documento significa acilo C₁-C₆, preferiblemente, acilo C₁-C₃.

15 “Alquilo inferior” tal como se usa en el presente documento significa alquilo C₁-C₆, preferiblemente, alquilo C₁-C₃.

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

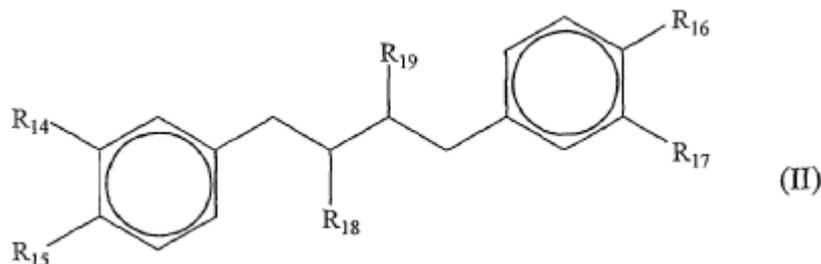
Una “celulosa modificada” tal como se usa en el presente documento significa una celulosa que contiene una o más modificaciones en la molécula de celulosa e incluye, por ejemplo EC, HPMC, CMC y MC.

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



“Compuesto de NDGA” tal como se usa en el presente documento significa individual o colectivamente NDGA y/o uno cualquiera o más de los derivados de NDGA.

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



30 en la que R₁₄, R₁₅, R₁₆ y R₁₇ representan cada uno independientemente -OH, un alcoxilo inferior, un aciloxilo inferior, o un residuo de aminoácido no sustituido o sustituido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y R₁₈ y R₁₉ representan cada uno independientemente -H o un alquilo inferior, en la que R₁₄, R₁₅, R₁₆ y R₁₇ no son simultáneamente -OH. Por tanto, el término incluye un compuesto que es un derivado metilado de NDGA, tal como tetra-O-metil-NDGA (M₄N), tri-O-metil-NDGA (M₃N), di-O-metil-NDGA (M₂N) y mono-O-metil-NDGA (M₁N). Alternativamente, un derivado de NDGA puede ser un compuesto en el que uno o más de los hidrógenos en los grupos hidroxilo o metilo de NDGA están sustituidos, tal como, por ejemplo en los que R₁₄, R₁₅, R₁₆ y R₁₇ representan cada uno independientemente un alcoxilo inferior, un aciloxilo inferior, o un aminoácido o aminoácido sustituido o sal del mismo; y R₁₈ y R₁₉ representan cada uno independientemente -H o un alquilo tal como un alquilo inferior. El término incluye, por ejemplo, un compuesto en el que R₁₄, R₁₅, R₁₆ y R₁₇ representan cada uno

independientemente $-OCH_3$ o $-O(C=O)CH_3$ o un residuo de aminoácido disustituido, tal como un residuo de aminoácido sustituido con N,N-dimetilo, tal como $-O(C=O)CH_2N(CH_3)_2$ o $-O(C=O)CH_2N^+(CH_3)_2 \cdot Cl^-$; y R_{18} y R_{19} representan cada uno -H o un alquilo inferior, por ejemplo, $-CH_3$ o $-CH_2CH_3$.

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

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

20 El término "excipiente farmacéuticamente aceptable", incluye vehículos, adyuvantes o diluyentes u otras sustancias auxiliares, tales como las convencionales en la técnica, que están fácilmente disponibles para el público, y que no son tóxicas para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, y son compatibles con otros componentes de la formulación. Por ejemplo, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables incluyen agentes tamponantes y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizadores, agentes humectantes y similares.

25 El término "agente de solubilización" tal como se usa en el presente documento significa una composición en la que se disuelve uno o más de los butanos catecólicos o compuestos de NDGA, tales como derivados de NDGA. Un agente de solubilización también puede ser un portador o un portador farmacéuticamente aceptable.

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

35 Un compuesto "sustancialmente purificado" en referencia a los butanos catecólicos o compuestos o derivados de NDGA para la administración en el presente documento es uno que está sustancialmente libre de materiales que no son el butano catecólico, compuestos de NDGA o derivados de NDGA (a continuación en el presente documento, "materiales que no son NDGA"). Por sustancialmente libre quiere decirse libre al menos aproximadamente al 50% de materiales que no son NDGA, preferiblemente libre al menos aproximadamente al 70%, más preferiblemente al menos aproximadamente al 80%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente al 90% y todavía más preferiblemente libre al menos aproximadamente al 95% de materiales que no son NDGA.

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

45 Antes de describir adicionalmente la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a realizaciones particulares descritas, ya que por supuesto estas pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento sólo es para el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa, puesto que el alcance de la presente invención sólo se limitará mediante las reivindicaciones adjuntas.

50 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, queda abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en

los intervalos más pequeños, y también quedan abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

5 Debe observarse que tal como se usa en el presente documento, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, referencia a “un compuesto” incluye una pluralidad de tales compuestos y referencia a “el compuesto de NDGA” incluye referencia a uno o más compuestos de NDGA, tales como derivados de NDGA, y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica.

10 Las publicaciones comentadas en el presente documento se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en el presente documento debe considerarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a tal publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario confirmar independientemente. Las citas a referencias mencionadas en el texto de esta solicitud se identifican más completamente en la bibliografía que precede a las reivindicaciones.

15 La invención descrita a continuación sólo se facilita a modo de ejemplo y no debe interpretarse de ninguna manera como que limita la invención.

Preparación de butanos catecólicos

20 Los butanos catecólicos de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, tales compuestos pueden prepararse tal como se describe en la patente estadounidense 5.008.294.

Preparación de los derivados de NDGA

El NDGA puede obtenerse de cualquier fuente comercial disponible, tal como, por ejemplo, Alexis Biochemicals Corp., San Diego, CA, EE.UU. (n.º de cat. LKT-N5669), o A.G. Scientific, Inc., San Diego, CA, EE.UU. (n.º de cat. N1071), o Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE.UU. (n.º de cat. 70300).

25 Los derivados de NDGA y las formulaciones de los mismos pueden prepararse mediante cualquier procedimiento convencional en la técnica. Por ejemplo, los derivados de NDGA puede prepararse tal como se describe en la patente estadounidense 5.008.294; la patente estadounidense 6.291.524; Hwu, J.R. *et al.* (1998); o McDonald, R. W. *et al.* (2001).

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

40 En algunas realizaciones de la presente invención, también pueden prepararse determinados derivados de NDGA de la presente invención, tales como G₄N, también conocido como meso-1,4-bis[3,4-(dimetilaminoacetoxi)fenil]-(2R,3S)-dimetilbutano o tetra-dimetilglicinil-NDGA, o una sal de clorhidrato de los mismos, y compuestos similares que tienen sustituyentes de aminoácido, según métodos convencionales, tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense 6.417.234.

Preparación de las composiciones terapéuticas

45 La presente invención proporciona composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden los butanos catecólicos, como principios activos farmacéuticos (“API”), y portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Normalmente, las composiciones de la presente invención contendrán desde menos del 0,1% (p/v) hasta el 99% (p/v) del principio activo farmacéutico o API, es decir, los butanos catecólicos, incluyendo los compuestos de NDGA y derivados de NDGA en el presente documento; opcionalmente, la presente invención contendrá del 2% (p/v) al 90% (p/v) del API.

55 La presente invención proporciona adicionalmente composiciones en las que los butanos catecólicos, por ejemplo M₄N, están presentes en concentraciones de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml, o de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o de aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml, o de aproximadamente 40 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, o de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml. En una realización,

- los compuestos de NDGA están presentes en las composiciones en el presente documento a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml o aproximadamente 200 mg/ml.
- Expresado alternativamente, otras realizaciones de la composición de la presente invención pueden contener de menos de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 200 mg o más del API, tal como aproximadamente 10 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 100 mg o aproximadamente 200 mg del API.
- El portador o excipiente farmacéuticamente aceptable puede contener uno o más agentes de solubilización en los que se disuelve el API. El portador o excipiente farmacéuticamente aceptable puede contener adicionalmente un diluyente.
- En una realización, la invención proporciona un agente de solubilización que contiene uno o más de un disolvente orgánico soluble en agua, distinto de DMSO. Entre los disolventes orgánicos solubles en agua preferidos están los compuestos de PEG tales como: PEG 300, PEG 400. El compuesto de PEG en las presentes composiciones se proporciona en una cantidad del 5% al 100%, o del 5% al 60%, o del 10% al 90%, o del 20% al 80%, o del 30% al 70%, o del 40% al 60%, siendo todas las concentraciones un porcentaje en volumen/volumen (v/v).
- La concentración de los compuestos de PEG en las presentes composiciones puede variar dependiendo de qué otros solubilizantes o diluyentes o excipientes están también presentes. Por ejemplo, el PEG 300 o PEG 400 de la presente invención pueden estar a una concentración del 5%, el 10%, el 12,5%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90% o el 95%, facilitándose todas de tales concentraciones como porcentaje en volumen/volumen (v/v).
- La presente invención también proporciona composiciones de compuestos de M₄N en una ciclodextrina, que incluye ciclodextrinas modificadas. Las ciclodextrinas en el presente documento pueden ser α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, y las ciclodextrinas modificadas pueden incluir HP- β -CD y SBE- β -CD, por ejemplo. En una realización, la presente composición contiene una ciclodextrina modificada en una concentración del 5% al 80%, o del 10% al 70%, o del 20% al 60%, o del 30% al 50%, facilitándose todas de tales concentraciones como porcentaje en peso/volumen (p/v).
- Aún en otra realización, las ciclodextrinas modificadas, tales como HP- β -CD, están presentes en las composiciones a una concentración del 12,5%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70% o el 75%, facilitándose todas de tales concentraciones como porcentaje en peso/volumen (p/v).
- Otro portador o excipiente farmacéuticamente aceptable que puede usarse solo o con otros en la composición de la presente invención es un tensioactivo iónico, no iónico o anfipático, tal como Cremophor® EL, polisorbatos, que son tensioactivos no iónicos, por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80, disponibles comercialmente como Tween® 20 o Tween® 80, TPGS, que es un tensioactivo anfipático, entre muchos otros. Los ejemplos adicionales de tensioactivos adecuados incluyen, sin limitación, monooleato de glicerol y un ácido graso esterificado, tal como los preparados normalmente mediante transesterificación de aceites vegetales, disponibles en varias variedades y calidades como Labrafil®, Labrasol® y Gelucire®, de Gattefosse Corp., Paramus, NJ, EE.UU. El tensioactivo puede estar presente en cualquier cantidad eficaz deseada, tal como a una concentración de aproximadamente el 1% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v), preferiblemente de aproximadamente el 9% (v/v) a aproximadamente el 80% (v/v), y más preferiblemente, de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 50% (v/v). Como ejemplos específicos, concentraciones preferidas de un tensioactivo no iónico son Tween® 20 a una concentración de aproximadamente el 9% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v) y Tween® 80 de aproximadamente el 33% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v). Todos los porcentajes del tensioactivo son porcentajes en volumen (v/v).
- Otro portador o excipiente farmacéuticamente aceptable que puede usarse solo o con otros en la composición de la presente invención es una celulosa modificada, tal como EC, HPMC, MC y CMC. La celulosa modificada puede estar presente en cualquier cantidad eficaz deseada, tal como una concentración de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 25%, o de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 7,5%, o de aproximadamente el 1,0% a aproximadamente el 5%. Como ejemplos específicos, EC puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 20%; HPMC puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 1%; MC puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 3%; y CMC puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 4%. Los porcentajes de celulosa modificada son en peso por volumen (p/v).

Otro portador o excipiente farmacéuticamente aceptable que puede usarse solo o con otros en la composición de la presente invención es un lípido insoluble en agua, tal como un aceite o emulsión de grasa mixta. Los ejemplos de aceites incluyen aceite de maíz, aceite de semilla de sésamo, aceite de menta, aceite de soja, aceite mineral y glicerol, por ejemplo. Están disponibles composiciones de emulsión de grasa mixtas, tales como emulsión Intralipid®, tal como se describió anteriormente.

Los portadores insolubles en agua pueden usarse en combinación con uno cualquiera o más de los portadores solubles en agua, tales como compuestos de PEG y los tensioactivos, tales como Tween® 20 o Tween® 80.

Los portadores de lípido insoluble en agua pueden estar presentes en cualquier cantidad eficaz deseada, tal como una concentración de aproximadamente el 10% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v), o de aproximadamente el 15% (v/v) a aproximadamente el 85% (v/v), o de aproximadamente el 25% (v/v) a aproximadamente el 75% (v/v). El aceite puede estar presente a una concentración de aproximadamente el 9% (v/v) a aproximadamente el 100% (v/v). Las emulsiones de grasa mixta pueden estar presentes a una concentración de aproximadamente el 10% (p/v) a aproximadamente el 30% (p/v); y preferiblemente de aproximadamente el 20% (p/v).

Pueden usarse combinaciones de los diversos componentes de portador con el API, tal como se indicó anteriormente. Un ejemplo no limitativo de una realización de este tipo que se prefiere actualmente es una composición de M₄N 10 mg/ml en el 25% (p/v) de PEG 300, el 30% (p/v) de HP-β-CD, siendo el resto del portador agua adecuada para la inyección en animales ("WFI", que designa una calidad reconocida de agua en la industria farmacéutica). En esta realización preferida, la HP-β-CD tiene de 6 a 8 grados de sustitución, pero otras sustituciones en otras realizaciones están bien dentro del alcance de esta invención, tal como se indicó anteriormente.

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

En otra realización, la invención proporciona un diluyente que es solución salina o agua que es adecuada para la inyección. En un aspecto de la invención, cuando la osmolaridad de la composición farmacéutica es alta, se usa agua adecuada para la inyección como diluyente.

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

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

Métodos terapéuticos

Las composiciones que contienen los butanos catecólicos encuentran uso como agentes terapéuticos o para el tratamiento en sujetos que necesitan tal tratamiento en cualquiera de varias enfermedades en las que pueden usarse tales butanos catecólicos.

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

Puede tratarse una variedad de huéspedes animales según los métodos objeto, incluyendo seres humanos y animales no humanos. Generalmente tales huéspedes son "mamíferos", usándose estos términos de manera amplia para describir organismos que están dentro de la clase *Mammalia*, incluyendo los órdenes carnívoro (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, cobayas y ratas), y otros mamíferos, incluyendo reses, cabras, caballos, ovejas, conejos, cerdos y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los huéspedes serán seres humanos. Los modelos animales son de interés para investigaciones experimentales,

tales como proporcionar un modelo para el tratamiento de enfermedad humana. Además, la presente invención también puede aplicarse a la atención veterinaria.

Formulaciones, dosificaciones y vías de administración

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

10 La dosis apropiada que va a administrarse depende del sujeto que va a tratarse, tal como la salud general del sujeto, la edad del sujeto, el estado de la enfermedad o la afección, el peso del sujeto, el tamaño del tumor, por ejemplo. Generalmente, pueden administrarse de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg o menos a un niño y pueden administrarse de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 gramos o menos a un adulto. Las dosificaciones típicas están dentro del intervalo amplio de aproximadamente 10 mg de principio activo farmacéutico por kg de peso del sujeto a aproximadamente 600 mg de principio activo farmacéutico por kg de peso del sujeto. El agente activo puede administrarse en una dosis individual o, más normalmente, dosis múltiples. Las dosificaciones preferidas para una gente dado pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica mediante una variedad de medios. Otras dosificaciones eficaces pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la técnica a través de ensayos de rutina estableciendo curvas de dosis-respuesta. La cantidad de agente variará, por supuesto, dependiendo del agente particular usado.

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

25 En formas de dosificación farmacéuticas, los agentes activos pueden administrarse solos o en asociación apropiada, así como en combinación, con otros agentes terapéuticos o agentes farmacéuticamente activos incluyendo otras moléculas pequeñas, anticuerpos o agentes terapéuticos proteicos. Los siguientes métodos y excipientes son simplemente a modo de ejemplo y de ninguna manera son limitativos.

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

35 Las formas de dosificación unitarias para la inyección o administración intravenosa pueden comprender el API en una composición como una disolución en agua estéril, solución salina normal u otro portador farmacéuticamente aceptable.

40 El término "forma de dosificación unitaria", tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de API de la presente invención calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria novedosas de la presente invención dependen del compuesto particular empleado y del efecto que va a lograrse, y la farmacodinamia asociada con cada compuesto en el huésped.

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

50 Las presentes composiciones inyectables pueden administrarse por vía parenteral, incluyendo por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea y por vía intravesicular, según sea apropiado para la enfermedad que va a tratarse y según sea convencional en la técnica. Aunque se pretende que las composiciones de la presente invención se administren mediante inyección, también puede ser adecuado que se administren por otras vías, por ejemplo mediante administración tópica, intranasal, por inhalación o implantación.

55 Los ejemplos expuestos a continuación son a modo de ejemplo y no debe interpretarse que limitan la presente invención.

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

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

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

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

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

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

Se prepararon 100 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 25 mg/ml en PEG 300 tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 100 ml de PEG 300 a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra agitadora. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra agitadora para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 2,5 g de M₄N lentamente al PEG 300 en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/PEG 300 durante 24 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin grumos presentes. Opcionalmente se calentó la mezcla de M₄N/PEG 300 a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/PEG 300), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla o disolución de M₄N/PEG 300 para determinar la presencia de cualquier cantidad de M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco

- seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de material particulado. Tras observarse que se había disuelto todo el M₄N, se usó la disolución de M₄N/PEG 300 resultante inmediatamente o antes de que pasaran 48 h, de lo contrario pueden formarse cristales u otros precipitados. Si se formaron cristales, podía calentarse la disolución de M₄N /PEG 300 de nuevo a 60°C durante aproximadamente 1 h, con agitación, sobre una placa magnética caliente hasta que todo el M₄N se disolvió de nuevo en la disolución. Se almacenó la disolución de M₄N/PEG 300 final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros PEG, tal como, por ejemplo, sustituyendo PEG 300 en el procedimiento descrito anteriormente por PEG 400 o monolaurato de PEG 400.
- Se prepararon 100 ml de una disolución madre de una formulación que contenía PEG 300 al 50% (v/v), HP-β-CD al 20% (p/v) y 12,5 mg de M₄N añadiendo 50 ml de la disolución de HP-β-CD preparada anteriormente al 40% (preparada tal como se describió anteriormente) a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra agitadora sobre una placa magnética, agitando la barra agitadora a velocidad media, y añadiendo lentamente 50 ml de la disolución de M₄N/PEG 300 preparada anteriormente (preparada tal como se describió anteriormente), por ejemplo, a una velocidad de aproximadamente 10 ml por min. Se añadió M₄N/PEG 300 usando una pipeta al centro del vaso de precipitados para evitar que se pegara a las paredes del vaso de precipitados y para garantizar la disolución completa. La adición de M₄N/PEG 300 a la disolución de HP-β-CD apareció inicialmente como una disolución blanca, pero finalmente se volvió transparente tras el mezclado continuo. Puede aumentarse o disminuirse a escala esta fórmula según sea apropiado para producir el volumen o la concentración deseados de M₄N/PEG 300 y HP-β-CD. Se esterilizó mediante filtración la disolución madre usando una membrana de PVDF de 0,22 μm, tal como una membrana de filtro en la parte superior del frasco, de desecho, impulsada por vacío, esterilizada anteriormente, obtenida de Millipore (n.º de cat. SCGV T05 RE) (Billerica, MA, EE.UU.). El procedimiento de filtración se impulsó mediante fuerza de vacío y se recoge el filtrado en frascos de vidrio de 250 ml esterilizados anteriormente. Entonces se sellaron herméticamente los frascos, se almacenaron a temperatura ambiente y se protegieron de la luz. Puede prepararse de manera similar una disolución madre de M₄N/PEG 400 o M₄N/monolaurato de PEG 400 en HP-β-CD sustituyendo PEG 300 por PEG 400 o monolaurato de PEG 400 en el procedimiento descrito anteriormente.
- Puede diluirse la disolución madre de M₄N/PEG 300/HP-β-CD, M₄N/PEG 400/HP-β-CD o M₄N/monolaurato de PEG 400/HP-β-CD preparada de la manera anterior antes de su uso *in vitro* o para la administración a animales. Si la dilución es necesaria, preferiblemente se diluye la disolución madre en WFI, en lugar de solución salina, por ejemplo, para mantener la osmolaridad baja. Para preparar 100 ml de una dilución 1:1 de la disolución madre en WFI, se añadieron aproximadamente 50 ml de la disolución madre a un vial de vidrio. Se añadieron aproximadamente 50 ml de WFI a los 50 ml de la disolución madre en el vial para formar una disolución diluida. Se cerró el vial de vidrio y se mezcló bien la disolución diluida agitando e invirtiendo el vial unas cuantas veces. Se esterilizó mediante filtración la disolución diluida usando una membrana de PVDF de 0,22 μm, tal como una membrana de filtro en la parte superior del frasco, de desecho, impulsada por vacío, esterilizada anteriormente, obtenida de Millipore (n.º de cat. SCGV T05 RE) (Billerica, MA, EE.UU.). El procedimiento de filtración se impulsó mediante fuerza de vacío y se recogió el filtrado en frascos de vidrio de 250 ml esterilizados anteriormente. Entonces se sellaron herméticamente los frascos, se almacenaron a temperatura ambiente y se protegieron de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o las diluciones requeridos, tales como diluciones de 1:2 ó 1:4, por ejemplo.
- Puede prepararse una formulación adecuada para su uso como control placebo que contiene PEG 300 al 50% y HP-β-CD al 20% tal como sigue. Para preparar 100 ml de disolución de la formulación de placebo o control, se añaden aproximadamente 50 ml de HP-β-CD al 40% a un vaso de precipitados de vidrio que contiene una barra agitadora sobre una placa magnética. Se ajusta la placa magnética para agitar la disolución de HP-β-CD a velocidad media. Se añaden aproximadamente 50 ml de PEG 300 lentamente a los 50 ml de HP-β-CD en el vaso de precipitados de vidrio mediante pipeta al centro del vaso de precipitados para impedir que el PEG 300 se pegue a las paredes del vaso de precipitados. Se agita la mezcla durante aproximadamente 1 h o hasta que se completa el mezclado. Esta formulación de placebo se esteriliza mediante filtración usando un filtro de membrana de PVDF de 0,22 μm impulsado mediante la fuerza de vacío. Se recoge el filtrado en frascos de vidrio de 250 ml esterilizados anteriormente. Se sellan herméticamente los frascos de vidrio, se almacenan a temperatura ambiente, y se mantienen protegidos de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala esta fórmula según se requiera para producir las cantidades de concentración y volumen deseadas. Además, puede sustituirse PEG 300 por PEG 400 o monolaurato de PEG 400, según se desee.
- Los resultados de la solubilidad de M₄N en formulaciones que contienen HP-β-CD y/o PEG 300, PEG 400, y en formulaciones que contienen HP-β-CD y propilenglicol ("PG"), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC), polivinilpirrolidona (PVP), o Tween® 80 preparadas según los procedimientos anteriores o similares así como las características de las formulaciones resultantes se muestran en las tablas 1 - 5, en las que N representa "No" y S representa "Sí".

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

Excipientes	Concentración de excipiente (en p/v a menos que se especifique lo contrario)	Concentración de fármaco (en mg/ml a menos que se especifique lo contrario)	Disolución tras la rotación	Disolución tras calentar a X°C	Disolución tras enfriar	Estabilidad a temperatura ambiente
α -CD	15%	1	N	N a 90°		
		10	N	N a 90°		
		50	N	N a 90°		
		100	N	N a 90°		
β -CD	1,50%	1	N	N a 90°		
		10	N	N a 90°		
γ -CD	5%	1	N	N a 90°		
HP- β -CD	50%	1	N	S a 90°	S	> 7 días
		10	N	S a 90°	S	> 7 días
		20	N	N a 90°		
		50	N	N a 90°		
		100	N	N a 90°		
	40%	1	N	S a 80°	S	> 7 días
		10	N	S a 80°	S	> 7 días
		12	N	N a 80°		
		14	N	N a 80°		
		16	N	N a 80°		
		20	N	N a 80°		
	30%	50	N	N a 80°		
		100	N	N a 80°		
		1	N	S a 90°	S	> 7 días
10		N	S a 90°	S	< 3 días	
20		N	N a 90°			
20%	50	N	N a 90°			
	100	N	N a 90°			
	1	N	S a 90°	S	> 7 días	
	10	N	N a 90°			
	81,5% (p/p), liofilizado	185 mg/g	polvo			
HP- β -CD	Al 50% en solución salina	10	N	S a 90°	S	> 7 días
		1	N			
		10	N			
	Al 20% en solución salina	50	N			
		1	N	N a 80°		
		10	N	N a 80°		
HP- β -CD y propilenglicol (PG)	HP- β -CD al 40%, PG al 2,5% (v/v)	1	N	N a 80°		
		10	N	N a 80°		
HP- β -CD y PVP	HP- β -CD al 50%, PVP al 1,25% (v/v)	1	N	S a 90°	S	< 3 días
		10	N	N		
		50	N	N		
	HP- β -CD al 40%, PVP al 1% (p/v)	1	N	N		
		10	N	N		
HP- β -CD y PEG 300	HP- β -CD al 27%, PEG 300 al 33% (v/v)	13,3	N	S a 60°	S	> 7 días
		HP- β -CD al 23%,	12,9	N	S a 60°	S

	PEG 300 al 43% (v/v)					
	HP-β-CD al 20%, PEG 300 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 15%, PEG 300 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 7 días
	HP-β-CD al 12,5%, PEG 300 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	<1 día
	HP-β-CD al 13%, PEG 300 al 67% (v/v)	16,7	N	S a 60°	N	
	HP-β-CD al 10%, PEG 300 al 77% (v/v)	19,3	N	S a 60°	N	
	HP-β-CD al 10%, PEG 300 al 25% (v/v)	6,25	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 6,7%, PEG 300 al 16,7% (v/v)	4,17	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 5%, PEG 300 al 12,5% (v/v)	3,13	N	S a 60°	S	< 7 días
HP-β-CD y PEG 400	HP-β-CD al 32%, PEG 400 al 20% (v/v)	10	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 30%, PEG 400 al 25% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 27%, PEG 400 al 33% (v/v)	13,3	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 23%, PEG 400 al 43% (v/v)	12,9	N	S a 60°	S	> 7 días
	HP-β-CD al 20%, PEG 400 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 7 días
	HP-β-CD al 15%, PEG 400 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 3 días
	HP-β-CD al 12,5%, PEG 400 al 50% (v/v)	12,5	N	S a 60°	S	< 1 día
	HP-β-CD al 40%, PEG 400 al 5% (v/v)	10	N	S a 60°	N	
HP-β-CD y Tween® 80	HP-β-CD al 27%, Tween® 80 al 33% (v/v)	13,3	N	S 60°	N	

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

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

Disoluciones madre sin diluir			Por cada 10 mg de M ₄ N		Por cada 50 mg de M ₄ N		Por cada 100 mg de M ₄ N	
PEG 300 (v/v)	HP-β-CD (p/v)	M ₄ N (mg/ml)	PEG 300 en ml (mg)	HP-β-CD (mg)	PEG 300 en ml (mg)	HP-β-CD (mg)	PEG 300 en ml (mg)	HP-β-CD (mg)
50%	15%	12,5	0,4 (450)	120	2,0 (2250)	600	4,0 (4500)	1200
50%	20%	12,5	0,4 (450)	160	2,0 (2250)	800	4,0 (4500)	1600
43%	23%	12,9	0,33 (375)	178	1,67 (1875)	890	3,33 (3746)	1780
33%	27%	13,3	0,25 (281)	200	1,25 (1406)	1000	2,5 (2813)	2000

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

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

Tabla 4. Estabilidad de formulaciones de M₄N en PEG 300

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

Tabla 5. Estabilidad de formulaciones de M₄N en PEG 400

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

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

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

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

contaron el número total de células y el número de células vivas en cada muestra, usando el método de exclusión de azul de tripano. Se analizaron la tasa de proliferación celular y el porcentaje de células muertas en cada muestra. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 1, la figura 2, y las tablas 6 a 12.

- 5 La figura 1 es una representación gráfica de la razón del número de células tratadas/número de células no tratadas representado frente a concentraciones crecientes de M₄N o bien en la formulación de DMSO o bien en la formulación de CPE para el tratamiento de las células C-33A y células HeLa. La figura 2 es una representación gráfica del porcentaje de células muertas representado frente a concentraciones crecientes de M₄N y o bien en la formulación de DMSO o bien en la formulación de CPE para el tratamiento de las dos líneas de células de cáncer, células C-33A y HeLa en cultivo.
- 10 Los resultados muestran que DMSO solo, en ausencia de M₄N, tiene un efecto antiproliferativo significativo y cierto efecto tóxico, tal como se mide mediante el % de células muertas, sobre ambas líneas de células tumorales sometidas a prueba en comparación con los controles no tratados. Por el contrario, la formulación de CPE sola tiene un efecto antiproliferativo y muy poco efecto tóxico sobre las dos líneas de células tumorales en comparación con los controles no tratados.
- 15 Se redujo la tasa de proliferación celular en ambas líneas celulares tras el tratamiento con M₄N o bien en la formulación de DMSO o bien en la formulación de CPE, en comparación con los controles no tratados con M₄N (es decir, 0 µg/ml o 0 µM de M₄N) en la misma formulación. De hecho, el efecto antiproliferativo parecía depender de la dosis de M₄N en la formulación de CPE. En la formulación de CPE, por ejemplo, se encontró que aproximadamente 20 µM o 7,2 µg/ml de M₄N eran suficientes para provocar una inhibición de aproximadamente el 50% en proliferación celular para ambos tipos de células tumorales. Aumentos adicionales en la concentración de M₄N en la formulación de CPE dieron como resultado aumentos adicionales en el efecto antiproliferativo para ambos tipos de células.
- 20 En general, dosis mayores de M₄N o bien en la formulación de DMSO o bien en la formulación de CPE indujeron porcentajes mayores de muerte celular tanto para las células C-33A como para las células HeLa. Sin embargo, M₄N en la formulación de DMSO era más tóxico para las células que las concentraciones correspondientes de M₄N en la formulación de CPE. Mientras que la concentración más alta de M₄N sometida a prueba (80 µM o 28,7 µg/ml) en la formulación de DMSO promovió la muerte celular en aproximadamente el 40% de la población celular, la misma concentración de M₄N en la formulación de CPE promovió la muerte celular en sólo aproximadamente el 20% de la población celular en este experimento.
- 25 Se encontró que estos resultados eran reproducibles en ambas líneas celulares. Los datos de este estudio indican que M₄N en la formulación de CPE tiene la capacidad para detener la proliferación celular, similar a M₄N en la formulación de DMSO, al tiempo que induce menos toxicidad celular que la formulación de DMSO.
- 30 Se recogieron los datos de puntos de tiempo continuados para someter a prueba la eficacia de la formulación de CPE a lo largo del tiempo. Los datos mostraron que tras un periodo de doce meses de almacenamiento a 2-8°C, la formulación de CPE es tan eficaz como cuando es nueva. La viabilidad de las células permaneció similar a lo largo de los doce meses durante los que se almacenó la formulación de CPE. Las tasas de muerte y de proliferación celular permanecieron dentro del mismo intervalo.
- 35 Se recogieron datos para comparar la formulación de CPE original con la nueva formulación de CPE 25/30. Se realizaron estudios a 0 y 3 meses para someter a prueba la eficacia de la formulación a lo largo del tiempo así como para someter a prueba cómo de bien funciona la nueva formulación en relación con la antigua. Los datos mostraron que la formulación de CPE 25/30 es tan eficaz en la inhibición del crecimiento de células tumorales como la formulación de CPE original. La viabilidad celular era similar entre las células HeLa tratadas con diversas concentraciones de fármaco usando o bien la formulación de CPE o bien la formulación de CPE 25/30. La muerte y la proliferación celular permanecieron dentro del mismo intervalo a lo largo del tiempo.
- 40 Se recogió información comparando la formulación de CPE original con la formulación de CPE 33/27 a tiempo cero en células HeLa. Los datos mostraron que CPE 33/27 tenía los mismos efectos sobre células HeLa en viabilidad celular, porcentaje de células muertas y tasa de proliferación.
- 45

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

Tratamiento	% de viabilidad	% de células muertas	Tasa de proliferación
Ninguno	95,4	4,6	1,00
DMSO 0 μ M	82,0	18,0	0,47
DMSO 20 μ M	82,6	17,4	0,20
DMSO 40 μ M	67,0	33,0	0,15
DMSO 60 μ M	60,4	39,6	0,14
DMSO 80 μ M	56,7	43,3	0,11
CPE 0 μ M	92,8	7,2	0,79
CPE 20 μ M	93,0	7,0	0,43
CPE 40 μ M	89,1	10,9	0,43
CPE 60 μ M	89,4	10,6	0,22
CPE 80 μ M	77,5	22,5	0,15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 4. Estudios de toxicidad por infusión intravenosa

5 El fin de este estudio era determinar la dosis tolerable máxima de tetra-O-metil-NDGA (M₄N) cuando se administró mediante infusión intravenosa a perros Beagle machos y hembras, suministrados por Convince Research Products (Cumberland, Virginia, EE.UU.). Se administró a dos perros Beagle, un macho y una hembra, de aproximadamente 6 a 9 meses de edad en la primera dosis, el vehículo de ciclodextrina que contenía HP-β-CD al 20% (p/v) y PEG 300 al 50%, en el día de estudio ("SD") 1, seguido por niveles crecientes de M₄N preparado en el vehículo de ciclodextrina (es decir, los artículos de prueba). Se almacenaron el vehículo de ciclodextrina y los artículos de prueba formados anteriormente a temperatura ambiente. Se obtuvo agua estéril, usada como diluyente, de Baxter Health Care Corp. (Deerfield, Michigan, EE.UU.) o Abbott Laboratories (North Chicago, Illinois, EE.UU.) y se almacenó a temperatura ambiente.

15 El artículo de prueba, vehículo de ciclodextrina y diluyente se consideraron puros al 100% para fines de formulación. Se prepararon formulaciones de dosis cada día de dosificación añadiendo la cantidad apropiada de artículo de prueba o vehículo de ciclodextrina en un envase de vidrio usando una jeringuilla estéril. Para cada dosis, se añadió una cantidad igual de agua estéril a la formulación de M₄N o vehículo de ciclodextrina para formar una dilución 50:50 (v/v). No se requirió dilución para la dosis de 200 mg/kg. Todas las formulaciones se mezclaron mediante inversión suave para garantizar que se formaba una disolución apropiada. Se cargaron las formulaciones en estuches de medicamentos y se almacenaron a temperatura ambiente hasta que se necesitaron.

20 Se administró M₄N a 25 mg/kg en SD 3, 50 mg/kg en SD 5 y 100 mg/kg en SD 8. Sólo la hembra recibió la dosis completa de 100 mg/kg; debido al mal funcionamiento mecánico provocado por precipitación en el tubo de infusión, el perro macho recibió aproximadamente 72 mg/kg (es decir, el 72%) de la dosis prevista. A dos perros Beagle adicionales se les administró una dosis de 200 mg/kg; sin embargo, siguieron las dificultades mecánicas y el perro macho recibió aproximadamente 180 mg/kg (el 90%) de la dosis prevista, mientras que la cantidad que recibió la hembra no pudo determinarse.

25 En SD13, no pudo completarse la dosificación debido a un fallo mecánico en la bomba que puede estar relacionado con la viscosidad de la formulación de 12,5 mg/ml. Se transfirió la formulación no usada a viales de vidrio ámbar y se almacenó a temperatura ambiente hasta que se reformuló en SD 15 diluyendo a 50:50 (v/v) con agua estéril. Entonces se cargaron las diluciones de 6,25 mg/ml en estuches de medicamentos.

30 Se aclimató a los animales usados a las condiciones del laboratorio durante al menos 7 días antes de la primera dosis y se liberaron de la cuarentena por un veterinario del personal. Durante ese tiempo, se identificó cada animal mediante tatuaje en la oreja y un número temporal que se registró en cada etiqueta de jaula. Se cuidó a los animales de la manera convencional y según las disposiciones de la USDA Animal Welfare Act, la PHS Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals y los U.S. Interagency Research Animal Committee Principles for the Utilization and Care of Research Animals.

35 Se proporcionaron alimento y agua a voluntad, a menos que se indique lo contrario. No se conoce que hubiera contaminantes presentes en la dieta o el agua a niveles que pudieran haber interferido con el logro de los objetivos del estudio. Se proporcionó a los animales interacción positiva con seres humanos tal como acariciar, rascar y hablar durante la dosificación y cuando se realizan los exámenes físicos. Debido a la cateterización de la vena yugular, los perros no salieron fuera de sus jaulas tras la cirugía. Se proporcionaron juguetes de goma Kong o juguetes de nailon dentro de las jaulas.

40

Usando técnicas quirúrgicas asépticas, se cateterizó a los animales con un catéter permanente insertado en la vena yugular, y se trataron profilácticamente con un analgésico y antibiótico en el día de la cirugía y con antibióticos y/o analgésicos durante 8 días tras la cirugía. El resumen del estudio se presenta en las tablas 15, 16 y 17.

5 Tabla 15. Dosis de M₄N administrado en la formulación de PEG 300/HP-β-CD a perros Beagle en el estudio de toxicidad

Dosis	Día de estudio	Nivel de dosis (mg/kg)	Concentración de M ₄ N (mg/ml)	Tasa de infusión (ml/kg/h)	Duración de la infusión (h)	Perro macho	Perro hembra
1	1	0	0	4	4	Dosis completa	Dosis completa
2	3	25	6,25	4	1	Dosis completa	Dosis completa
3	5	50	6,25	4	2	Dosis completa	Dosis completa
4	8	100	6,25	4	4	71,9% de la dosis	Dosis completa
5a	13	200	12,50	4	4	Nada	Nada
5b	15	200	6,25	4	8	90,3% de la dosis	Cantidad desconocida

Tabla 16. Pesos corporales individuales de perros Beagle (en kg) a los que se les infundió M₄N

Sexo del grupo	N.º de animal	SD1	SD3	SD6	SD8	SD9	SD13	SD15	SD17
Macho	10529	7,9	7,7	7,8	7,7	7,7	NA	NA	NA
Macho	10567	NA	NA	NA	NA	NA	10,2	10,0	10,0
Hembra	10530	8,3	8,3	8,3	8,2	NA	NA	8,1	8,2
Hembra	10568	NA	NA	NA	NA	NA	6,8	6,8	6,8

SD = Día de estudio

Tabla 17. Concentraciones en suero de M₄N en perros Beagle individuales (en mg/ml) tras la infusión de diversas dosis (en mg/kg)

N.º de animal	Sexo	Día de estudio	Dosis de M ₄ N	Antes de la dosis	Inmediatamente	0,5 h después	1 h después	2 h después	4 h después	8 h después	16 h después
10529	Macho	3	25	ND	5,262	2,343	1,157	0,682	0,322	0,189	0,113
10529	Macho	6	50	0,011	8,661	4,775	2,255	1,464	0,989	0,386	0,226
10529	Macho	8	100	0,216		7,416	3,728	2,034	1,68	0,322	0,357
10567	Macho	13		<LLOQ							
10567	Macho	15	200	0,020	52,96	27,79	22,33	16,90	14,82	3,246	2,501
10530	Hembra	3	25	<LLOQ	13,91	4,941	2,918	1,632	1,542	0,492	0,179
10530	Hembra	6	50	0,108	16,36	6,828	6,623	3,513	2,901	0,741	0,407
10530	Hembra	8	100	0,157	14,50	9,848	9,726	4,494	1,793	1,456	0,589

10 ND = nada detectado; <LLOQ = menos que el límite de cuantificación inferior

Se administraron las dosis 1, 2 y 3 sin incidentes. En el SD 8, durante la dosis de 100 mg/kg, las bombas de jeringuilla se detuvieron de manera prematura y sólo se administraron 88,6 ml de la dosis de 123,2 ml prevista al perro macho (n.º 10529). Se reiniciaron las bombas manualmente según fuera necesario, pero sólo el perro hembra (n.º 10530) recibió la dosis completa.

15 En el SD 15, se intentó administrar una dosis de 200 mg/kg a los perros n.º 10567 y n.º 10568 con una formulación de artículo de prueba diluida y una duración de infusión objetivo de 8 h. Tras 7 h y 45 min de dosificación, se detuvo la bomba para el perro macho. Por tanto el perro macho (n.º 10567) sólo recibió 289 ml de la dosis de 320 ml prevista. Tras 2 h y 12 min de dosificación, se encontró que la aguja de infusión se había soltado del tubo de infusión en el perro hembra (n.º 10568) y se interrumpió la dosificación. No pudo determinarse la cantidad de M₄N administrada por vía intravenosa al perro hembra.

20

Tras completarse cada infusión intravenosa, se administró 1 ml de solución salina estéril como inyección en bolo lento para purgar el material de prueba del tubo de infusión al interior del animal, seguido por una inyección de solución salina-heparina para llenar el tubo de infusión para mantener la permeabilidad. Se observó a los animales. La observación junto a la jaula incluyó la observación de mortalidad, agonía, estado de salud general y signos de toxicidad. Las observaciones clínicas incluyeron evaluación de las características de la piel y el pelaje, el sitio de la cirugía, los ojos y las membranas mucosas, los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso autónomo y central, y patrones somatomotores y de comportamiento. Se extrajo sangre y se colocó en tubos separadores de suero de 2,5 ml para análisis de la concentración de M₄N en suero. Se invirtieron los tubos varias veces, se almacenaron en hielo común y se centrifugaron a aproximadamente 3000 rpm durante aproximadamente 10 min a 4°C. Se transfirió el suero a tubos de microcentrífuga y se almacenaron a -75 ± 10°C.

Se enviaron las muestras en hielo seco al laboratorio de química analítica de GeneLogic (Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) para el análisis del artículo de prueba. El método implicaba tratar alícuotas de suero de perro, de al menos 0,5 ml, con acetonitrilo, filtrar e inyectar el filtrado en una columna de HPLC con detección de espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM). Se cuantificó el analito usando una curva patrón externa con triazolam como patrón interno.

Se sacaron del estudio el perro macho n.º 10529 y el perro hembra n.º 10530 en el SD 9 y 17, respectivamente, y se sacrificaron y se desangraron. Se sacrificaron y se desangraron el macho n.º 10567 y la hembra n.º 10568 en el SD 17. Todos los animales se sacrificaron mediante una inyección intravenosa de Nembutal®.

Se realizó la autopsia de todos los perros tan pronto como fue posible tras la muerte. Se realizó una autopsia macroscópica, que incluía el examen de la superficie externa del cuerpo, el sitio de la cirugía, todos los orificios, las cavidades craneal, torácica y abdominal y su contenido. Se prepararon frotis de médula ósea a partir de la médula femoral. Se secaron los portaobjetos al aire, se fijaron en metanol, y se mantuvieron para una posible evaluación futura. Se conservaron los tejidos en formalina tamponada neutra ("NBF") al 10%. Además, se recogieron los tubos de infusión unidos al dispositivo de acceso vascular ("VAP"), se ataron en ambos extremos, y se almacenaron en NBF. Los riñones, los pulmones, la vejiga urinaria, y cualquier lesión macroscópica se incrustaron, se seccionaron, se tiñeron y se examinaron por un patólogo veterinario con certificado por la junta. No hubo hallazgos patológicos relacionados con el artículo de prueba en los tejidos examinados.

Los resultados mostraron que el tratamiento con M₄N no tenía ningún efecto sobre la mortalidad. No hubo observaciones clínicas o efectos sobre el peso corporal evidentes relacionados con el tratamiento. No hubo hallazgos de patología macroscópica o cambios microscópicos relacionados con el artículo de prueba. Los niveles de concentración en suero de M₄N fueron los más altos inmediatamente tras el periodo de infusión y los niveles de M₄N fueron más altos en el perro hembra que en el perro macho a todos los intervalos medidos. M₄N todavía era detectable 16 h tras el periodo de infusión, aumentando la cantidad detectada al aumentar la dosis.

En conclusión, no se observaron efectos adversos relacionados con el tratamiento a dosis de hasta aproximadamente 200 mg/kg.

Ejemplo 5. Estudios de toxicidad de la infusión intravenosa adicionales

A. Un estudio de toxicidad de la infusión intravenosa de 7 días de M₄N (CPE) en perros Beagle

Se realizó este estudio para evaluar el perfil toxicocinético de M₄N formulado en HP-β-CD al 30% y PEG 300 al 25% cuando se administra como dosis de infusión intravenosa individual durante siete días consecutivos en perros Beagle. Este estudio constituye el primer estudio de esta formulación particular de M₄N en perros y se ejecutó para evaluar la toxicidad y comparar la tolerancia de una formulación diluida (10 mg/ml frente a 5 mg/ml).

Se administraron dosis a un total de doce perros Beagle (8 machos/4 hembras) con M₄N mediante una infusión intravenosa de 54 minutos (grupo 2) o de 108 minutos (grupos 1, 3 y 4). Todos los animales recibieron siete dosis, una al día a lo largo de siete días consecutivos.

Se evaluaron los siguientes parámetros: observaciones clínicas y pesos corporales. Se realizó el análisis del artículo de prueba en los días de estudio 1 y 7, se extrajeron muestras de sangre (con el objetivo de obtener un volumen de 2,0 ml) de cada animal a partir de un vaso apropiado en los siguientes puntos de tiempo:

Grupo	Día de estudio	Puntos de tiempo toxicocinéticos
1, 3 y 4	1	Antes de la dosis, 1, 1,8 (fin de la infusión), 4, 6, 8 y 16 horas tras el inicio de la dosis
	7	Antes de la dosis, 1, 1,8 (fin de la infusión), 4, 6, 8, 16, 24 y 36 horas tras el inicio de la dosis
2	1	Antes de la dosis, 30 minutos y 0,9 (fin de la infusión), 2, 4, 8 y 16 horas tras el inicio de la dosis
	7	Antes de la dosis, 30 minutos y 0,9 (fin de la infusión), 2, 4, 8, 16, 24 y 36 horas tras el inicio de la dosis

Se realizaron autopsias macroscópicas en los animales de los grupos 1 y 3 y se procesaron todos los sitios de

inyección para determinar la histología. Observaciones clínicas detalladas revelaron los siguientes hallazgos: se observó descoordinación reversible transitoria de las extremidades traseras en los grupos 2, 3 y 4. La mayoría de estas observaciones se observaron en los grupos 3 y 4. Apareció un cambio de color en la orina en los grupos 1 y 3. Puesto que este hallazgo se indicó en el grupo de vehículo, puede estar relacionado con el vehículo. Se indicaron tres observaciones de hinchazón en la zona de las extremidades delanteras en los grupos 1, 2 y 3 que comenzó el día 3 y terminó el día 4. Es posible que el hallazgo indique irritación debido a múltiples inserciones de la aguja en la misma zona de dosificación (vena cefálica). Se indicó una única observación de respiración rápida para la hembra del grupo 3 como un incidente aislado y no se volvió a observar. Finalmente, se indicaron observaciones esporádicas de diarrea, emesis, heces mucoides y heces blandas. Estas observaciones son comunes en perros Beagle y se consideró que estaban inducidas por el estrés y no estaban relacionadas con el artículo de prueba.

El análisis del suero reveló que la menor concentración del artículo de prueba máxima (nominalmente 18759 ng/ml) era en los animales del grupo 4 que recibieron 45 mg/kg (5 mg/ml). Se observaron mayores concentraciones máximas (nominalmente 33420 ng/ml) en los animales del grupo 2 que recibieron 45 mg/kg (10 mg/ml). Tal como se esperaba, las mayores concentraciones (nominalmente 46704 ng/ml) se observaron en los animales del grupo 3 que recibieron 90 mg/kg (10 mg/ml). El tiempo de concentración máxima para todos los grupos estaba al final de la infusión (0,9 horas para el grupo 2 y 1,8 horas para los grupos 3 y 4). No se observó artículo de prueba en la muestras de ningún animal del grupo 1 animales que recibieron vehículo. Se presentan curvas de concentración tras una administración en la figura 3A (escala no logarítmica) y la figura 3B (escala logarítmica).

Se realizaron autopsias macroscópicas en los animales del Grupo 1 y 3. Se recogieron los sitios de inyección y se procesaron para determinar la histología. La histología reveló que el sitio de inyección de los controles apareció menos afectado que los de los animales tratados y hubo más engrosamiento y cambio de color en el sitio de inyección en los animales tratados en comparación con controles. Esto sugiere que el artículo de prueba era más irritante que el vehículo. No se observaron otros hallazgos macroscópicos en los animales en los que se realizó la autopsia.

B. Un estudio de toxicidad de la infusión intravenosa repetida de 14 días de M₄N (CPE) en perros Beagle con un periodo de recuperación de 28 días

Se administró a perros Beagle machos y hembras CPE (12,5 mg/ml en HP-β-CD al 20% en PEG 300 al 50%) mediante infusión intravenosa durante 14 días, con un periodo de recuperación de 28 días para determinar la reversibilidad de cualquier toxicidad relacionada con el tratamiento. Inicialmente, se asignaron aleatoriamente 32 perros (16/sexo) a uno de cuatro grupos (5/sexo en los grupos 1 y 4, 3/sexo en los grupos 2 y 3) y se les administró HP-β-CD al 20% en PEG 300 al 50% (placebo) o artículo de prueba (CPE) a dosis de 22,5, 45 ó 90 mg/kg. Todos los animales recibieron un total de 14 dosis diarias mediante infusión intravenosa. Tras la dosificación, se sacrificaron 3 perros/sexo/grupo en el SD 16 y se mantuvieron los 2 perros/sexo restantes en los grupos 1 y 4 durante un periodo de recuperación de 28 días.

Los parámetros evaluados durante el estudio incluían mortalidad, observaciones clínicas, peso corporal y cambios en el peso corporal, consumo de alimentos, oftalmología, cardiología, patología clínica, peso de los órganos y patología macroscópica y microscópica.

El tratamiento con CPE no tuvo ningún efecto sobre la mortalidad; todos los animales sobrevivieron hasta el sacrificio programado. No hubo efectos sobre el peso corporal, cambio en el peso corporal o consumo de alimentos. No se observaron efectos oculares relacionados con el tratamiento. Se observó una evidencia transitoria de actividad del SNC reversible (ataxia) en un perro con 90 mg/kg en dos ocasiones. Todas las demás observaciones clínicas se consideraron eventos aislados no relacionados con el tratamiento.

No hubo efectos relacionados con el artículo de prueba sobre la cardiología. Antes de la dosis y en el SD 13, un macho tratado con placebo tenía latidos ventriculares prematuros y en el SD 1 una hembra tratada con 45 mg/kg de CPE tenía un latido auricular que no se conducía a los ventrículos; ninguno de estos hallazgos se consideró relacionado con el tratamiento.

No hubo efectos evidentes relacionados con el artículo de prueba sobre parámetros de patología clínica. Se observaron recuentos de reticulocitos absolutos significativamente menores en machos tratados con 22,5 mg/kg de CPE en el SD 15; sin embargo el cambio era mínimo, similar al valor antes de la dosis, y no se consideró biológica o toxicológicamente significativo.

En el SD 16, se relacionaron las significaciones estadísticas en pesos de bazo absolutos de machos tratados con 22,5 y 45 mg/kg de CPE con variación de animales individuales en el grupo control (placebo). No se observaron diferencias significativas en pesos de órgano relativos.

Se consideró que las lesiones observadas en los sitios de infusión en todos los animales en la autopsia en el SD 16 eran secundarias al procedimiento de infusión intravenosa y no estaban relacionadas con el tratamiento. Se observó enrojecimiento del sitio de infusión en una hembra en el grupo de 45 mg/kg de CPE y se correlacionó de manera microscópica con engrosamiento vascular de la íntima, leve, multifocal, hiperplasia vascular leve, multifocal de los miocitos del músculo liso y una perivasculitis subcutánea subaguda, leve, multifocal, que indica irritación provocada

por la técnica de dosificación. Los animales macho y hembra seleccionados en los grupos placebo y de 90 mg/kg de CPE presentaron congestión esplénica difusa, de leve a moderada atribuida al modo de sacrificio. Todos los demás hallazgos macroscópicos y microscópicos observados en las autopsias de los SD 16, 42, y 43 se consideraron casuales y no relacionados con el tratamiento.

- 5 En conclusión, no se observaron efectos adversos relacionados con el tratamiento tras 14 días de infusión intravenosa de CPE en perros Beagle a dosis de hasta 90 mg/kg.

C. Estudio de intervalo de dosis por vía i.v. en perros Beagle

10 Se administró a un perro macho individual M₄N (12,5 mg/ml) en HP-β-CD al 20%/PEG 300 al 50% mediante infusión i.v. (10 ml/kg/hora). Se produjo un aumento de la presión en el tubo de infusión y fuga de la formulación de prueba desde la jeringuilla. La dosificación dio como resultado salivación, midriasis, orina de color rojo, ataxia grave, temblores y convulsiones. Debido a que las observaciones se consideraron graves, se consideró que el animal estaba moribundo y se programó su sacrificio. Antes del sacrificio, pareció que el perro se recuperaba; se redujo notablemente la gravedad de todas las observaciones clínicas indicadas anteriormente.

15 Se intentó una dosis idéntica en un perro hembra individual a una tasa de infusión de 5 ml/kg/hora y dio como resultado movimientos descoordinados/desequilibrados y micción frecuente tras la dosificación. El perro se recuperó en el plazo de 1 hora y 15 minutos desde la dosificación y no presentó signos clínicos adversos continuados o adicionales.

20 Se administraron dosis a un macho y una hembra adicionales a 150 mg/kg y después a 125 mg/kg. Se produjeron ataxia grave, nistagmo, heces u orina de color rojo, micción frecuente, vocalización durante la dosificación, disnea, emesis, y/o salivación a estos niveles de dosis. Ambos animales se recuperaron en el plazo de 1 hora desde la dosificación y posteriormente no se observaron signos clínicos importantes adicionales.

25 Observaciones clínicas, causales, junto a la jaula, tras la dosis o no programadas observadas a 200, 150 y 125 mg/kg incluyeron eritema de mínimo a leve de la nariz y/o la orejas, cambios excretores (heces blandas y/o mucoides) y un caso cada uno de rinorrea transparente y exudados vaginales de color rojo. Estos hallazgos se produjeron de manera poco frecuente y se consideraron hallazgos de laboratorio comunes no relacionados con el tratamiento. Se produjo un caso de pataleo durante la dosificación en el SD 43 en la hembra que recibió 125 mg/kg y se atribuye al uso de cabestrillos de dosificación y tampoco se consideró relacionado con el tratamiento.

30 Se añadieron dos perros más (no tratados anteriormente) al diseño del estudio y se les administraron dosis a 75 mg/kg/día a una tasa de infusión de 5 ml/kg/hora, para un total de 12 dosis en un intervalo de 13 días. La única observación notable tras la dosis fue una única observación de orina de color marrón-rojizo en la hembra en el SD 7; se desconoce la significación de este acontecimiento. Las observaciones clínicas incluyeron heces blandas en el macho y emesis de color blanco espumosos en la hembra; estos hallazgos fueron incidencias poco frecuentes o aisladas y se consideraron no relacionados con el tratamiento. Se indicó una observación tras la dosis de extremidades debilitadas en el macho en el SD 2 y se atribuye al uso de la restricción por el cabestrillo. Ambos perros se recuperaron de cualquier signo clínico observado en el plazo de 1 hora desde la dosificación. El tratamiento con M₄N no tuvo ningún efecto sobre el peso corporal y no se observaron lesiones macroscópicas en la autopsia. No se indicaron otras observaciones relacionadas con el tratamiento.

D. Un estudio de toxicidad de la infusión i.v. de 8 días en ratas Sprague-Dawley

40 Se administraron dosis crecientes de 0, 100, 150 ó 200 mg/kg de M₄N en HP-β-CD al 10% en PEG 300 (6,25 mg/ml) mediante infusión i.v. una vez cada cuatro días a ratas Sprague-Dawley macho y hembra (3/de cada sexo) a 8 ml/kg/h. Después de las cuatro infusiones iniciales se extendió el estudio para incluir infusiones diarias de cuatro horas de duración durante hasta 14 días. No se produjo mortalidad evidente relacionada con M₄N. Se encontró una rata macho muerta el primer día de dosificación durante la administración del vehículo y se encontró una rata hembra muerta en el día 5 del estudio al final de la infusión de 100 mg/kg del material de prueba. Estas muertes se consideraron no relacionadas con el artículo de prueba debido a que a una rata no se le administró artículo de prueba (sólo vehículo) y para la otra rata, fue un acontecimiento individual sobreviviendo otras ratas a múltiples días de dosificación a 200 mg/kg/día.

50 Observaciones clínicas y de autopsia que se produjeron fueron secundarias a los dispositivos de entrada y tubos de infusión. Estas observaciones incluyeron hinchazón en el cuello o la axila y uso limitado de las extremidades traseras. Durante la fase de dosificación diaria continuada del estudio, se produjeron temblores en una rata macho y una hembra. Además, se produjo ptosis e hiperactividad en una rata macho y una hembra. Estas fueron las únicas observaciones clínicas que pueden haber estado relacionadas con la dosificación de 200 mg/kg/día del artículo de prueba.

55 Tanto las ratas macho como las hembras aumentaron de peso a lo largo de todo el estudio. Los mayores aumentos de peso se produjeron tras la administración del vehículo. Los valores del consumo de alimentos eran similares tras la administración del vehículo o artículo de prueba.

Basándose en el número limitado de ratas evaluadas en este estudio, la administración del vehículo o artículo de prueba a dosis de hasta 200 mg/kg/día durante hasta ocho días consecutivos pareció tolerarse por las ratas, provocando algunas observaciones clínicas adversas tras la dosificación diaria. La mayoría de las observaciones clínicas adversas y todos los hallazgos en la autopsia que se produjeron se consideraron relacionados con los dispositivos de entrada y los tubos usados para administrar dosis a las ratas. En el momento del sacrificio, todos los tubos de infusión o bien se habían movido fuera de la vena yugular y/o bien ya no eran permeables y se encontraron masas (se supuso que era el artículo de prueba) donde estaban ubicados los dispositivos de entrada/tubos.

Datos comparativos del ejemplo 6. Solubilidad de M₄N en celulosas modificadas

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

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

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

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

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

Se prepararon 10 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 20 mg/ml en EC al 5%

(p/v) (la "formulación de EC") tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 10 ml de la formulación de EC al 5%, preparada tal como se describió anteriormente, a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra agitadora. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra agitadora para agitar a velocidad media, y se cubrió con una cubierta de Teflon® redonda. Se añadieron aproximadamente 200 mg de M₄N lentamente a la formulación de EC al 5% en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/EC durante 2 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin grumos presentes. Se calentó la mezcla de M₄N/EC a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/EC), o más tiempo según sea necesario para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla o disolución de M₄N/EC para determinar la presencia de cualquier cantidad de M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de material particulado. Se almacenó la disolución de M₄N/EC final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz.

Puede aumentarse o disminuirse a escala el procedimiento anterior para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N y puede aumentarse o disminuirse la temperatura de calentamiento para lograr la disolución de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otras celulosas modificadas, tal como, por ejemplo, HPMC, MC (metilcelulosa) y CMC (carboximetilcelulosa). Los resultados de la solubilidad de M₄N en las celulosas modificadas se exponen en la tabla 18.

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

Tabla 18. Solubilidad de M₄N en formulaciones que contienen celulosas modificadas

Excipientes	Concentración de excipiente (en p/v a menos que se especifique lo contrario)	Concentración de fármaco (en mg/ml a menos que se especifique lo contrario)	Disolución tras la rotación	Disolución tras calentar	Disolución tras enfriar	Tiempo de estabilidad a temperatura ambiente
HPMC	2,3%	1	N	N a 90°C		
		10	N	N a 90°C		
		50	N	N a 90°C		
		100	N	N a 90°C		
HP-β-CD y HPMC	HP-β-CD al 50%, HPMC al 0,5%	1	N	S a 90°C	S	> 7 días
		10	N	S a 90°C	S	> 7 días
		50	N	N a 90°C		
	HP-β-CD al 84%, HPMC al 1%, liofilizado	150 mg/g	polvo			
EC	5% (p/v) en EtOH	1	S			> 3 días
		10	N	S a 40°C	S	> 3 días
		20	N	S a 60°C	S	> 3 días
		30	N	S a 60°C	N	
		50	N	S a 90°C	N	
		100	N	S a 90°C	N	
MC (baja viscosidad)	2% (p/v)	1	N	N a 90°C		
		10	N	N a 90°C		
CMC	1% (p/v)	1	N	N a 90°C		

(alta viscosidad)		10	N	N a 90°C		
CMC	4%	1	N	N a 90°C		
(baja viscosidad)		10	N	N a 90°C		

Datos comparativos del ejemplo 7. Solubilidad de M₄N en lípidos insolubles en agua o disolventes orgánicos solubles en agua

- 5 Se prepararon 10 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml en aceite de sésamo tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 10 ml de aceite de sésamo a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra agitadora. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra agitadora para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 500 mg de M₄N lentamente al aceite de sésamo en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo durante aproximadamente 2 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin ningún grumo presente. Se calentó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/aceite de sésamo), o más tiempo según se necesite para garantizar disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla o disolución de M₄N/aceite de sésamo para determinar la presencia de cualquier cantidad de M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de material particulado. Si se formaron cristales, pudo calentarse de nuevo la disolución de M₄N/aceite de sésamo a 60°C durante aproximadamente 1 h, con agitación, sobre una placa magnética caliente hasta que todo el M₄N se disolvió de nuevo en la disolución. Se almacenó la disolución de M₄N/aceite de sésamo final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz.
- 10
- 15
- 20 Puede aumentarse o disminuirse a escala el procedimiento anterior para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N y puede aumentarse o disminuirse la temperatura de calentamiento para lograr la disolución de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros lípidos insolubles en agua, tal como, por ejemplo, sustituyendo aceite de sésamo en el procedimiento descrito anteriormente por aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de menta, u otros agentes de solubilización, y combinaciones de los mismos. Los resultados se muestran en la tabla 19.
- 25 La tabla 19 muestra, por ejemplo, que M₄N era soluble en aceite de maíz a 60°C a concentraciones que oscilan entre 1 mg/ml y 100 mg/ml y, excepto al nivel de 100 mg/ml, permanecieron en disolución tras enfriarse, siendo las disoluciones estables durante más de 3 días a las concentraciones de 1 y 10 mg/ml, durante menos de 3 días a los niveles de 20, 40 y 50 mg/ml y durante menos de 1 día al nivel de 60 mg/ml. Además, M₄N era soluble en aceite de oliva a 60°C al nivel de 30 mg/ml pero no permaneció en disolución tras enfriarse.
- 30 En aceite de sésamo, M₄N era soluble a temperatura ambiente al nivel de 10 mg/ml y a 60°C a las concentraciones de 20 mg/ml, 30 mg/ml y 50 mg/ml, y permaneció en disolución tras enfriarse. Las disoluciones de 10 mg/ml y 20 mg/ml eran estables a temperatura ambiente durante más de 3 días, la disolución de 30 mg/ml era estable a temperatura ambiente durante menos de 3 días, y la disolución de 50 mg/ml era estable a temperatura ambiente durante menos de 1 día.
- 35 Se prepararon 10 ml de una disolución de M₄N a una concentración de aproximadamente 60 mg/ml en el 85% de aceite de sésamo y el 15% de Tween® 20 tal como sigue. Se añadieron aproximadamente 8,5 ml de aceite de sésamo a un vaso de precipitados de vidrio que contenía una barra agitadora. Se colocó el vaso de precipitados sobre una placa magnética y se ajustó la barra agitadora para agitar a velocidad media. Se añadieron aproximadamente 1,5 ml de Tween® 20 lentamente hacia el centro del vaso de precipitados. Se añadieron aproximadamente 600 mg de M₄N lentamente a la mezcla de aceite de sésamo/Tween® 20 en el centro del vaso de precipitados con la ayuda de una espátula para impedir que M₄N se pegara a las paredes del vaso de precipitados. Se agitó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 durante aproximadamente 2 h o hasta que todo el M₄N se había disuelto o se había suspendido uniformemente sin grumos presentes. Se calentó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 min (o más tiempo si se deseaba un volumen de disolución mayor, por ejemplo, 1 h a 60°C para 500 ml de la mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20), o más tiempo según se necesite para garantizar la disolución completa de M₄N. Se observó la mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 para determinar la presencia de cualquier cantidad de M₄N no disuelto sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de material particulado. Se almacenó la disolución de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz. Si se formaron cristales durante el almacenamiento, pudo calentarse de nuevo la disolución de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 a 60°C, con agitación, sobre una placa magnética caliente hasta que todo el M₄N se disolvió de nuevo en la disolución.
- 40
- 45
- 50

Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos

- de M₄N y puede aumentarse o disminuirse la temperatura de calentamiento para lograr la disolución de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros lípidos insolubles en agua combinados con tensioactivos no iónicos, tensioactivos iónicos o disolventes orgánicos solubles en agua, tal como, por ejemplo, sustituyendo aceite de sésamo o Tween® 20 en el procedimiento descrito anteriormente por aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de menta, Tween® 80, succinato de d-alfa-tocoferil-polietilenglicol 1000 (TPGS), lecitina, PEG 300, PEG 400, monolaurato de PEG 400, glicerol, polivinilpirrolidona ("PVP"), propilenglicol ("PG"), u otros agentes de solubilización, y combinaciones de los mismos. Los resultados de la solubilidad de M₄N en lípidos insolubles en agua se exponen en la tabla 19.
- La tabla 19 muestra, por ejemplo, que M₄N a 60 mg/ml era soluble en una formulación que contenía el 85% aceite de sésamo y el 15% de Tween® 20 a 55°C y 40 mg/ml de M₄N era soluble en la misma formulación a 45°C, pero M₄N no permanecía en disolución en estas formulaciones tras enfriarse. Por el contrario, M₄N a 29 mg/ml era soluble en una formulación ligeramente diferente que contenía el 89% aceite de sésamo y el 11% de Tween® 20 a 60°C y permaneció en disolución tras enfriarse, siendo la disolución estable a temperatura ambiente durante más de 7 días.
- Se preparó 1 ml de una emulsión de M₄N a una concentración de aproximadamente 2,9 mg/ml en solución salina tal como sigue. Se colocaron aproximadamente 0,9 ml de una solución salina al 0,9% en un tubo de polipropileno de 1,5 ml. Se añadieron aproximadamente 0,1 ml de una disolución de M₄N a una concentración de 29 mg/ml en el 89% de aceite de sésamo, el 11% de Tween® 20 al tubo de polipropileno. Se agitó vigorosamente con vórtex la disolución o mezcla de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 en solución salina durante un minuto. Se preparó la emulsión mediante sonicación de la disolución de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 durante cinco minutos con una sonda de micropunta ajustada a una amplitud de sonda máxima del 60%. Se observó la emulsión de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 para determinar la presencia de cualquier cantidad de M₄N precipitado sosteniendo el vaso de precipitados contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro, buscando la presencia de material particulado. Se almacenó la emulsión de M₄N/aceite de sésamo/Tween® 20 final a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz.
- Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otros lípidos combinados con otros tensioactivos, o disolventes orgánicos solubles en agua, tal como, por ejemplo, sustituyendo aceite de sésamo o Tween® 20 en el procedimiento descrito anteriormente por aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de menta, Tween® 80, TPGS, lecitina, PG, PEG 300, PEG 400, monolaurato de PEG 400, glicerol, polivinilpirrolidona ("PVP"), u otros agentes de solubilización, y combinaciones de los mismos.

Tabla 19. Solubilidad de M₄N en lípidos insolubles en agua

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

ES 2 536 177 T3

		125	N	S a 40°C	S	< 1 día
Aceite de soja	100%	10	N	S a 60°C	S	> 7 días
		30	N	S a 60°C	N	
		50	N	S a 60°C	N	
Aceite mineral	100%	10	N	S a 60°C	S	> 7 días
		50	N	S a 60°C	S	< 1 día
		100	N	S a 60°C	N	
		200	N	S a 60°C	N	
Aceite de oliva, aceite de soja	El 80% de aceite de oliva, el 20% de aceite de soja	60	N	S a 70°C	N	
Aceite de sésamo, Tween® 20 y glicerol	El 75% de aceite de sésamo, el 9% de Tween® 20, el 16% de glicerol	24,3	N	S a 60°C	S	< 7 días
	El 10% de emulsión de aceite en el 90% de solución salina	2,4	S			< 1 día
Aceite de sésamo y Tween® 20	El 89% de aceite de sésamo, el 11% de Tween® 20	29	N	S a 60°C	S	> 7 días
	El 10% de emulsión de aceite en el 90% de solución salina	2,9	S			< 3 días
	El 85% de aceite de sésamo, el 15% de Tween® 20	40	N	S a 45°C	N	
	El 85% de aceite de sésamo, el 15% de Tween® 20	60	N	S a 55°C	N	
Aceite de menta, PEG 300	El 50% de aceite de menta, el 50% de PEG 300	40	N	S a 35°C	S	> 7 días
		60	N	S a 35°C	S	> 7 días
		125	N	S a 35°C	N	
	El 60% de aceite de menta, el 40% de PEG 300	60	N	S a 40°C	S	> 3 días
Aceite de menta, PEG 400	El 50% de aceite de menta, el 50% de PEG 400	40	N	S a 40°C	S	> 7 días
		60	N	S a 40°C	S	> 7 días
		100	N	S a 40°C	N	
		125	N	S a 40°C	N	
	El 60% de aceite de menta, el 40% de PEG 400	60	N	S a 40°C	N	
Aceite de menta y Tween® 20	El 50% de aceite de menta, el 50% de Tween® 20	40	N	S a 40°C	S	> 3 días
		60	N	S a 40°C	S	> 3 días
		125	N	S a 40°C	N	
Aceite de menta, PEG 400, glicerol	El 40% de aceite de menta, el 40% de PEG 400, el 20% de	52	N	S a 40°C	N	

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

La tabla 20 muestra los resultados obtenidos para la solubilidad de M₄N en disolventes orgánicos solubles en agua EtOH, PG, PEG 300, PEG 400, monolaurato de PEG 400, glicerol, PVP, y determinadas combinaciones de los mismos.

Tabla 20. Solubilidad de M₄N en disolventes orgánicos solubles en agua

Excipientes	Concentración de excipiente	Concentración de fármaco (en mg/ml)	Disolución tras la rotación	Disolución tras calentar	Disolución tras enfriar	Tiempo de estabilidad a temperatura ambiente
Etanol	100%	1	S			> 3 días
		10	N	N a 37°C		
PVP	15%	1	N	N a 90°C		
		10	N	N a 90°C		
Propilenglicol	100%	1	N	S a 55°C	S	< 1 día
		10	N	S a 55°C	S	< 1 día
		20	N	S a 55°C	S	< 1 día
PEG 400	100%	25	N	S a 50°C	S	< 7 días
		30	N	S a 50°C	S	< 3 días
		40	N	S a 50°C	S	< 1 día
		50	N	S a 60°C	S	< 1 día
		100	N	S a 60°C	N	
	5%	10	N	N a 50°C		
Monolaurato de PEG 400	100%	20	N	S a 50°C	S	> 3 días
		50	N	S a 50°C	S	< 1 día
PEG 300	100%	25	N	S a 50°C	S	< 7 días
		30	N	S a 50°C	S	< 3 días
		40	N	S a 50°C	S	< 1 día
		50	N	S a 60°C	S	< 1 día
		100	N	S a 60°C	N	
	33%	10	N	N a 50°C		
Glicerol	100%	1	N	S a 70°C	N	
		10	N	S a 70°C	N	
		20	N	S a 70°C	N	
Propilenglicol y etanol	Propilenglicol al 40%, etanol al 10%	10	N	N		

Datos comparativos del ejemplo 8. Solubilidad de M₄N en tensioactivos no iónicos

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

Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N y puede aumentarse o disminuirse la temperatura de calentamiento para lograr la disolución de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N en otro tensioactivo no iónico, tensioactivos iónicos o moléculas anfífilas, tal como, por ejemplo, sustituyendo Tween® 20 en el procedimiento descrito anteriormente por Tween® 80, otros agentes de solubilización y combinaciones de los mismos. Los resultados de la solubilidad de M₄N en Tween® 20, Tween® 80 y una combinación de Tween® 20 y PEG 400 se muestran en la tabla 21.

La tabla 21 muestra que M₄N era soluble en Tween® 20 o Tween® 80 a una concentración de 1 mg/ml a temperatura ambiente. La disolución de M₄N en Tween® 20 ("M₄N/Tween® 20") era estable a temperatura ambiente durante más de 7 días, mientras que la disolución de M₄N en Tween® 80 ("M₄N/Tween® 80") era estable durante más de 3 días de observación. Concentraciones más altas de M₄N eran solubles en Tween® 20 o Tween® 80 a 50°C. Además, M₄N permaneció en disolución tras enfriar a concentraciones de hasta 60 mg/ml en Tween® 20 o hasta 50 mg/ml en Tween® 80, mientras que se volvía insoluble tras enfriar a los niveles de 80 mg/ml y 100 mg/ml en Tween® 20. Se observó que las disoluciones M₄N/Tween® 20 10 mg/ml y 20 mg/ml eran estables a temperatura ambiente durante más de 7 días. Se observó que las disoluciones de M₄N/Tween® 20 40 mg/ml y 80 mg/ml eran estables a temperatura ambiente durante menos de 3 días. Para las disoluciones de M₄N/Tween® 80, se observó que la disolución de 10 mg/ml era estable a temperatura ambiente durante más de 3 días mientras que la disolución de 50 mg/ml era estable a temperatura ambiente durante menos de 1 día.

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

La tabla 22 muestra la concentración de M₄N en µg/ml y su concentración correspondiente en cantidades de µM.

Tabla 21. Solubilidad de M₄N en tensioactivos no iónicos

Excipientes	Concentración de excipiente	Concentración de fármaco (en mg/ml)	Disolución tras la rotación	Disolución tras calentar	Disolución tras enfriar	Estabilidad a temperatura ambiente
Tween® 20	100% (v/v)	1	S			> 7 días
		10	N	S a 50°C	S	> 7 días
		20	N	S a 50°C	S	> 7 días
		40	N	S a 50°C	S	< 3 días
		60	N	S a 50°C	S	< 3 días
		80	N	S a 50°C	N	
		100	N	S a 50°C	N	
Tween® 80	100% (v/v)	1	S			> 3 días
		10	N	S a 50°C	S	> 3 días
		50	N	S a 50°C	S	< 1 día
Tween® 20, PEG 400	El 50% de Tween® 20, el 50% de PEG	30	N	S a 65°C	S	> 3 días

	400					
		40	N	S a 65°C	S	> 3 días
		50	N	S a 65°C	S	> 3 días
		60	N	S a 65°C	S	> 3 días

Tabla 22. Tabla de conversión para la concentración de M₄N

M ₄ N en $\mu\text{g/ml}$	M ₄ N en μM
0	0
7,2	20
14,3	40
21,5	60
28,7	80

Datos comparativos del ejemplo 9. Formulaciones liofilizadas que contienen M₄N en HP- β -CD

5 Se prepararon 120 mg de polvo liofilizado de M₄N a una concentración de aproximadamente 185 mg/g (p/p) en HP- β -CD tal como sigue. Se usaron cantidades molares iguales de HP- β -CD y M₄N para aumentar la tasa de complejación entre HP- β -CD y M₄N. Se mezclaron aproximadamente 98 mg de HP- β -CD y aproximadamente 22,2 mg de M₄N entre sí en un tubo de polipropileno de 1,5 ml. Se añadieron aproximadamente 0,2 ml de WFI a la mezcla en el tubo de polipropileno que contenía la mezcla de polvo de HP- β -CD/M₄N y se agitó con vórtex durante 1 minuto para producir una suspensión de HP- β -CD/M₄N en agua. Se congeló la suspensión de HP- β -CD/M₄N a -20°C durante 24 horas. Entonces se centrifugó la suspensión de HP- β -CD/M₄N a 1.400 rpm a vacío a 60°C durante 10 aproximadamente 2 horas para eliminar todo el agua de la suspensión. El polvo seco del complejo de HP- β -CD/M₄N pesaba aproximadamente 120 mg. Entonces puede disolverse o resuspenderse este complejo de polvo de HP- β -CD/M₄N en agua u otros agentes de solubilización. Se almacenó el complejo de polvo de M₄N/HP- β -CD final a temperatura ambiente y se mantuvo protegido de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar 15 formulaciones que contiene M₄N con otras ciclodextrinas, tal como, por ejemplo, sustituyendo HP- β -CD en el procedimiento descrito anteriormente por otras ciclodextrinas. Los resultados mostrados en la tabla 1 demuestran que se obtuvo un complejo de polvo de HP- β -CD/M₄N tras la liofilización de la suspensión de HP- β -CD/M₄N que consistía aproximadamente en el 81,5% de HP- β -CD y el 18,5% de M₄N.

20 Se prepararon 400 mg de polvo liofilizado de M₄N a una concentración de aproximadamente 150 mg/g (p/p) en HP- β -CD/HPMC tal como sigue. Se añadió aproximadamente 1 ml de una disolución de HP- β -CD al 50%/HPMC al 0,5%, preparada tal como se describió anteriormente, a un tubo de polipropileno de 1,5 ml. Se añadieron aproximadamente 60 mg de M₄N al tubo de polipropileno que contenía la suspensión de HP- β -CD/HPMC y se agitó con vórtex durante 1 minuto para producir una suspensión de HP- β -CD/HPMC/M₄N. Se congeló la suspensión de HP- β -CD/HPMC/M₄N a -20°C durante 24 horas. Entonces se centrifugó la suspensión de HP- β -CD/HPMC/M₄N a 1.400 rpm a vacío a 60°C durante aproximadamente 5 horas para eliminar todo el agua de la suspensión. El polvo 25 seco del complejo de HP- β -CD/HPMC/M₄N pesaba aproximadamente 400 mg. Entonces puede disolverse o resuspenderse el complejo de polvo de HP- β -CD/HPMC/M₄N en agua u otros agentes de solubilización. Se almacenó el complejo de polvo de M₄N/HP- β -CD/HPMC final a temperatura ambiente y se mantuvo protegido de la luz. Puede aumentarse o disminuirse a escala este procedimiento para obtener el volumen o la concentración 30 requeridos de M₄N. Pueden prepararse de manera similar formulaciones que contienen M₄N con otras disoluciones de ciclodextrinas/celulosa, tal como, por ejemplo, sustituyendo HP- β -CD en el procedimiento descrito anteriormente por otras ciclodextrinas, o sustituyendo HPMC por otras celulosas modificadas. Los resultados mostrados en la tabla 18 demuestran que se obtuvo un complejo de polvo de HP- β -CD/HPMC/M₄N tras la liofilización de la suspensión de HP- β -CD/HPMC/M₄N que consistía aproximadamente en el 84% de HP- β -CD, el 1% de HPMC y el 15% de M₄N.

35 Datos comparativos del ejemplo 10. Pruebas de los tubos i.v. para la administración de M₄N

En este experimento, se sometieron a prueba diversos tipos de tubos para determinar la compatibilidad y para optimizar la administración intravenosa de M₄N. Las pruebas de compatibilidad estaban basadas en inspección visual y análisis de HPLC (cromatografía de líquidos a alta presión).

40 La inspección visual se realizó tal como sigue: Se hicieron pasar aproximadamente 5 ml de una formulación que iba a someterse a prueba ("material formulado") a través de un tubo de aproximadamente 20 cm de longitud. Se mantuvo el material formulado dentro del tubo durante aproximadamente 24 h a temperatura ambiente (25°C). Entonces se hizo circular el material formulado varias veces (aproximadamente 5 veces, por ejemplo) a través del tubo y se recogió en un vaso de precipitados o un tubo de recogida. Se inspeccionó cuidadosamente el material formulado para detectar material precipitado o particulado presente, incluyendo sostener el vaso de precipitados o 45 tubo de recogida contra un fondo blanco seguido por un fondo oscuro.

La prueba de compatibilidad usando análisis de HPLC varió en la metodología dependiendo del tubo que estaba sometido a prueba, la duración de tiempo y el fin del tubo. Esta prueba midió la cantidad de M₄N en disolución antes y después de la circulación a través de tubos diferentes.

5 El umbral para determinar la compatibilidad era una pureza de ensayo del 90%, lo que significa que si aproximadamente el 90% del M₄N permanecía en disolución tras la interacción con el tubo y completarse la prueba, se consideraría que el material es compatible. Se consideró que cualquier cantidad por debajo del umbral del 90% eran tubos incompatibles. Los resultados se resumen en la tabla 23.

10 Este estudio muestra que PTFE (politetrafluoroetileno) y fluoroelastómero (Barnant Company, Barrington, IL, EE.UU.), polipropileno (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EE.UU.), FEP (propileno-etileno fluorado) (Saint-Gobain, Mickleton, NJ, EE.UU.), PTFE (Cole-Parmer), polietileno (Intramedic, Becton Dickinson, Sparks, MD, EE.UU.) y silicona curada con platino (de tamaño pequeño) (Cole-Parmer) eran todos compatibles para la administración de M₄N en las formulaciones descritas en el presente documento.

Tabla 23. Materiales para tubos compatibles para la administración de M₄N

TUBOS COMPATIBLES			
TIPO DE TUBO	NOMBRE COMERCIAL	FABRICANTE DEL TUBO	N.º DE CAT.
PTFE y fluoroelastómero	CHEM-SURE	Barnant Company	96210-16
Polipropileno		Cole-Parmer	06500-02
FEP		Saint-Gobain	P288605
PTFE		Cole-Parmer	06417-31
Polietileno	Intramedic	BD	427420
Silicona curada con platino (de tamaño pequeño)**		Cole-Parmer	95802-01
TUBOS NO COMPATIBLES			
TIPO DE TUBO	NOMBRE COMERCIAL	FABRICANTE DEL TUBO	N.º DE CAT.
Silicona curada con platino (de fabricación)		Cole-Parmer	
Caucho termoconformado Viton B (flúor al 67%)	Viton		
Material a base de polipropileno con aceite mineral USP	PharMed		
Poliuretano		Cole-Parmer	96140-42
Copolímero de bloque modificado de estireno-etileno-butileno con aceite de silicona	C-Flex		
PVC (DEHP en la vía)	180	Nalgene	8000-0002
PVC (libre de ftalato)	580	Nalgene	8008-0004

** no preferida pero en cierto modo compatible

15 Ejemplo 11. Estudios adicionales de administración intravesicular de la composición farmacéutica

20 Puede administrarse una o más de las composiciones farmacéuticas anteriores por vía intravesicular, tal como para el tratamiento de carcinoma *in situ* de la vejiga urinaria, por ejemplo, a una dosis de 800 mg cada semana durante 6 semanas. La composición contendrá un API, tal como los compuestos de NDGA, por ejemplo, M₄N. El API, tal como M₄N, está presente en la composición a 200 mg por vial de 5 ml, y se almacena en el frigorífico a 2°C - 8°C (36°F - 46°F). Antes de la administración de la composición a un sujeto, se retira el vial del frigorífico y se permite que se caliente hasta temperatura ambiente sin calentar. La composición puede diluirse añadiendo 800 mg (20 ml) a 55 ml de inyección de solución salina normal al 0,9%, USP. El lavado de la vejiga se realiza mediante la administración intravesicular del API (volumen total de 75 ml cuando se diluye como anteriormente), permitiendo que el API permanezca durante 2 horas, y después se evacúe. Se usan los tubos compatibles apropiados, tal como se describió anteriormente.

25

Se aconseja a los médicos o pacientes no administrar la composición que contiene el API si la vejiga está dañada, inflamada o perforada, ya que se producirá la absorción sistémica mediante pérdida de la integridad de la mucosa. El compuesto debe usarse con precaución en pacientes con síntomas de vejiga irritable graves, ya que el API puede provocar síntomas de vejiga irritable durante la instilación y el tiempo de permanencia. Se enseña a los pacientes

que la orina puede ser rojiza o rosada durante aproximadamente 24 h.

Ejemplo 12. Estudios adicionales de un estudio farmacocinético de microdosis cruzado triple en seres humanos de fase 0, de M₄N marcado con ¹⁴C en ocho sujetos varones sanos

5 Se diseñó este estudio para evaluar la absorción de M₄N cuando se administró a seres humanos como dosis subterapéutica o bien como dosis oral individual en condiciones con alimentación y de ayuno o bien una dosis intravenosa individual (régimenes A - C, respectivamente, en la tabla 24). El estudio era un diseño de estudio cruzado triple en una población objetivo de sujetos varones sanos y consistió en tres periodos de estudio de aproximadamente 35 horas de duración, cada uno separada por un periodo mínimo de al menos 7 días entre dosificación. Durante el transcurso de cada periodo de estudio, se tomaron muestras de sangre para farmacocinética en puntos de tiempo especificados tras la dosificación y se recogió orina a lo largo de intervalos de tiempo predefinidos. Los sujetos pudieron abandonar la unidad clínica tras completarse los procedimientos específicos del estudio a las 24 horas tras la dosis.

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

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

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

^a Mediana

Régimen A: 100 µg de M₄N marcado con ¹⁴C (3,3 kBq) administrados como dosis oral individual tras un desayuno con alto contenido en grasa.

30 Régimen B: 100 µg de M₄N marcado con ¹⁴C (3,3 kBq) administrados como dosis oral individual tras ayuno durante la noche.

Régimen C: 100 µg de M₄N marcado con ¹⁴C (3,3 kBq) administrados como 1 ml de disolución intravenosa en bolo tras un ayuno durante la noche.

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

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

45

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

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

10 Ejemplo 13. Estudios adicionales de solubilidad de M₄N en disolventes orgánicos solubles en agua

15 Se evaluó la solubilidad de M₄N en combinaciones de disolventes orgánicos solubles en agua tal como se indica en la tabla 25 hasta 48 horas. Tras 2, 24 y 48 horas de incubación a temperatura ambiente se analizaron las muestras mediante HPLC de fase inversa ("RP-HPLC") para cuantificar la solubilidad de M₄N. Para preparar muestras de M₄N, se colocaron 200 µl de M₄N 100 mg/ml disuelto en acetona en microtubos de polipropileno de 1,5 ml. Se permitió que se evaporara el disolvente a temperatura ambiente durante 48 horas hasta que las muestras estaban completamente secas.

20 Se prepararon las formulaciones con disolvente orgánico miscible en agua en tubos de centrifuga de polipropileno de 15 ml. Se prepararon 10 ml de cada formulación. Se añadió cada disolvente en base al peso usando su densidad respectiva a 25°C. Tras mezclado breve, se filtró cada formulación a través de un filtro de acetato de celulosa libre de tensioactivo ("SFCA") de 0,45 µm en un tubo nuevo de 15 ml. Se mantuvieron las formulaciones a temperatura ambiente hasta que estuvieron listas para usarse.

25 Se añadieron 400 µl de cada combinación de formulación (tabla 25, en la que Benz = alcohol bencílico; Crem = Cremophor® EL; DMA = dimetilacetamida; T80 = Tween® 80) al microtubo, permitiendo una solubilidad máxima de M₄N 50 mg/ml. Se evaluó la solubilidad de M₄N mediante RP-HPLC a 2, 24 y 48 horas de incubación a temperatura ambiente. En cada punto de tiempo, se centrifugaron las muestras durante 2 minutos a 13.000 rpm para sedimentar cualquier cantidad de M₄N sólido. Tal como se indica en la tabla 25, más de la mitad de las condiciones de formulación examinadas pudieron solubilizar M₄N hasta una concentración de más de 10 mg/ml. La solubilidad de M₄N en glicerol a 2 y 48 horas no pudo detectarse.

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

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

El 18% de EtOH, el 30% de PG, el 40% de Crem, el 10% de T80, el 2% de Benz	8,64	11,78	11,86
El 14% de EtOH, el 30% de PG, el 40% de PEG300, el 10% de T80, el 6% de DMA	9,40	10,55	11,30
El 14% de EtOH, el 30% de PG, el 40% de glic., el 10% de T80, el 6% de DMA	0,85	1,24	1,48
El 14% de EtOH, el 30% de PG, el 40% de Crem, el 10% de T80, el 6% de DMA	9,03	12,08	12,28
El 28% de EtOH, el 30% de PG, el 30% de PEG300, el 10% de T80, el 2% de Benz	8,87	10,19	10,27
El 28% de EtOH, el 30% de PG, el 30% de glic., el 10% de T80, el 2% de Benz	1,86	2,22	2,53
El 28% de EtOH, el 30% de PG, el 30% de Crem, el 10% de T80, el 2% de Benz	8,98	11,35	11,28
El 24% de EtOH, el 30% de PG, el 30% de PEG300, el 10% de T80, el 6% de DMA	9,91	10,80	10,67
El 24% de EtOH, el 30% de PG, el 30% de glic., el 10% de T80, el 6% de DMA	1,63	2,26	2,52
El 24% de EtOH, el 30% de PG, el 30% de Crem, el 10% de T80, el 6% de DMA	10,42	11,25	12,48

Datos comparativos del ejemplo 14. Solubilidad de M₄N en disoluciones acuosas

Se evaluó la solubilidad de M₄N en disoluciones acuosas que contenían o bien hidroxipropil HP-β-CD o bien sulfobutil éter-β-ciclodextrina (SE-β-CD) (Captisol®, CyDex, Inc., Lenexa, KS, EE.UU.) hasta 48 horas a temperatura ambiente descritas anteriormente en el ejemplo 13. Se prepararon diez disoluciones al 50% de HP-β-CD y SE-β-CD en una base de peso con respecto a volumen. Se preparó el M₄N para su uso en las muestras tal como se expone en el ejemplo 13. Se pesaron entre 1,0 g y 5,0 g de cualquier compuesto en un matraz volumétrico de 10 ml en una balanza Analytical Plus de OHAUS. Se añadió cantidad suficiente de agua para inyección (WFI) a cada muestra hasta 10 ml. Tras una incubación de una 1 hora a 40°C, se filtraron las preparaciones a través de un filtro de SFCA de 0,45 μm en un tubo de 15 ml nuevo. Se mantuvieron las preparaciones a temperatura ambiente hasta que estuvieron listas para su uso.

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

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

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

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

Datos comparativos del ejemplo 15. Solubilidad de M₄N en hidroxipropil β-ciclodextrina

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

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

estequiometría (así como las constantes de estabilidad) no se estudió en los experimentos de este ejemplo, aunque pudo determinarse mediante otros medios tales como RMN o potenciometría.

Ejemplo 16. Estabilidad de M₄N en disoluciones tampón de HP-β-CD/PEG 300

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

10 Se prepararon disoluciones tamponadas de HP-β-CD al 40% en una base en peso con respecto al volumen. Se preparó el M₄N para su uso en las muestras tal como se expone en el ejemplo 13. Se pesaron 2,0 g de HP-β-CD en matraces volumétricos de 5 ml en una balanza Analytical Plus de OHAUS. Se añadió 1 ml de una disolución tampón 100 mM a cada matraz. Se añadió cantidad suficiente de WFI a cada muestra hasta 5 ml. Tras una incubación de 1 hora a 40°C, se filtraron las preparaciones a través de un filtro de SFCA de 0,45 μm en un tubo de 15 ml nuevo. Se mantuvieron las preparaciones a temperatura ambiente hasta que estuvieron listas para su uso.

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

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

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

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

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

Ejemplo 17 – Estabilidad de M₄N en disoluciones de PEG300/HP-β-CD 11-14 mg/ml

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

35 Se solubilizó fármaco a granel M₄N hasta concentraciones de 33, 44, 48, 52, 55 y 56 mg/ml (p/p) en PEG 300 usando el procedimiento expuesto en los ejemplos 13 y 16, tras la incubación de al menos 2 horas a 60°C. Fueron necesarias agitación con vórtex vigorosa y mezclado para la solubilización completa de M₄N por encima de 44 mg/ml. Se filtraron las disoluciones madre de M₄N a través de un filtro de SFCA de 0,45 μm y se usaron en el plazo de 30 minutos desde la preparación. Por separado, se preparó una disolución de HP-β-CD al 40% (p/v) en WFI estéril y se filtró. Se combinaron combinaciones de la disolución madre de HP-β-CD al 40% y las disoluciones madre de M₄N/PEG 300 en microtubos de polipropileno de 1,5 ml. Se evaluó la solubilidad de M₄N mediante RP-HPLC a 2 y 24 horas de incubación a temperatura ambiente.

Se añadió la cantidad requerida de disolución madre de M₄N a HP-β-CD al 40% para proporcionar las

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

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

Composición	mg/ml de M ₄ N observados	
	t = 2 horas	t = 24 horas
M ₄ N 11 mg/ml, PEG 300 al 25%, HP-β-CD al 30%	11,3	11,3
M ₄ N 12 mg/ml, PEG 300 al 25%, HP-β-CD al 30%	11,8	11,6
M ₄ N 13 mg/ml, PEG 300 al 25%, HP-β-CD al 30%	12,7	12,7
M ₄ N 14 mg/ml, PEG 300 al 25%, HP-β-CD al 30%	13,5	13,5
M ₄ N 11 mg/ml, PEG 300 al 33%, HP-β-CD al 27%	11,4	11,3
M ₄ N 11 mg/ml, PEG 300 al 20%, HP-β-CD al 32%	11,5	11,4

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

Datos comparativos del ejemplo 18. Estabilidad de M₄N 40 mg/ml/PEG300

10 Se evaluó la estabilidad de M₄N 40 mg/ml disuelto en PEG 300 al 100% hasta 24 horas de incubación a 30°C, 45°C y 60°C. Se preparó una disolución madre de M₄N 40 mg/ml en PEG 300 a 60°C, siguiendo el procedimiento expuesto en el ejemplo 17. Posteriormente, se retiraron alícuotas y se incubaron a la temperatura apropiada. Se hicieron rotar las muestras a 450 rpm durante todo el transcurso de la incubación. Se recogieron observaciones visuales y datos de RP-HPLC todo el tiempo. Tal como se muestra en la tabla 29, tras 6 horas de incubación a 30°C se observaron pequeños cristales en la formulación de M₄N 40 mg/ml/PEG 300, apareciendo más tras 24 horas. La formación de cristales coincidió con una pérdida de M₄N soluble (tabla 30). Las muestras de M₄N 40 mg/ml/PEG 300 incubadas a 45°C y 60°C eran estables tras 24 horas de incubación tal como se evaluó mediante observaciones visuales y análisis de RP-HPLC (tablas 29 y 30). No se observaron cambios en la cantidad o los tipos de picos de impurezas a ninguna de las temperaturas de incubación.

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

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

20 Tabla 30. Muestras de estabilidad de M₄N 40 mg/ml/PEG 300: análisis de RP-HPLC

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Composición para la inyección en animales que comprende un principio activo farmacéutico y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que el principio activo farmacéutico comprende tetra-O-metil-NDGA y el portador comprende una ciclodextrina y polietilenglicol, el polietilenglicol está presente en ausencia de ácido ascórbico o hidroxitolueno butilado, y cuando el polietilenglicol es polietilenglicol 400, el polietilenglicol 400 está presente en ausencia de polietilenglicol 8000.
2. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición puede inyectarse por vía intravenosa en animales.
3. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende de 0,1 mg a 200 mg del principio activo farmacéutico.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que la composición comprende 10 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 75 mg, 100 mg o 200 mg del agente farmacéutico activo.
5. Composición según la reivindicación 1, en la que el principio activo farmacéutico está presente a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml.
6. Composición según la reivindicación 5, en la que el tetra-O-metil-NDGA está presente a una concentración de 1 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 12,5 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 125 mg/ml, 150 mg/ml o 175 mg/ml.
7. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol es PEG 300, PEG 400 o monolaurato de PEG.
8. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol está presente a una concentración del 5% (v/v) al 100% (v/v).
9. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol es PEG 300.
10. Composición según la reivindicación 9, en la que el PEG 300 está presente a una concentración del 10% (v/v), el 20% (v/v), el 30% (v/v), el 40% (v/v) o el 50% (v/v).
11. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol es PEG 400.
12. Composición según la reivindicación 11, en la que el PEG 400 está presente a una concentración del 10% (v/v), el 20% (v/v), el 30% (v/v), el 40% (v/v) o el 50% (v/v).
13. Composición según la reivindicación 1, en la que el polietilenglicol es monolaurato de PEG 400.
14. Composición según la reivindicación 13, en la que el monolaurato de PEG 400 está presente a una concentración del 20% (v/v) al 50% (v/v).
15. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende una ciclodextrina no modificada o una ciclodextrina modificada.
16. Composición según la reivindicación 15, en la que la ciclodextrina modificada se selecciona del grupo que consiste en hidroxipropil- β -ciclodextrina y sulfobutil éter- β -ciclodextrina.
17. Composición según la reivindicación 15, en la que la ciclodextrina modificada está presente a una concentración del 5% (p/v) al 80% (p/v).
18. Composición según la reivindicación 17, en la que la ciclodextrina modificada está presente a una concentración del 15% (p/v), el 20% (p/v), el 25% (p/v), el 30% (p/v), el 35% (p/v), el 40% (p/v) o el 50% (p/v).
19. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende propilenglicol.
20. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende glicerol.
21. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en polisorbato, succinato de d-alfa-tocoferil-polietilenglicol 1000 y el producto de reacción de óxido de etileno y aceite de ricino en una razón molar de 35:1.
22. Composición según la reivindicación 21, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 y polisorbato 80.

23. Composición según la reivindicación 21, en la que el tensioactivo está presente a una concentración del 5% (v/v) al 100% (v/v).
24. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende una celulosa modificada.
- 5 25. Composición según la reivindicación 24, en la que la celulosa modificada se selecciona del grupo que consiste en etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa.
26. Composición según la reivindicación 24, en la que la celulosa modificada está presente a una concentración del 0,1% (p/v) al 10% (p/v).
27. Composición según la reivindicación 1, en la que el portador comprende un lípido insoluble en agua.
- 10 28. Composición según la reivindicación 27, en la que el lípido insoluble en agua comprende una emulsión de grasa.
29. Composición según la reivindicación 28, en la que la emulsión de grasa está presente a una concentración del 10% (p/v) al 30% (p/v).
30. Composición según la reivindicación 29, en la que la emulsión de grasa está presente a una concentración del 20% (p/v).
- 15 31. Composición según la reivindicación 27, en la que el lípido insoluble en agua es un aceite.
32. Composición según la reivindicación 26, en la que el aceite es al menos un aceite seleccionado del grupo que consiste en aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de menta, aceite de soja, aceite de semilla de sésamo, aceite mineral y glicerol.
33. Composición según la reivindicación 27, en la que el lípido insoluble en agua es un ácido graso esterificado.
- 20 34. Composición según la reivindicación 1 para su uso como medicamento.
35. Composición según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa, hipertensión, obesidad, diabetes, una enfermedad del sistema nervioso central, una enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, demencia, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, accidente cerebrovascular, una enfermedad inflamatoria, neoplasia premaligna, displasia o una infección.
- 25 36. Composición para su uso según la reivindicación 35, en la que la composición se administra por vía parenteral.
37. Composición para su uso según la reivindicación 36, en la que la composición se administra por una vía seleccionada del grupo que consiste en por vía intravenosa, por vía intraarterial y por vía intraperitoneal.
- 30 38. Composición para su uso según la reivindicación 36, en la que la composición se administra por vía intravenosa.
39. Composición para su uso según la reivindicación 35, en la que la enfermedad proliferativa es cáncer o psoriasis.
- 35 40. Composición para su uso según la reivindicación 35, en la que la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y esclerosis múltiple.
41. Composición para su uso según la reivindicación 35, en la que la enfermedad es una neoplasia intraepitelial.
42. Composición para su uso según la reivindicación 35, en la que la infección es una infección viral.
- 40 43. Composición para su uso según la reivindicación 42, en la que el virus se selecciona del grupo que consiste en VIH, VLTH, VPH, VHS, VHB, VEB, virus de la varicela-zóster, adenovirus, parvovirus y virus JC.
44. Composición para su uso según la reivindicación 35, en la que la composición se administra a una dosis de 10 mg de principio activo farmacéutico por kg de peso del sujeto a 600 mg de principio activo farmacéutico por kg de peso del sujeto.
- 45 45. Composición para su uso según la reivindicación 35, en la que la composición se administra una o más veces a la semana.

46. Composición para su uso según la reivindicación 35, en la que la composición se administra una o más veces al mes.
47. Kit que comprende la composición según la reivindicación 1 e instrucciones para el uso del mismo.

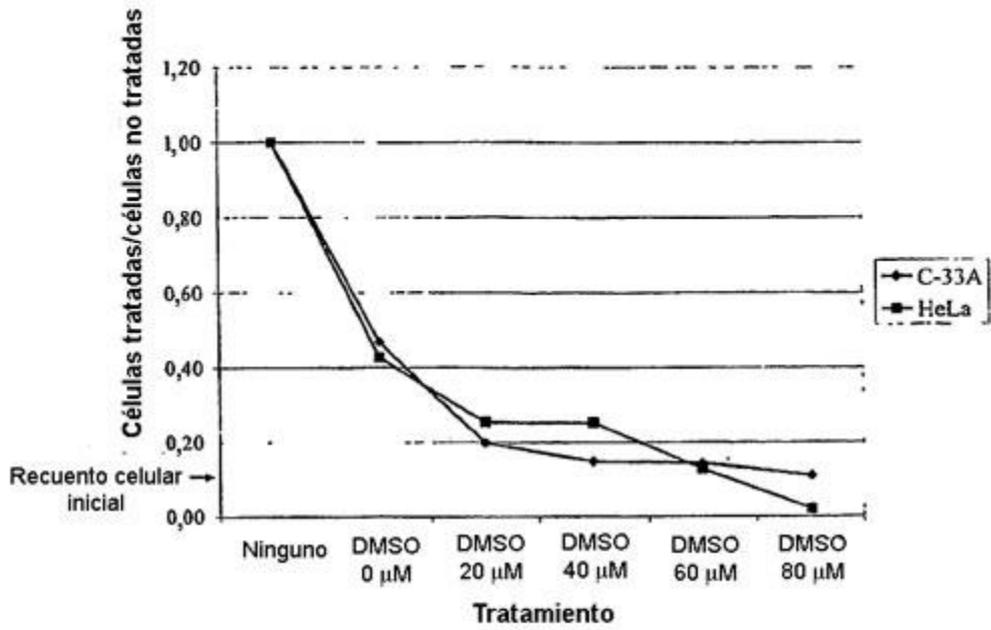


FIG. 1A

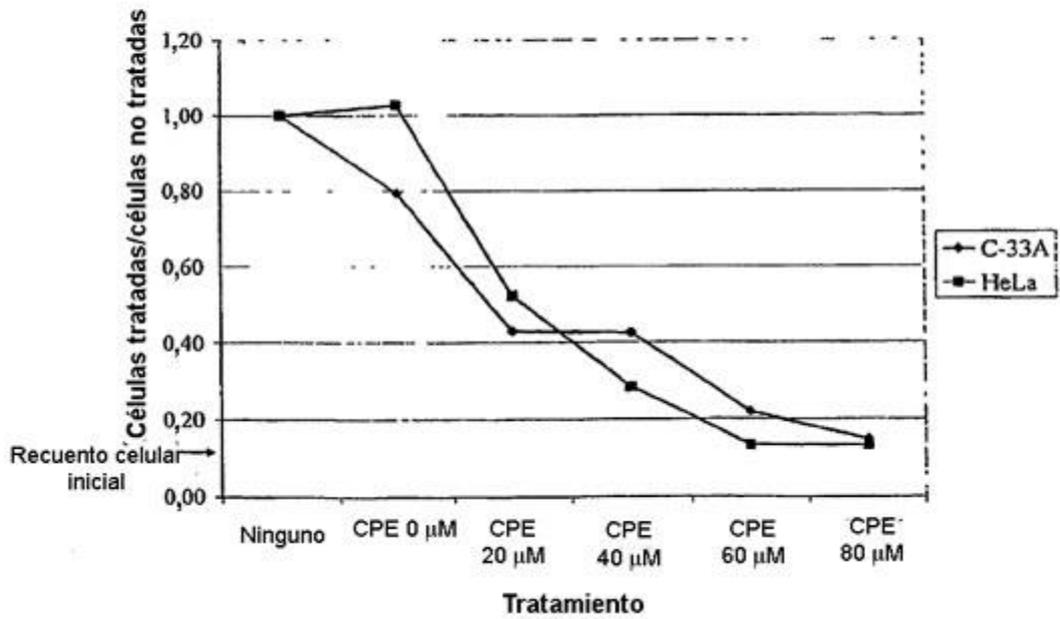


FIG. 1B

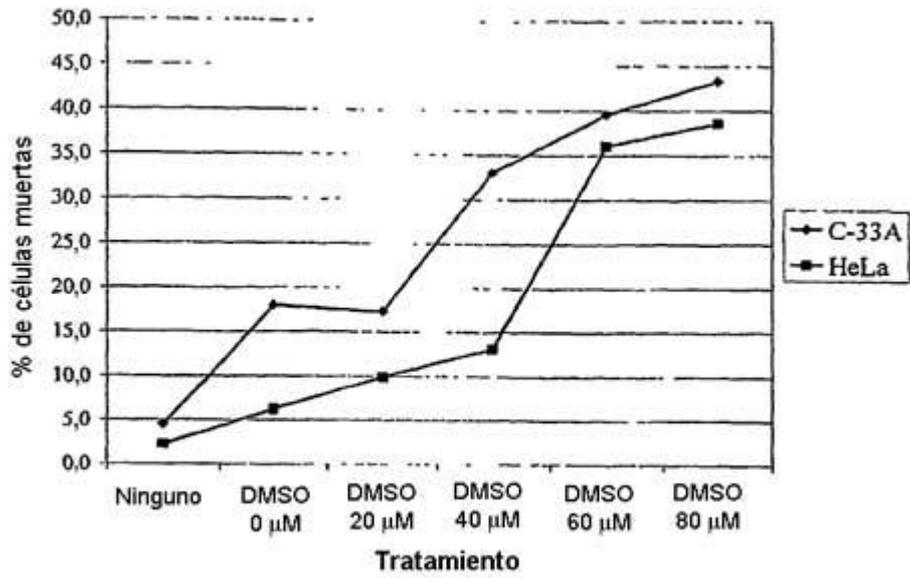


FIG. 2A

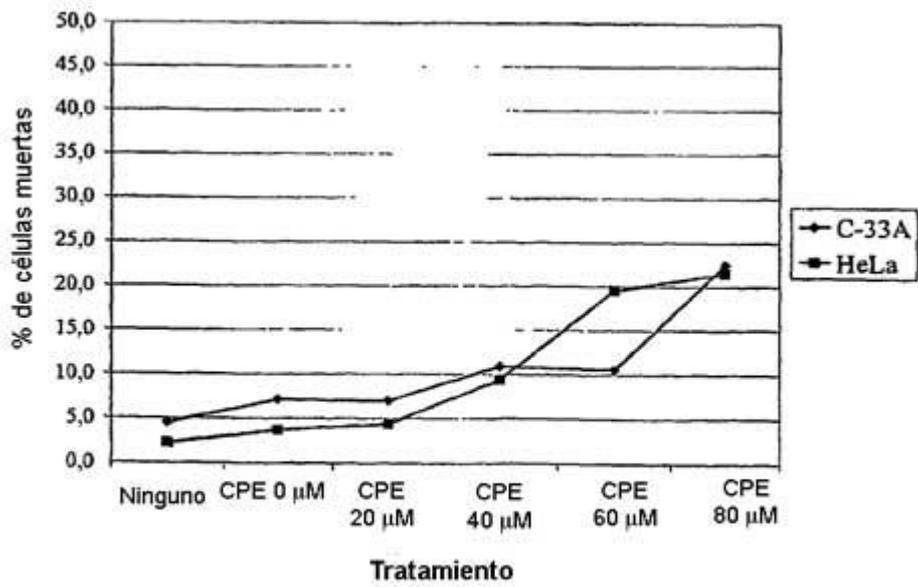


FIG. 2B

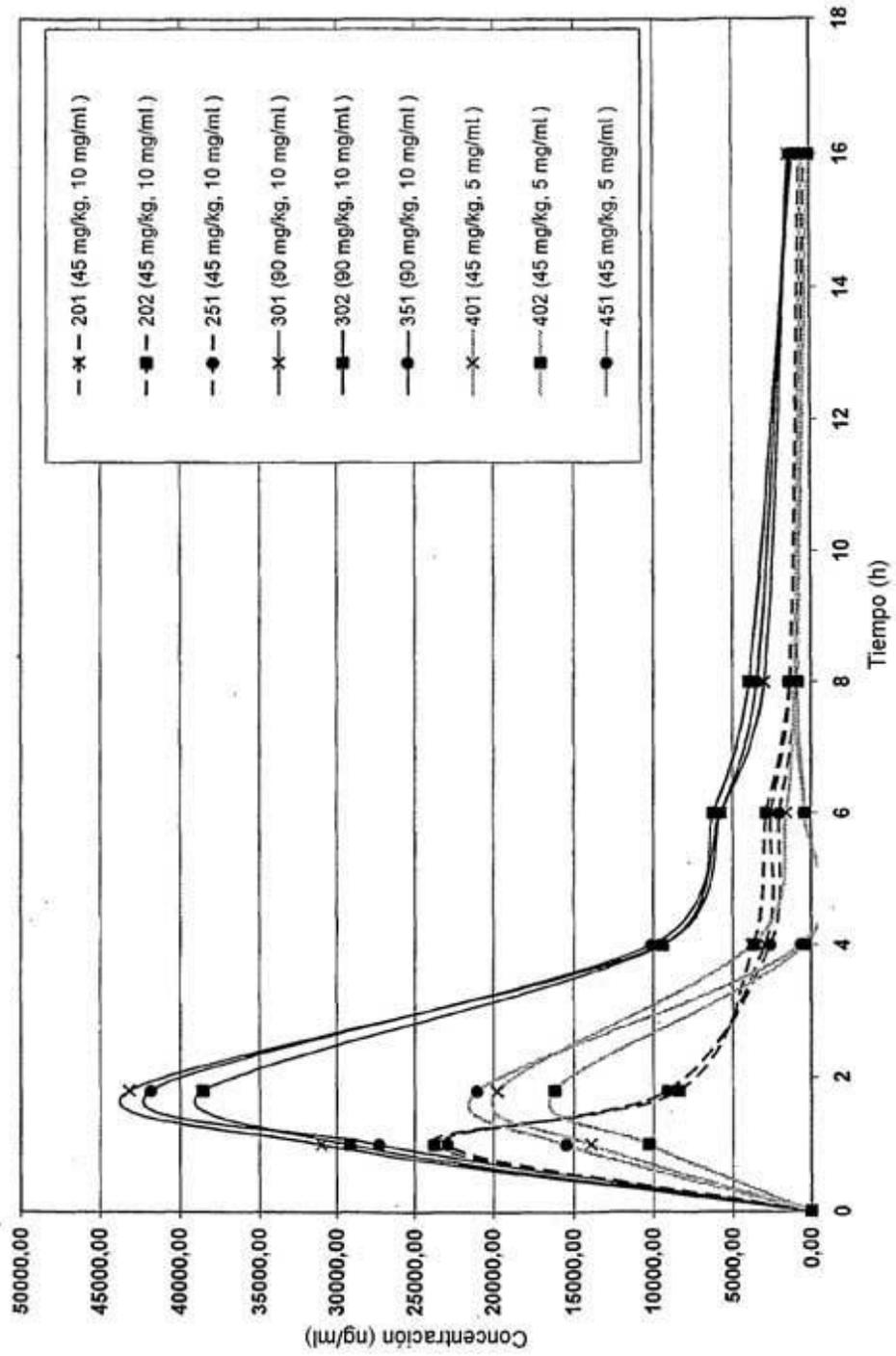


FIG. 3A

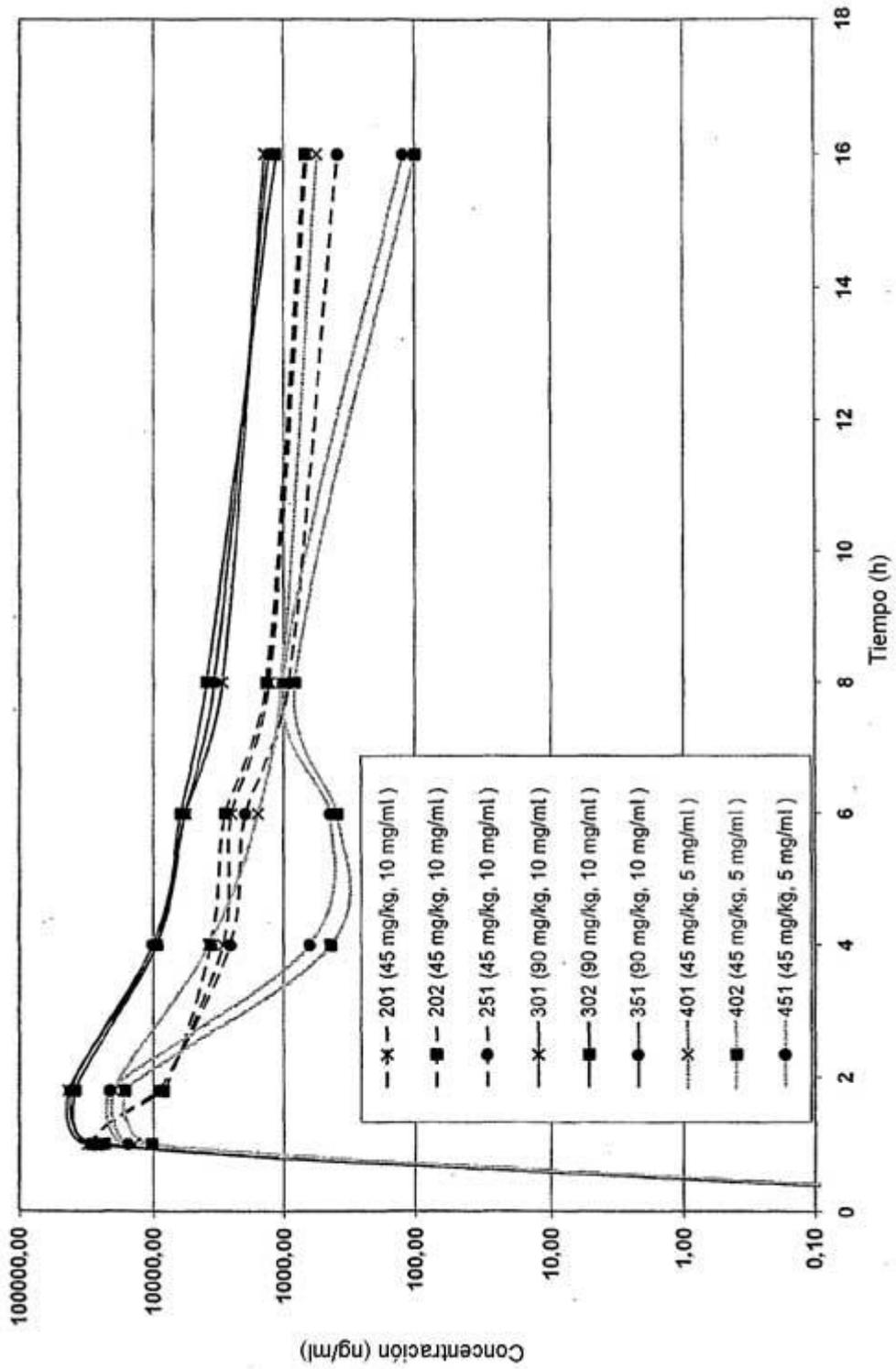


FIG. 3B