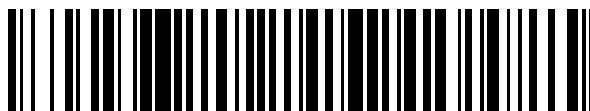


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 153**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01)
A61K 31/4174 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2012** **PCT/US2012/049463**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013** **WO13020021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012** **E 12819309 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016** **EP 2739266**

54 Título: **Soluciones antiinflamatorias estables para inyección**

30 Prioridad:

04.08.2011 US 201161515234 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2017

73 Titular/es:

OMEROS CORPORATION (100.0%)
201 Elliott Avenue West
Seattle, WA 98119, US

72 Inventor/es:

DEMOPULOS, GREGORY, A.;
GOMBOTZ, WAYNE, R. y
SHEN, HUI-RONG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 600 153 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

Soluciones antiinflamatorias estables para inyección

I. Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas líquidas estables de cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina para inyección.

II. Antecedentes de la invención

Los agentes farmacéuticos a veces se administran directamente en un sitio localizado de inflamación o en un sitio en el que el traumatismo probablemente dará como resultado la inflamación. La administración de agentes farmacéuticos se puede dar por medio de inyección u otros medios. Por ejemplo, los agentes farmacéuticos se pueden administrar durante procedimientos artroscópicos. La artroscopia es un procedimiento quirúrgico en el que una cámara, conectada a una fuente de luz remota y a un monitor de video, se inserta en una articulación anatómica (p.ej., rodilla, hombro, etc.) a través de una pequeña incisión de portal en la piel que la recubre y la cápsula articular. A lo largo de cada artroscopia, se hace pasar continuamente fluido fisiológico de irrigación (p.ej., solución salina normal, Ringer con lactato o glicina) a través de la articulación, lo que distiende la cápsula articular y elimina los residuos operatorios, por lo que se proporciona una visualización intraarticular más clara.

La irrigación también se usa en otros procedimientos, tales como procedimientos de diagnóstico y terapéuticos cardiovasculares y vasculares en general, procedimientos urológicos y en el tratamiento de quemaduras y heridas operatorias. En cada caso, se usa un fluido fisiológico para irrigar una herida o cavidad o conducto corporal. Los fluidos fisiológicos de irrigación convencionales no proporcionan efectos analgésicos o antiinflamatorios.

Los fluidos fisiológicos de irrigación convencionales no se usan para administrar agentes terapéuticos a un paciente. Sin embargo, se han usado soluciones de irrigación diluidas para administrar agentes terapéuticos directamente en un sitio quirúrgico durante un procedimiento quirúrgico. Véanse, p.ej., las pub. de patentes PCT internacionales WO96/19.233 A2, WO97/21.445 A1 y WO00/23.066 A2, las pub. de pat. de EE.UU. 20030096807 A1, 20030087962A1 y 200320090253795 A1, y las patentes de EE.UU. n°s 5.860.950, 6.645.168 y 7.973.068, cada una de Demopoulos et al. Una combinación de tres fármacos, cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina, en una solución diluida en un vehículo fisiológico, con cada agente farmacológico presente en la solución de irrigación a una concentración de como máximo 100.000 nanomolar, se describe en la patente de EE.UU. 7.973.068.

Se ha demostrado que esta combinación de fármacos (cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina) mejora la función postoperatoria al administrarla directamente en una articulación de rodilla en una solución de irrigación diluida perfundida a través de la articulación durante la cirugía artroscópica. Se perfundió una solución que incluía cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina a concentraciones de 4,55 µg/mL, 1,50 µg/mL, y 1,42 µg/mL, respectivamente, en un vehículo de irrigación a través de la articulación durante la cirugía artroscópica. Los pacientes que recibieron la combinación de tres fármacos durante la cirugía artroscópica de reconstrucción del ligamento cruzado anterior mostraron mejoras postoperatorias significativas en la función de la rodilla, el rango de movimiento y la reducción del dolor en comparación con los pacientes que recibieron el vehículo de irrigación no medicado solamente. Fanton *et al.*, *Arthroscopy* 24:625-636 (2008). Los pacientes que recibieron la misma combinación de tres fármacos en una solución de irrigación diluida perfundida a través de la articulación de rodilla durante una cirugía de menisectomía parcial mostraron mejoras estadísticamente significativas con respecto al vehículo de irrigación, tal como se mide mediante las puntuaciones funcionales informadas por los pacientes con el uso de la puntuación de resultados en la lesión de rodilla y la osteoartritis (KOOS), la flexión pasiva de la rodilla y el dolor determinado mediante puntuaciones de la escala analógica visual. Los resultados informados por los pacientes que miden los síntomas, el dolor, las actividades de la vida diaria, el deporte y las actividades recreativas y la calidad de vida asociadas a la rodilla operada mostraron un beneficio sostenido hasta el Día 90 postoperatorio. Garrett *et al.*, *Arthroscopy* 27:1060-1070 (2011). La solución administrada en estos estudios se formuló como un producto liofilizado. La combinación de fármacos liofilizada se reconstituyó después en solución de Ringer con lactato y se inyectó en una bolsa de fluido de irrigación antes de la administración a los pacientes en esta forma muy diluida a lo largo de la cirugía artroscópica. Al final del procedimiento quirúrgico, se administraron 30 mL de esta solución de irrigación en la rodilla mediante inyección intraarticular a través de un sitio de portal previamente cerrado, administrando una pequeña cantidad adicional de cetoprofeno (137 µg), amitriptilina (45 µg) y oximetazolina (43 µg) para proporcionar una inhibición continuada de la respuesta inflamatoria en el sitio quirúrgico.

Los agentes terapéuticos se pueden administrar también directamente en un sitio anatómico local deseado mediante inyección. Por ejemplo, se han inyectado corticosteroides en tejido blando o articulaciones para tratar con éxito una diversidad de afecciones inflamatorias, p.ej., sinovitis, artritis, bursitis, tendinitis, síndrome del túnel carpiano, fascitis, quistes gangliónicos y neuromas. Salinas y Rosenberg, emedicine.medscape.com/article/325370-overview, (2009), visitado el 16 de septiembre de 2010. Sin embargo, la inyección local de corticosteroides en las articulaciones se ha asociado con el daño del cartílago, y por lo tanto muchos médicos limitan el número de tales inyecciones. Véase, p.ej., Shapiro, The Effect of Local Corticosteroid or Ketorolac Exposure on Histologic and Biomechanical Properties of Rabbit Tendon and Cartilage, *Hand*, 2(4): 165-172 (2007), que concluye que el uso de un agente antiinflamatorio

no esteroideo inyectable puede plantear una amenaza menor a los tejidos locales tras la administración intraarticular y peritendinosa.

La irrigación quirúrgica y la inyección directa en una articulación se llevan a cabo en general con formulaciones líquidas de agentes farmacéuticos. La combinación de tres fármacos administrada por Fanton et al. y Garrett et al., es decir, cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina, se solubilizó en fluido de irrigación a partir de un estado liofilizado. Aunque estos tres fármacos han demostrado beneficios terapéuticos, también tienen características que hacen que el diseño de una formulación de fármacos estable y rentable suponga un desafío, en particular una formulación líquida estable. Por ejemplo, el cetoprofeno es mínimamente soluble en solución acuosa y es más soluble por encima de un pH de 6,0. Durante la fabricación, el cetoprofeno es difícil de humedecer y disolver en medios acuosos, incluso en presencia de arginina y lisina para formar una sal de cetoprofeno. La amitriptilina HCl es químicamente inestable en general en solución acuosa, y es menos estable cuando se almacena por encima de un pH de 6,0. Además, la amitriptilina también exhibe una inestabilidad física formando partículas micelares, por lo que sufre una disminución de la concentración en ciertas condiciones (véase la patente EP adjunta nº 0 431 663 B1). La mayoría de fármacos formulados en soluciones son menos estables que los fármacos formulados en un estado liofilizado o seco, en particular cuando la solución es una solución acuosa en la que los fármacos son más susceptibles a las reacciones de degradación química, tales como la hidrólisis y la oxidación. La presente invención resuelve estos y otros problemas.

III. Sumario de la invención

La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas líquidas de cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina que son estables durante al menos seis meses cuando se almacenan en un intervalo de 2°C a 30°C. El cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina también son solubles en estas formulaciones. Las formulaciones incluyen un 1-99% (v/v) de poliol, y 10-500 mM de citrato sódico (citrato Na) a un pH de 4,5-7,0. En una realización, las formulaciones farmacéuticas contienen 550 µM a 1 M de cetoprofeno, 55 µM a 1 M de amitriptilina, y 350 µM a 1 M de oximetazolina en solución líquida. En una realización de la invención, la formulación líquida es una solución acuosa.

En una realización, las formulaciones farmacéuticas contienen un 10-70% (v/v) de poliol. En otra realización, las formulaciones farmacéuticas contienen un 15-25% (v/v) de poliol. En una realización adicional, la formulación farmacéutica contiene un 20% (v/v) de poliol.

Un poliol preferido para el uso en la presente invención es polietilen glicol (PEG), p.ej., PEG 400. En una realización, las formulaciones farmacéuticas contienen un 10-70% (v/v) de PEG, p.ej., 10-70% (v/v) de PEG 400. En otra realización, las formulaciones farmacéuticas contienen un 15-25% (v/v) de PEG, p.ej., 15-25% (v/v) de PEG 400. En una realización adicional, la formulación farmacéutica contiene un 20% (v/v) de PEG, p.ej., 20% (v/v) de PEG 400.

En una realización de la invención, la formulación es una solución acuosa que incluye agua además de un poliol como medio líquido. En una realización, las formulaciones farmacéuticas contienen un 30-90% (v/v) de agua. En otra realización, las formulaciones farmacéuticas contienen un 75-85% (v/v) de agua. En una realización adicional, la formulación farmacéutica contiene un 80% (v/v) de agua.

En una realización de la invención, el pH de la formulación farmacéutica tiene un valor entre 5,0 y 6,2. En otra realización de la invención, el pH de la formulación farmacéutica tiene un valor entre 5,2 y 5,8. En una realización adicional de la invención, el pH de la formulación farmacéutica tiene un valor entre 5,4 y 5,6. En una realización preferida de la invención, el pH de la formulación farmacéutica es de alrededor de 5,5.

Las formulaciones farmacéuticas líquidas de la invención son muy estables. Por ejemplo, en una realización, el cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina son estables durante al menos doce meses cuando se almacenan en un intervalo de 2°C a 30°C. En otra realización, el cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina son estables durante al menos dieciocho meses cuando se almacenan en un intervalo de 2°C a 30°C. En otra realización, el cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina son estables durante al menos veinticuatro meses cuando se almacenan en un intervalo de 2°C a 30°C. En las realizaciones adicionales, el cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina son estables durante al menos treinta meses o durante al menos treinta y seis meses, o durante al menos cuarenta y ocho meses cuando se almacenan en un intervalo de 2°C a 30°C.

En una realización, las formulaciones farmacéuticas incluyen un 0,002-1,0% (p/v) de ácido etilendiamintetraacético disódico (EDTA Na₂). En otra realización, las formulaciones farmacéuticas incluyen un 0,01-0,5% (p/v) de EDTA Na₂. En una realización adicional, las formulaciones farmacéuticas incluyen un 0,05% (p/v) de EDTA Na₂.

En una realización, las formulaciones farmacéuticas incluyen alrededor de 50 mM de citrato sódico (Citrato Na).

En un aspecto, las formulaciones farmacéuticas se exponen a gas nitrógeno (N₂) antes del almacenamiento para aumentar la estabilidad. En un aspecto adicional, las formulaciones farmacéuticas se almacenan en la oscuridad, también para aumentar la estabilidad.

En un aspecto, las formulaciones farmacéuticas se preparan de una manera que prevé la dilución en una solución de

irrigación para el uso durante un procedimiento quirúrgico. En otro aspecto, la formulación farmacéutica se prepara para la inyección directa en un sitio localizado de inflamación, a una concentración que puede ser la misma que la usada tras la dilución en un vehículo de irrigación para la irrigación o que puede ser más concentrada, tal como la concentración de la formulación farmacéutica antes de la dilución. El sitio del tejido inflamado a tratar mediante la inyección local de acuerdo con la presente invención puede ser una articulación, una zona peritendinosa o periligamentosa, la fascia u otro tejido conectivo, músculo, u otro tejido. En una realización, el sitio localizado de inflamación es un tendón lesionado de manera aguda o una zona peritendinosa, ligamento o zona periligamentosa, tejido conectivo, músculo o articulación de una extremidad, tal como un tobillo, rodilla, cadera, muñeca, codo, hombro, o articulación temporomandibular, u otra articulación del cuerpo. En otra realización, el sitio localizado de inflamación es un sitio inflamado debido a una afección subaguda o crónica, tal como, por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, artrofibrosis, articulaciones rígidas, tenosinovitis flexora, fascitis plantar, bursitis, tendinitis, síndrome del túnel carpiano, quistes ganglionarios, dolor de espalda crónico y lesiones por estrés repetitivo o sobreutilización.

Un aspecto de la invención proporciona un método para prevenir o tratar la inflamación en un sitio anatómico que está inflamado o en riesgo de inflamación, inyectando en el sitio una composición que comprende los agentes antiinflamatorios cetoprofeno, amitriptilina y oximetazolina en un vehículo fisiológico, en ausencia de un procedimiento quirúrgico de forma que la composición se retiene en el sitio durante un periodo de tiempo suficiente, y en el que los agentes se inyectan en una cantidad suficiente para inhibir la inflamación en el sitio.

En un aspecto, las formulaciones farmacéuticas son parte de un kit que incluye instrucciones de uso. La formulación farmacéutica se puede envasar en una jeringa de dosis individual para la inyección directa en un sitio localizado de inflamación. De manera alternativa, la formulación farmacéutica se puede envasar en un vial, cartucho o ampolla.

En un aspecto, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas líquidas de cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina que son estables durante al menos seis meses cuando se almacenan a 2-30°C. Las formulaciones incluyen 0,1-1,0 g/L de cetoprofeno, 0,05-0,5 g/L de amitriptilina, 0,05-0,5 g/L de oximetazolina, 1-99% (v/v) de PEG 400, alrededor del 0,002-1,0% (p/v) de EDTA Na₂, y 10-500 mM de citrato Na, pH 5,0-6,2. El cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina son solubles en esta formulación líquida estable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas líquidas de cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina que son estables durante al menos seis meses cuando se almacenan a una temperatura de 2-30°C. Las formulaciones incluyen alrededor de 0,687 g/L de cetoprofeno, alrededor de 0,227 g/L de amitriptilina, alrededor de 0,215 g/L de oximetazolina, 20% (v/v) de PEG 400, alrededor del 0,05% (p/v) de EDTA Na₂, y alrededor de 50 mM de citrato Na, pH 5,0-6,2. El cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina son solubles en la formulación líquida.

IV. Descripción breve de los dibujos

La presente invención se describirá a continuación con más detalle, a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

Las Figuras 1A y 1B proporcionan las condiciones y los resultados de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en gradiente usada para cuantificar cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl y sus sustancias relacionadas. La Figura 1A proporciona el gradiente y los tampones de elución usados. La Figura 1B muestra un cromatograma y los picos representativos.

Las Figuras 2A y 2B proporcionan los resultados del almacenamiento de cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl en formulaciones farmacéuticas líquidas que contienen diferentes tampones. Las formulaciones y los tampones ensayados se proporcionan en la Figura 2A. La Figura 2B proporciona el porcentaje de sustancias relacionadas para cada componente farmacológico hallado tras el almacenamiento durante ochenta y cuatro días a 4°C, 25°C, 40°C o 60°C.

Las Figuras 3A y 3B proporcionan los resultados del almacenamiento de cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl en formulaciones farmacéuticas líquidas a diferentes valores de pH. Las formulaciones y los valores de pH ensayados se proporcionan en la Figura 3A. La Figura 3B proporciona el porcentaje de sustancias relacionadas para cada componente farmacológico hallado tras el almacenamiento durante ochenta y cuatro días a 4°C, 25°C, 40°C o 60°C.

Las Figuras 4A y 4B proporcionan los resultados de almacenar cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl en formulaciones farmacéuticas líquidas en presencia o ausencia de luz y con o sin una cubierta de N₂. Las formulaciones y las condiciones de llenado/almacenamiento se proporcionan en la Figura 4A. La Figura 4B proporciona el porcentaje de sustancias relacionadas para cada componente farmacológico hallado tras el almacenamiento durante veinticuatro días a 4°C, 25°C, 30°C o 40°C.

Las Figuras 5A y 5B proporcionan los resultados de almacenar cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl en formulaciones farmacéuticas líquidas en presencia o ausencia de EDTA Na₂. Las formulaciones y las concentraciones de EDTA Na₂ se proporcionan en la Figura 5A. La Figura 4B proporciona los porcentajes de

sustancias relacionadas para cada componente farmacológico hallado tras el almacenamiento durante treinta días a 4°C, 25°C, 30°C o 40°C.

Las Figuras 6A y 6B proporcionan los resultados de almacenar una formulación farmacéutica líquida que comprende cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl. Los resultados mostrados son las sustancias relacionadas para un lote representativo de la formulación farmacéutica de la presente invención. Los componentes de la formulación farmacéutica son alrededor de 50 mM de citrato Na, pH 5,5; 20% v/v de PEG 400, 0,05% p/v de EDTA Na₂, Cetoprofeno (0,687 mg/mL), Amitriptilina HCl (0,227 mg/mL), y Oximetazolina HCl (0,227 mg/mL). Se almacenaron alícuotas en viales durante al menos veinticuatro meses a 5°C y 25°C y durante hasta doce meses a 30°C y 40°C. Los viales se almacenaron en posición erguida o invertida.

La Figura 7 proporciona un análisis de las sustancias relacionadas totales en las formulaciones farmacéuticas líquidas con o sin EDTA Na₂. A las muestras se les aplicó una cubierta o inyección de N₂.

V. Descripción detallada

Introducción

La presente descripción proporciona por primera vez formulaciones farmacéuticas líquidas de cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina (los tres ingredientes farmacéuticos activos, o "IFAs") que son estables durante al menos seis meses cuando se almacenan entre 2°C y 30°C. En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas líquidas descritas son sorprendentemente estables durante periodos largos de tiempo, p.ej., uno, dos, tres o incluso cuatro años a 25°C, en comparación con un producto farmacológico liofilizado significativamente menos estable que contiene los tres ingredientes activos (aproximadamente un 5,9% de productos de degradación totales cuando se almacena a 25°C durante 18 meses). La inestabilidad de los tres IFAs que se aborda en la presente invención se debe a su susceptibilidad a las diversas rutas de degradación, tales como la oxidación, hidrólisis ácida, hidrólisis básica, y fotólisis. La estabilidad prolongada de los fármacos es inesperada, dada la susceptibilidad de la mayoría de los fármacos a experimentar una degradación química en las soluciones con el tiempo, en particular en las soluciones acuosas. Las formulaciones farmacéuticas líquidas descritas en la presente memoria son alrededor de diecisiete veces más estables que una combinación liofilizada de los mismos fármacos almacenada a temperaturas similares.

Definiciones

Poliol se refiere a un compuesto que contiene más de un grupo hidroxilo. Los polioles preferidos incluyen polietilen glicol (PEG), p.ej., PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 540, PEG 600, PEG 900, PEG 1000, PEG 1450, PEG 1540, PEG 2000, PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000, PEG 4600, PEG 6000, PEG 8000, PEG 20.000, y PEG 35.000; propilen glicol; alcohol etílico; glicofurol; y mono metiléter de dietilenglicol.

La formulación farmacéutica estable está presente en un estado líquido. Los ingredientes farmacéuticos activos se disuelven en un medio, vehículo o disolvente líquido. El medio líquido puede ser, p.ej., un poliol, tal como PEG400; agua; o glicina. Una formulación farmacéutica acuosa estable comprende agua como medio líquido. Las realizaciones de la invención comprenden un poliol y agua como medio líquido.

Estable se refiere a una formulación farmacéutica líquida que, al final de un periodo de tiempo de almacenamiento especificado, contiene menos del 5% de sustancias relacionadas totales, es decir, sustancias que resultan de la degradación de los ingredientes farmacéuticos activos cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina. En una realización, una formulación líquida estable es estable a una temperatura entre 2°C y 30°C durante un periodo de al menos seis meses. En una realización preferida, una formulación líquida estable es estable a una temperatura entre 2°C y 30°C durante un periodo de al menos un año.

Expuesto a N₂ o exposición a N₂ se refiere a un proceso mediante el cual las formulaciones farmacéuticas descritas entran en contacto con gas N₂, en general durante el proceso de llenado/acabado. La exposición a N₂ puede continuar a lo largo del almacenamiento de la formulación farmacéutica. La exposición a N₂ se puede llevar a cabo mediante una diversidad de métodos. Por ejemplo, se puede hacer burbujear o inyectar N₂ a través de la formulación farmacéutica combinada en bruto. El agua usada para la formulación también se puede exponer a N₂ antes de la combinación. La formulación farmacéutica también se puede cubrir con N₂, normalmente inmediatamente antes de almacenarla.

La expresión "alrededor de" se entiende que significa que puede haber una variación en la concentración de un componente de la formulación descrita que puede ser del 5%, 10%, 15% o hasta y que incluye el 20% del valor dado. Por ejemplo, la frase "una formulación que tiene alrededor de 50 mM de citrato sódico" se entiende que significa que la formulación puede tener de 40 mM a 60 mM de citrato sódico.

Agentes Farmacéuticos

Esta invención proporciona formulaciones farmacéuticas líquidas estables de una combinación de tres fármacos usados para la inhibición del dolor y la inflamación durante procedimientos quirúrgicos, médicos, de diagnóstico y de

intervención, y para la inyección en sitios de inflamación localizada, p.ej., articulaciones, tendones, ligamentos, y otras estructuras anatómicas. Las formulaciones líquidas descritas son estables durante al menos seis meses cuando se almacenan a una temperatura de entre 2°C y 30°C. Los tres fármacos son el inhibidor de ciclooxigenasa (COX) cetoprofeno, el antagonista de receptores de 5-hidroxitriptamina 2A (5-HT_{2A}) amitriptilina, y oximetazolina, que activa los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D}.

Cetoprofeno

El cetoprofeno exhibe acciones potentes antiinflamatorias, analgésicas, y antipiréticas que están asociadas a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y al antagonismo de los efectos de bradiquinina. El cetoprofeno inhibe de manera no selectiva la actividad de COX-1 y COX-2, lo que da como resultado el bloqueo de la producción de prostaglandinas, en particular la de PGE₂, lo que previene el desarrollo de hiperalgesia. El cetoprofeno tiene un valor de CI_{50} de 4 - 8 nM en un ensayo de COX no selectivo, y es funcionalmente 6 - 12 veces más potente que otros AINEs evaluados (p.ej., naproxeno o indometacina). Kantor, T., *Pharmacotherapy* 6:93-103 (1986). El cetoprofeno también tiene una actividad antagonista de bradiquinina funcional, y su efecto es ocho veces mayor que la observada con el AINE clásico, indometacina. Julou, L., *et al.*, *Scand J Rheumatol Suppl.* 0:33-44 (1976). Además de inhibir la ciclooxigenasa, se cree que cetoprofeno ofrece el beneficio antiinflamatorio adicional de inhibir la lipooxigenasa.

Se sabe que el cetoprofeno es mínimamente soluble en las soluciones acuosas. La solubilidad en agua predicha de cetoprofeno es 0,0213 mg/ml según la base de datos Drugbank.ca. Véase, p.ej., Wishart *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 34:D668-672 (2006) y Wishart *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 36:D901-908 (2008). Se ha preparado cetoprofeno en una formulación acuosa produciendo una sal de aminoácido de la molécula. Los mejores resultados se obtuvieron mediante el uso de una sal de lisina de cetoprofeno. Véase, p.ej., la patente de EE.UU. n° 5.895.789. Se ha solubilizado cetoprofeno en una solución del 35% de PEG 400 y en un 40% de etanol. Véanse, p.ej., las solicitudes de patentes de EE.UU. 2003/0096807 y 2006/026339.

Amitriptilina

La amitriptilina es un antagonista de receptores de serotonina que se ha usado clínicamente durante muchos años como antidepresivo, y tiene efectos beneficiosos en ciertos pacientes de dolor crónico. La amitriptilina se incluye en las formulaciones de la presente invención basándose en sus diferentes efectos antiinflamatorios / analgésicos periféricos, agudos, y locales, que están mediados por sus acciones antagonistas en múltiples subtipos de receptores, que incluyen los adrenérgicos, histamínicos, muscarínicos colinérgicos, y 5-HT, que están implicados en los mecanismos de inflamación y dolor periféricos. Los estudios anteriores han demostrado la capacidad de los agentes endógenos, tales como serotonina (5-hidroxitriptamina, a veces denominada en la presente memoria "5-HT"), bradiquinina e histamina, de producir dolor e inflamación. Sicuteri, F., *et al.*, *Life Sci.* 4: 309-316 (1965); Rosenthal, S.R., *J. Invest. Dermat.* 69:98-105 (1977); Richardson, B.P., *et al.*, *Nature* 316:126-131 (1985); Whalley, E.T., *et al.*, *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 36:652-57 (1987); Lang, E., *et al.*, *J. Neurophysiol.* 63:887-901 (1990). Se cree que la serotonina (5-HT) produce dolor estimulando los receptores de serotonina₂ (5-HT₂) y/o de serotonina₃ (5-HT₃) en las neuronas nociceptivas en la periferia.

Se sabe que amitriptilina es inestable en las soluciones acuosas. Se han hecho intentos para estabilizar las formulaciones líquidas de amitriptilina incluyendo aminoácidos, p.ej., triptófano o metionina, o incluyendo una larga lista de tampones y conservantes, tales como cloruro de benzalconio, EDTA Na, bisulfato sódico, acetato fenilmercúrico, cloruro de cetilpiridinio, timerosal, clorobutanol, bromuro de cetiltrimetil amonio, metilparabeno, propilparabeno, y butilparabeno. Véanse, p.ej., los documentos EP 0 431 663, GB 2.082.910, y EP 93.373.

La amitriptilina se usa de manera muy habitual en forma de una sal de HCl, p.ej., amitriptilina HCl. Sin embargo, el término amitriptilina abarca otras formas de amitriptilina, que incluyen otras formas de sales de amitriptilina.

Oximetazolina

La oximetazolina es un agonista del α 2A-adrenoceptor selectivo potente que tiene una interacción compleja con los miembros de la familia de α -adrenoceptores. Hoffman y Taylor, *Neurotransmission*. En: Hardman, Limbird, y Gilman eds. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 10ª Ed. 105-139 (2001) y Watling, the Sigma-RBI Handbook of Receptor classification and Signal Transduction. 4ª Ed. (2001). En los ensayos de unión a receptor, la oximetazolina también tiene una actividad potente a los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} no humanos (CI_{50} =3-26 nM). Schoeffter y Hoyer *Eur. J. Pharmacol.* 196: 213-216 (1997). Es diez veces más potente en los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{1D} humanos (K_i =0,3-0,4 nM); y es un agonista del receptor 5-HT_{1B}/1D funcional (CI_{50} =30 nM) en la vena safena humana. Law *et al.*, *J. Med. Chem.* 41:2243-2251 (1998) y Molderings *et al.*, *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 342:371-377 (1990).

Aunque oximetazolina se une de manera potente a los α 1A- y α 2A-adrenoceptores (K_i = 3-6 nM), es un agonista parcial en ambos receptores, y también interacciona con otros miembros de la familia de α -adrenoceptores. Newman-Tancredi *et al.*, *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 358:197-206 (1998); Bylund *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:1171-1177 (1997); Naselsky *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298:219-225 (2001); Horie *et al.*, *Br. J. Pharmacol.* 116:1611-1618 (1995); Ruffolo *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209:429-436 (1979); Bylund *et al.*, *J.*

Pharmacol. Exp. Ther. 245:600-607 (1988); Ruffolo *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 224:559-566 (1983); y Murphy *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244:571-578 (1988). A pesar de esto, el compuesto se acepta en general como un agonista selectivo del α_2 A-adrenoceptor. Hoffman y Taylor y Schoeffter y Hoyer, anteriormente mencionados. Además, oximetazolina tiene una actividad antinociceptiva/antiinflamatoria dependiente de la dosis en varios modelos animales de dolor e inflamación. Reddy *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213:525-533 (1980); Sherman *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245:319-326 (1988); y Loomis *et al.*, *Brain Res.* 599:73-82 (1992).

Oximetazolina tiene una actividad bien establecida como descongestionante para uso ocular y nasal, basado en su efecto vasoconstrictor. Physicians' Desk Reference, 25ª Ed. (2004). El efecto vasoconstrictor de oximetazolina puede restablecer también el tono vascular que se da en los sitios de inflamación, que incluyen, p.ej., sitios quirúrgicos, articulaciones lesionadas de manera aguda, articulaciones inflamadas de manera crónica u otros tejidos. Najafipour, *Exp. Physiol.* 85:267-273 (2000). La actividad de oximetazolina en los receptores 5-HT_{1B/1D} puede inhibir también la liberación de mediadores proinflamatorios, proporcionando una actividad antiinflamatoria adicional en los sitios de inflamación. Law *et al.*, anteriormente mencionado.

La oximetazolina se usa de manera muy habitual en forma de una sal de HCl, p.ej., oximetazolina HCl. Sin embargo, el término oximetazolina abarca otras formas de oximetazolina, que incluyen otras formas de sales de oximetazolina.

Formulaciones

Las formulaciones farmacéuticas líquidas estables de la presente invención incluyen cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina en una forma concentrada en un medio de poliol, y se pueden almacenar y después preparar mediante dilución en una solución acuosa para la administración parenteral. En una realización preferida, la formulación farmacéutica líquida estable se diluye en un vehículo líquido fisiológico de irrigación hasta una concentración adecuada para la administración local en un sitio quirúrgico. En otra realización preferida, la formulación farmacéutica líquida estable se usa en su forma estable concentrada, o se puede diluir en un vehículo líquido fisiológico, antes de la administración mediante inyección a un paciente en un sitio de inflamación localizada. En una realización preferida adicional, la formulación farmacéutica líquida estable se prepara con una concentración de ingredientes activos que es adecuada para la inyección directa en un sitio localizado de inflamación, en un sitio inflamado de manera crónica o en un sitio lesionado de manera aguda.

Las cantidades de los ingredientes farmacéuticamente activos incluidos en la formulación se pueden expresar en proporciones molares. En general, la proporción de amitriptilina HCl y oximetazolina HCl es 1:1. Las proporciones de cetoprofeno respecto de amitriptilina HCl y oximetazolina HCl pueden oscilar de 10:1:1 a 1:10:10. El cetoprofeno, amitriptilina HCl y oximetazolina HCl se incluyen de manera adecuada en una proporción molar (cetoprofeno:amitriptilina HCl:oximetazolina HCl) de 10:1:1 a 1:10:10, preferiblemente de 5:1:1 a 1:5:5, más preferiblemente de 4:1:1 a 1:1:1, y lo más preferiblemente aproximadamente (es decir, +/- 20%) 3,5:1:1. Otras proporciones molares ejemplares son (cetoprofeno:amitriptilina HCl:oximetazolina HCl) 1:1:1, 1:2:1, 1:1:2, 2:1:1, 2:2:1, 2:1:2, 1:2:2, 1:5:1, 1:1:5, 5:1:1, 5:5:1, 5:1:5, 1:5:5, 1:10:1, 1:1:10, 10:1:1, 10:10:1, 10:1:10, 1:10:10, 1:50:1, 1:1:50, 50:1:1, 50:50:1, 50:1:50, 1:50:50, 1:100:1, 1:1:100, 100:1:1, 100:100:1, 100:1:100, y 1:100:100.

Se incluye cetoprofeno en la formulación farmacéutica líquida estable a concentraciones entre 550 μ M y 1 M, preferiblemente entre 800 μ M y 100 mM, más preferiblemente entre 1 mM y 10 mM, y lo más preferiblemente entre 1 mM y 5 mM. Se incluye amitriptilina en la formulación farmacéutica líquida estable a concentraciones entre 55 μ M y 1 M, preferiblemente entre 100 μ M y 100 mM, más preferiblemente entre 200 μ M y 10 mM, y lo más preferiblemente entre 300 μ M y 1,5 mM. Se incluye oximetazolina en la formulación farmacéutica líquida estable a concentraciones entre 350 μ M y 1 M, preferiblemente entre 350 μ M y 100 mM, más preferiblemente entre 350 μ M y 10 mM, y lo más preferiblemente entre 350 μ M y 1,5 mM. En una realización preferida, la formulación farmacéutica líquida estable comprende alrededor de 2,7 mM de cetoprofeno, alrededor de 720 μ M de amitriptilina, y alrededor de 720 μ M de oximetazolina. En esta realización, la proporción molar de cetoprofeno:amitriptilina:oximetazolina es de alrededor de 3,5:1:1.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, las composiciones antiinflamatorias de cetoprofeno, amitriptilina y oximetazolina, que incluyen, a modo de ejemplo, la formulación farmacéutica líquida estable descrita en la presente memoria, se pueden preparar de acuerdo con la presente invención con una concentración de ingredientes activos que es adecuada para la inyección directa en un sitio localizado de inflamación, y la dosis particular la determina un profesional médico. En una realización, la formulación de la presente invención descrita anteriormente no se diluye, o se diluye en como máximo 10 partes de diluyente por una parte de la formulación antes de la administración al paciente. Las concentraciones adecuadas de ingredientes activos para inyección directa en esta forma concentrada están en los siguientes intervalos: 40-750 μ g/mL y más preferiblemente 40-75 μ g/mL de cetoprofeno, 12-240 μ g/mL y más preferiblemente 12-24 μ g/mL de amitriptilina HCl, y 12-240 μ g/mL y más preferiblemente 12-24 μ g/mL de oximetazolina HCl.

En otra realización, la formulación se diluye con un vehículo fisiológico, tal como un vehículo de irrigación, antes de la inyección en un sitio localizado de inyección. En esta realización, el cetoprofeno está presente en la solución de inyección diluida a una concentración de como máximo 500.000 nanomolar, preferiblemente como máximo 300.000 nanomolar, más preferiblemente como máximo 100.000 nanomolar y lo más preferiblemente menor de 50.000

nanomolar. La amitriptilina se incluye de manera adecuada en la solución de inyección diluida a una concentración de como máximo 50.000 nanomolar, preferiblemente como máximo 30.000 nanomolar, más preferiblemente como máximo 25.000 nanomolar y lo más preferiblemente menor de 10.000 nanomolar. La oximetazolina se incluye de manera adecuada en la solución de inyección diluida a una concentración de como máximo 25.000 nanomolar, preferiblemente como máximo 20.000 nanomolar, más preferiblemente como máximo 15.000 nanomolar y lo más preferiblemente menor de 10.000 nanomolar. Aún más preferiblemente, la formulación diluida para inyección líquida incluye 3,0-6,0 µg/mL y más preferiblemente 4,0-5,0 µg/mL de cetoprofeno, 0,5-3,0 µg/mL y más preferiblemente 1,0-2,0 µg/mL de amitriptilina, y 0,5-3,0 µg/mL y más preferiblemente 1,0-2,0 µg/mL de oximetazolina.

En otra realización, la formulación de la presente invención se puede combinar en un aceite u otro disolvente biocompatible, una suspensión, un gel polimerizable o no polimerizable, una pasta o un bálsamo para inyección en un sitio de inflamación local. La formulación de la presente invención se puede combinar también en un vehículo seleccionado para aumentar la administración, absorción, estabilidad o farmacocinética de los agentes terapéuticos, o con un vehículo de administración de liberación sostenida para formar un medicamento de liberación lenta tras la inyección local, tal como micropartículas, microesferas o nanopartículas compuestas de proteínas, liposomas, carbohidratos, compuestos orgánicos sintéticos, o compuestos inorgánicos, así como geles polimerizables y no polimerizables. Las formulaciones para inyección local de la presente invención se pueden administrar también en un sitio de inflamación local mediante una bomba continua o intermitente.

La inyección local de la formulación de la presente invención en forma concentrada como se describió anteriormente, en forma diluida como se describió anteriormente, o en cualquier concentración intermedia, la determinará un profesional médico de acuerdo con la presente invención dependiendo de la naturaleza de la lesión. Por ejemplo, en el caso del tratamiento de una lesión aguda en una articulación con una cápsula articular intacta, puede ser adecuada la solución de inyección diluida. Como ejemplo adicional, para una inyección intratendinosa o una inyección en tejidos en los que el tiempo de permanencia de la solución puede ser más corto, se puede preferir la solución de inyección concentrada. La concentración y el volumen inyectado los determinará el médico, basándose en las características del sitio anatómico, tales como si el sitio es un espacio cerrado (p.ej., un espacio de una articulación), el volumen de ese espacio, la velocidad potencial de difusión, salida o absorción del fármaco desde el sitio de inyección, etc., para asegurar que se retiene una cantidad eficaz de los agentes inyectados en el sitio local para inhibir de manera eficaz la inflamación en el sitio.

El volumen de la formulación de la presente invención, en forma concentrada o diluida, inyectada en un sitio de inflamación local variará según sea necesario por el sitio y el trastorno asociado a tratar, y puede oscilar de manera adecuada entre 1 mL y 30 mL, y más preferiblemente entre 5 mL y 20 mL. A modo de ejemplo no limitante, se puede inyectar un volumen de aproximadamente 20 mL en una articulación de rodilla, se pueden inyectar aproximadamente 20 mL en un espacio subacromial, se pueden inyectar aproximadamente 10 mL en una articulación del hombro, se pueden inyectar aproximadamente 8-10 mL en una articulación de la cadera, se pueden inyectar aproximadamente 5-10 mL en una articulación del tobillo, se pueden inyectar aproximadamente 3-5 mL en una articulación del codo, se puede inyectar aproximadamente 1 mL en una articulación de la muñeca, se pueden inyectar aproximadamente 10 mL en la bolsa trocánterea mayor y se pueden inyectar aproximadamente 3-5 mL en la banda iliotibial en el cóndilo femoral lateral.

Las formulaciones farmacéuticas líquidas estables se pueden diluir, p.ej., en un vehículo de irrigación para la administración local de los ingredientes farmacéuticos activos durante la cirugía artroscópica. Para la administración local tras la dilución, el cetoprofeno está a una concentración de como máximo 500.000 nanomolar, preferiblemente como máximo 300.000 nanomolar, más preferiblemente como máximo 100.000 nanomolar y lo más preferiblemente menor de 50.000 nanomolar. Para la administración local tras la dilución, la amitriptilina se incluye de manera adecuada a una concentración de como máximo 50.000 nanomolar, preferiblemente como máximo 30.000 nanomolar, más preferiblemente como máximo 25.000 nanomolar y lo más preferiblemente menor de 10.000 nanomolar. Para la administración local tras la dilución, la oximetazolina se incluye de manera adecuada a una concentración de como máximo 25.000 nanomolar, preferiblemente como máximo 20.000 nanomolar, más preferiblemente como máximo 15.000 nanomolar y lo más preferiblemente menor de 10.000 nanomolar. Si las formulaciones farmacéuticas líquidas estables se van a diluir en un fluido fisiológico que se usa para irrigar un sitio quirúrgico, los expertos reconocerán que la concentración de los ingredientes activos será mayor en la formulación farmacéutica en comparación con el fluido de irrigación administrado. Es decir, la concentración de cetoprofeno en la formulación farmacéutica concentrada será al menos cinco, diez, cien, ciento cincuenta, quinientas o mil veces mayor que la concentración diluida de cetoprofeno usada para irrigar un sitio quirúrgico. De forma similar, la concentración de amitriptilina en la formulación farmacéutica concentrada será al menos cinco, diez, cien, ciento cincuenta, quinientas o mil veces mayor que la concentración diluida de amitriptilina usada para irrigar un sitio quirúrgico. Y la concentración de oximetazolina en la formulación farmacéutica concentrada será al menos cinco, diez, cien, ciento cincuenta, quinientas o mil veces mayor que la concentración diluida de oximetazolina usada para irrigar un sitio quirúrgico. La Tabla 1 proporciona las concentraciones ejemplares de cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina en una formulación preparada para diluirla más tarde en un vehículo de irrigación.

Las composiciones de la presente invención se formulan en general en un medio acuoso, pero no se necesita agua. Se incluye PEG 400 u otro poliol para ayudar en la disolución de los fármacos, en particular de cetoprofeno. El PEG 400 u otro poliol está presente a concentraciones entre el 1 y 100% (v/v). En ciertas realizaciones, la formulación

farmacéutica la diluye un médico antes de la administración a un paciente, en general durante un procedimiento artroscópico. En una formulación sin diluir, la concentración de PEG 400 es en general de entre un 2,0% y 99% (v/v). En las realizaciones preferidas, la concentración de PEG 400 en la formulación sin diluir es de entre un 10% y 70% (v/v). En una realización más preferida, la concentración de PEG 400 es de entre un 15% y 50% (v/v). En otra realización preferida, la concentración de PEG 400 en la formulación sin diluir se selecciona del 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50%. En una realización más preferida, la concentración de PEG 400 en una formulación sin diluir es del 20% o alrededor del 20%.

Debido a la implicación de los cationes divalentes en la catálisis de las reacciones de oxidación, se puede incluir ácido etilendiamin tetraacético (EDTA) en las formulaciones farmacéuticas líquidas descritas en la presente memoria. En general se usa la sal disódica, EDTA Na₂. La concentración de EDTA Na₂ es en general del 0,01-0,5% (p/v). En una realización, la concentración de EDTA Na₂ es del 0,05-0,2%. En una realización preferida, la concentración de EDTA Na₂ es del 0,05% o alrededor del 0,05%.

Las formulaciones farmacéuticas líquidas descritas en la presente memoria incluyen de manera adecuada ácido cítrico como agente tamponador para mantener el pH. El ácido cítrico también tiene la capacidad de quelar los cationes divalentes y así también puede prevenir la oxidación, y de ese modo cumple dos funciones como agente tamponador y como agente estabilizante antioxidante. El ácido cítrico se usa en general en forma de una sal sódica. La concentración de citrato Na es en general de 10-500 mM. En una realización, la concentración de citrato Na es alrededor de 50 mM.

Para una estabilidad óptima de los ingredientes farmacéuticos activos, el pH de la formulación líquida estable se mantiene entre 4,5-7,0, preferiblemente entre 5,0-6,2, más preferiblemente entre 5,2-5,8, y lo más preferiblemente entre 5,4-5,6. En otra realización preferida, el pH se mantiene a alrededor de 5,5.

La Tabla 1 proporciona una formulación ejemplar de las formulaciones farmacéuticas líquidas estables descritas en la presente memoria. Se añade hidróxido sódico y ácido clorhídrico según sea necesario para ajustar el pH a alrededor de 5,5. Se cubre con N₂ en la preparación final para aumentar la estabilidad. En una realización preferida, se diluyen veinte mililitros de la formulación mostrada en la Tabla 1 en 3.000 mililitros de solución de irrigación artroscópica y después se administran a un paciente durante la cirugía.

Tabla 1. Formulación sin diluir ejemplar en un volumen final de un litro

Componente	Composición Objetivo Preferida	Intervalo de Composición Adecuado
Cetoprofeno, USP	0,687 g/L	0,550-0,824 g/L
Amitriptilina HCl, USP	0,227 g/L	0,182-0,272 g/L
Oximetazolina HCl, USP	0,215 g/L	0,172-0,258 g/L
PEG 400, NF	225,6 g/L	180,5-270,7 g/L
Ácido cítrico monohidrato, USP	1,968 g/L	1,589-2,362 g/L
Citrato Na dihidrato, USP	9,078 g/L	7,262-10,894 g/L
EDTA disódico, USP	0,500 g/L	0,400-0,600 g/L
Agua para inyección, USP	798,3 g/L	639-958 g/L
Hidróxido sódico, NF*	---	---
Ácido clorhídrico, NF*	---	---
Nitrógeno, NF*	---	---

*Formulario nacional

Métodos de uso

Las formulaciones líquidas estables tienen aplicación en una diversidad de procedimientos operatorios/de intervención. Las formulaciones líquidas estables sin diluir se almacenan hasta que las necesite el usuario. En ciertas realizaciones, las formulaciones se diluyen después en un vehículo fisiológico de irrigación y se usan para irrigar un sitio quirúrgico durante la cirugía, p.ej., cirugía artroscópica o cirugía abierta. Las formulaciones líquidas estables, diluidas o sin diluir según sea adecuado, también se pueden inyectar directamente en un sitio de inflamación localizada. Un sitio de inflamación localizada puede ser, p.ej., una articulación lesionada de manera aguda u otra estructura anatómica, o un sitio crónico de inflamación, por ejemplo, una articulación artrítica.

En una realización, las formulaciones farmacéuticas líquidas estables descritas en la presente memoria se diluyen en un vehículo fisiológico de irrigación, que después se aplica de manera perioperatoria durante la cirugía

artroscópica de articulaciones anatómicas. Otras aplicaciones incluyen una diversidad de procedimientos operatorios/de intervención, tales como técnicas quirúrgicas, de diagnóstico y terapéuticas. Tal como se usa en la presente memoria, el término "perioperatorio" abarca la aplicación de manera intraprocedimental, pre- e intraprocedimental, intra- y posprocedimental, y pre-, intra- y posprocedimental. Preferiblemente, la solución de irrigación se aplica de manera preprocedimental y/o posprocedimental, así como intraprocedimental. Los fluidos fisiológicos de irrigación que son vehículos adecuados para la dilución de la formulación incluyen la solución salina normal, glicina, o solución de Ringer con lactato, que se aplican en el sitio quirúrgico mediante técnicas muy conocidas para los expertos habituales en la técnica. La solución de irrigación de la presente invención se aplica preferiblemente en la herida o el sitio quirúrgico antes del inicio del procedimiento, preferiblemente antes del traumatismo del tejido, y continuamente a lo largo de la duración del procedimiento, para bloquear de manera preventiva el dolor y la inflamación. Tal como se usa a lo largo de la presente memoria, el término "irrigación" pretende significar el lavado de una herida o estructura anatómica con una corriente de líquido. El término "aplicación" pretende abarcar la irrigación y otros métodos para introducir localmente las formulaciones de la presente invención. Tal como se usa a lo largo de la presente memoria, el término "continuamente" pretende incluir también las situaciones en las que hay una irrigación repetida y frecuente de heridas a una frecuencia suficiente para mantener una concentración local terapéutica predeterminada de los agentes aplicados, y las aplicaciones en las que puede haber un cese intermitente del flujo de fluido de irrigación necesitado por la técnica operatoria.

Una vez que la formulación líquida estable se diluye para la irrigación de un sitio quirúrgico, la concentración final, diluida de los ingredientes farmacéuticos activos es la siguiente: cetoprofeno preferiblemente entre 1.000-500.000 nM, más preferiblemente entre 5.000-100.000 nM; amitriptilina preferiblemente entre 100-50.000 nM, más preferiblemente entre 1.000-25.000 nM; y oximetazolina preferiblemente entre 0,01-25.000 nM, más preferiblemente entre 0,05-15.000 nM. En una realización preferida, la solución de irrigación diluida se prepara con la siguiente concentración de ingredientes activos: 4,5 µg/mL de cetoprofeno, 1,50 µg/mL de amitriptilina, y 1,42 µg/mL de oximetazolina. Los expertos serán capaces de determinar una dosis terapéutica adecuada del cetoprofeno, amitriptilina y oximetazolina, y serán capaces de calcular cualquier dilución necesaria basándose en la composición de la formulación farmacéutica líquida estable.

Además de usarlas durante los procedimientos artroscópicos, las formulaciones o composiciones farmacéuticas descritas, diluidas en un fluido de irrigación según sea adecuado, también se pueden administrar de manera local y perioperatoria durante procedimientos de cirugía abierta en articulaciones de las extremidades, que incluyen, pero sin limitación, las sustituciones totales de articulaciones de rodilla, cadera, tobillo, hombro, codo, muñeca e interfalángicas, la colocación de implantes en articulaciones de las extremidades, y otros procedimientos quirúrgicos en una extremidad. Tal como se usa en la presente memoria, "extremidad" se refiere a las estructuras anatómicas de la pierna, que incluyen la cadera, o del brazo, que incluyen el hombro. La irrigación de sitios quirúrgicos abiertos en articulaciones o extremidades se puede llevar a cabo de acuerdo con la invención mediante la irrigación directa periódica con una jeringa de pera o mediante el uso de otras técnicas convencionales.

En las realizaciones preferidas, las formulaciones farmacéuticas líquidas estables descritas en la presente memoria se diluyen en fluido fisiológico y se usan para irrigar un sitio quirúrgico durante los procedimientos artroscópicos. Las técnicas artroscópicas para las que se puede emplear la presente solución incluyen, a modo de ejemplo no limitante, menisectomías parciales y reconstrucciones de ligamentos de la rodilla, acromioplastias de hombro, desbridamiento del manguito rotador, sinovectomías de codo, y artroscopias de muñeca y tobillo. La solución de irrigación se suministra continuamente de manera intraoperatoria en la articulación a un caudal suficiente para distender la cápsula de la articulación, para eliminar restos operatorios, y para posibilitar una visualización intraarticular sin obstrucciones.

En otra realización, las composiciones que incluyen una combinación de cetoprofeno, amitriptilina y oximetazolina, tales como las formulaciones líquidas estables descritas en la presente memoria, se pueden inyectar directamente en un sitio de inflamación localizada para inhibir, reducir o controlar la inflamación en el sitio. Las composiciones de la presente invención, en forma diluida o concentrada, se pueden inyectar localmente de manera intraarticular en una articulación inflamada o en una articulación que tiene riesgo de inflamación, que incluye una rodilla, cadera, hombro, codo, tobillo, muñeca, temporomandibular, base del pulgar y las articulaciones pequeñas de las manos y de los pies, y otras articulaciones. Las composiciones de la presente invención se pueden inyectar también en un tendón o zona peritendinosa, ligamento o zona periligamentosa, músculo u otra zona de tejido blando que esté inflamada o que tenga riesgo de inflamación.

Los sitios inflamados localmente que se pueden tratar mediante inyección directa de acuerdo con la presente invención incluyen las articulaciones, zonas peritendinosas y otras estructuras anatómicas que están afectadas por una afección aguda, p.ej., para tratar un trastorno intraarticular, subluxación o dislocación de una articulación, esguinces, distensiones y para la inyección en un punto doloroso. La inyección local de la formulación y las composiciones de la presente invención se pueden usar también para tratar las lesiones subagudas, p.ej., tenosinovitis flexora, o fascitis, tal como fascitis plantar. La inyección local de la formulación y las composiciones de la presente invención se pueden usar también para tratar enfermedades o afecciones inflamatorias crónicas, p.ej., artritis, artropatías degenerativas que incluyen osteoartritis, artritis reumatoide y otras artritis, sinovitis, bursitis, tendinitis, síndrome del túnel carpiano, quistes ganglionarios, fibromialgia, o lesiones por utilización repetitiva o sobreutilización. La inyección local de la formulación y las composiciones de la presente invención se pueden usar

también de manera profiláctica para inhibir una lesión anticipada, tal como la inyección en una articulación de un atleta antes de la participación del atleta en un evento deportivo para evitar el agravamiento o la recidiva de una antigua lesión o afección.

5 La inyección local de la formulación y las composiciones de la presente invención se destinan al tratamiento de las afecciones inflamatorias sin un procedimiento quirúrgico, de forma que la articulación, zona peritendinosa, músculos u otro tejido en el que se inyecta la composición están intactas, y la composición inyectada se mantiene residente en el sitio local durante un periodo de tiempo suficiente para el efecto terapéutico.

10 Las indicaciones ejemplares que se pueden tratar de manera adecuada mediante la inyección local de la formulación y las composiciones de la presente invención incluyen, a modo de ejemplo no limitante, el tratamiento para inhibir la inflamación y el dolor tras una lesión traumática (p.ej., trastorno articular, desgarro de menisco); el tratamiento para aliviar trastornos inflamatorios/dolor postoperatorio (p.ej., artrofibrosis, hombro rígido); el tratamiento para trastornos degenerativos y por sobreutilización (p.ej., artritis, síndrome de pinzamiento subacromial); inyección intraarticular (p.ej., artrosis, trastorno intraarticular, artritis); inyección en un punto doloroso (p.ej., síndrome de dolor miofascial); inyección intrabursal (p.ej., bolsa trocantérea mayor); tratamiento de síndromes por fricción (p.ej., síndrome de la banda iliotibial); inyección en la vaina tendinosa (p.ej., tenosinovitis flexora, enfermedad de De Quervain); inyección intramuscular para el dolor muscular (p.ej., adhesiones musculofaciales); e inyección intratendinosa para la tendinitis (p.ej., tendón de Aquiles, tendón rotuliano).

20 Además, la inyección local de la formulación y las composiciones de la presente invención se pueden administrar junto con otras modalidades de tratamiento, tal como junto con inyecciones musculoesqueléticas (p.ej., corticosteroides, anestésicos locales, plasma rico en plaquetas (PRP), antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) y anticuerpos anti-factor de necrosis tumoral alfa (anti-TNF α), o para el uso junto con la técnica de Graston y la manipulación de la fascia. Cuando se administra junto con otra modalidad de tratamiento, la formulación y las composiciones de la presente invención se pueden administrar antes, junto con o después de la administración del otro tratamiento para sumarse o aumentar el efecto, o mitigar uno o más efectos secundarios, del otro tratamiento.

25 Tal administración de la formulación y las composiciones de la presente invención podrían requerir un cambio en la dosificación del otro tratamiento.

30 Un médico determinará la frecuencia de la inyección local de las formulaciones y las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, puede ser suficiente una única inyección inmediatamente tras una lesión aguda o con fines profilácticos. Para otras afecciones agudas, subagudas y crónicas, una inyección inicial puede ir seguida de una serie de inyecciones repetidas a diario, cada dos días, cada varios días o semanalmente, según sea necesario. La inyección se puede completar con visualización directa o con la ayuda de ultrasonidos u otra orientación con formación de imágenes.

35 Las formulaciones líquidas estables se pueden proporcionar como parte de un kit. Tal kit puede incluir un vial de la formulación líquida estable, que se puede diluir después en un vehículo antes del uso, p.ej., en un fluido de irrigación para un procedimiento quirúrgico o para la inyección directa en un sitio de inflamación.

40 En otra realización, las formulaciones líquidas estables se envasan de manera estéril en una jeringa para la inyección directa en un sitio de inflamación localizada, p.ej., una articulación lesionada de manera aguda o un sitio de inflamación crónica. Debido a la estabilidad de las formulaciones descritas en la presente memoria, tales jeringas se pueden almacenar durante un periodo largo de tiempo y tenerlas disponibles hasta que las necesite un médico u otro profesional sanitario.

45 En una realización, las formulaciones líquidas estables para inyección directa se preparan de forma que no sea necesaria una dilución adicional de los ingredientes activos antes de la administración a un paciente. El nivel de dosis específico para cualquier paciente particular dependerá de una diversidad de factores, que incluyen la edad, el peso corporal, la salud general, la gravedad de la lesión, y la identidad de la articulación lesionada. Sin embargo, en general la dosis de ingredientes farmacéuticos activos será menor que la dosis para la administración sistémica, y mayor que la dosis usada en el fluido de irrigación para la cirugía artroscópica, como se describe en la presente memoria. En una realización preferida, las formulaciones para la inyección directa en una articulación lesionada se preparan con la siguiente concentración de ingredientes activos: 40-75 $\mu\text{g/mL}$ de cetoprofeno, 12-24 $\mu\text{g/mL}$ de amitriptilina, y 12-24 $\mu\text{g/mL}$ de oximetazolina. Los expertos pueden determinar la dosis terapéutica adecuada del cetoprofeno, amitriptilina y oximetazolina para la inyección directa en una articulación lesionada.

50

Se debe indicar que, tal como se usan en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" y "uno/una" y "el/la" incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto lo imponga claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "un excipiente" incluye una diversidad de tales excipientes y los equivalentes de los mismos conocidos para los expertos en la técnica, etc.

55 Las publicaciones discutidas en la presente memoria se proporcionan únicamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de la presente memoria se debe considerar una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder a dicha 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 de modo independiente. Todas las citas se incorporan en la presente memoria como referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1: PEG 400 aumenta la solubilidad de los ingredientes farmacéuticos activos en la formulación líquida.

- 5 Se prepararon dos formulaciones líquidas de los ingredientes activos de cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl en presencia y ausencia de PEG 400. La composición de las formulaciones líquidas, F1 y F2, se muestra en la Tabla 2. En ambas formulaciones, se usó un tampón de citrato sódico 50 mM, pH 5,5.

Tabla 2. Solubilidad de las formulaciones líquidas.

Formulación	Tampón	% de PEG 400 (v/v)	Solubilidad medida (Cetoprofeno/Amitriptilina HCl/Oximetazolina HCl)	Solubilidad de saturación aproximada (Cetoprofeno/Amitriptilina HCl/Oximetazolina HCl)
F1	Citrato Na 50 mM, pH 5,5	0%	0,687/0,227/0,215 (mg/mL)	1,5 X solubilidad medida
F2	Citrato Na 50 mM, pH 5,5	20%	1,370/0,452/0,427 (mg/mL)	1,5 X solubilidad medida

- 10 La adición de un 20% de PEG 400 (v/v) a la formulación de cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl dio como resultado una solubilidad medida que fue casi el doble que la de la formulación sin codisolventes. Los resultados de la Tabla 2 indican que PEG 400 aumenta la solubilidad de cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl, lo que permite la preparación de formulaciones concentradas.

- 15 La solubilidad de cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl en un 20% de PEG 400 (p/v) se comparó con la solubilidad en presencia de un 20% de PEG 3350 (p/v). Se prepararon tres formulaciones líquidas, F3, F4, y F5, con las concentraciones de PEG mostradas en la Tabla 3. Cada una de las tres formulaciones incluyeron tampón de citrato sódico de alrededor de 50 mM, pH 5,5, cetoprofeno (0,687 mg/mL), amitriptilina HCl (0,227 mg/mL), y oximetazolina HCl, (0,227 mg/mL). La formulación se hizo a una escala piloto de un litro.

Tabla 3. Tiempos de disolución y filtración

ID de la formulación	Codisolvente añadido	Tiempo de disolución para cetoprofeno	Tiempo de filtración*
F3	Nada	~ 4 horas /escala 1-L	23 seg.
F4	20% p/v de PEG 400	~ 8 minutos/escala 1-L	56 seg.
F5	20% p/v de PEG 3350	~ 4 horas /escala 1-L	183 seg.

- 20 Tiempo de filtración*: 100 mL de solución filtrada a través de un filtro de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm y 250 mL a vacío.

- 25 El cetoprofeno es mínimamente soluble en agua, y llevó cuatro horas disolverlo en tampón de citrato Na 50 mM de pH 5,5 (F3), o un 20% p/v de PEG 3350 (F5). El PEG 3350 sí aumentó la solubilidad de cetoprofeno, pero no redujo el tiempo necesario para la disolución de cetoprofeno en ausencia de PEG. PEG 400 es un líquido a temperatura ambiente, y el cetoprofeno se disolvió en un 100% de PEG 400 en 8 minutos con agitación. Tras la disolución de cetoprofeno, se añadió tampón de citrato Na 50 mM para llevar la concentración final de PEG 400 al 20% (p/v, F3).

- 30 El tiempo de filtración de las tres soluciones, F3, F4, y F5, se determinó filtrando 100 mililitros de cada solución a través de un filtro de PVDF de 0,22 µm y 250 mL a vacío. Los resultados se muestran en la Tabla 3. En ausencia de PEG, la filtración de 100 mililitros de F3 llevó veintitrés segundos. La filtración de la formulación del 20% de PEG 3350 (p/v) (F5) llevó tres minutos y tres segundos en las mismas condiciones. La filtración de la formulación del 20% de PEG 400 (p/v) (F4) llevó cincuenta y seis segundos. Así, la adición de PEG 400 mejoró la disolución de cetoprofeno, y no incrementó significativamente el tiempo de filtración de la formulación en comparación con una formulación solamente con tampón.

Ejemplo 2: El tampón de ácido cítrico mejora la estabilidad química de los tres ingredientes farmacéuticos activos.

- 35 Se ensayó la estabilidad de los ingredientes farmacéuticos activos en tampones de acetato o citrato. Se usó una HPLC en gradiente para cuantificar los tres ingredientes farmacéuticos activos cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl, y las sustancias relacionadas en las formulaciones de soluciones tras el almacenamiento durante hasta ochenta y cuatro días a diferentes temperaturas. Se diluyeron alícuotas de las formulaciones ensayadas en la fase móvil para obtener una concentración final de alrededor de 0,0687 mg/mL a alrededor de 0,344 mg/mL de cetoprofeno, alrededor de 0,0227 mg/mL a alrededor de 0,114 mg/mL de amitriptilina HCl, y alrededor de 0,0215

mg/mL a alrededor de 0,108 mg/mL de oximetazolina HCl. Las condiciones cromatográficas para el ensayo de las sustancias relacionadas fueron las siguientes: (a) Longitud de onda de detección, UV 215 nm; (b) Columna Zorbax SB-C8, 5 µm, 4,6 x 250 mm; (c) Temp. de la columna, 30 ± 1°C; (d) Temp. de la muestra, ambiental; (e) Caudal, 1,2 mL/min; (f) Volumen de inyección, 20 µL; (g) Tiempo de funcionamiento, 30 minutos. El gradiente se muestra en la Figura 1A. La Figura 1B muestra el cromatograma del ensayo de sustancias relacionadas para F7 almacenado a 4°C durante alrededor de 4 meses. Cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl tienen tiempos de retención de 12,572 minutos, 6,210 minutos, y 3,742 minutos, respectivamente.

Se prepararon dos formulaciones, F6 y F7, con los tampones mostrados en la Figura 2A. F6 incluyó tampón de acetato Na 50 mM, pH 5,5; F7 incluyó tampón de citrato Na 50 mM, pH 5,5. Los otros componentes de F6 y F7 fueron idénticos: Cetoprofeno (0,687 mg/mL), Amitriptilina HCl (0,227 mg/mL), y Oximetazolina HCl (0,227 mg/mL), y un 20% de PEG 400. Los datos de estabilidad se resumen en la Figura 2B. En comparación con el acetato Na 50 mM, pH 5,5, la estabilidad química de los ingredientes activos, especialmente de cetoprofeno, mejoró significativamente cuando se tamponó con citrato sódico 50 mM, pH 5,5. El ácido cítrico también tiene la capacidad de quelar los cationes divalentes, y puede prevenir la oxidación, por lo que actúa como un agente tamponador y un antioxidante.

Ejemplo 3: La estabilidad de los tres ingredientes farmacéuticos activos mejora a pH 5,5.

La estabilidad de los ingredientes farmacéuticos activos se ensayó en tampones con valores variables de pH. Cetoprofeno, en particular, es más estable a un pH mayor. Datos no mostrados. Se prepararon dos formulaciones, F8 y F9, con los tampones mostrados en la Figura 3A. Ambas formulaciones incluyeron tampón de citrato Na 50 mM. El pH de F8 fue 6,5, y el pH de F9 fue 5,5. Los otros componentes de F6 y F7 fueron idénticos: cetoprofeno (0,687 mg/mL), amitriptilina HCl (0,227 mg/mL), y oximetazolina HCl (0,227 mg/mL), y un 20% de PEG 400.

Como anteriormente, se usó una HPLC en gradiente para cuantificar los tres ingredientes farmacéuticos activos cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl, y las sustancias relacionadas en las formulaciones de soluciones tras el almacenamiento durante ochenta y cuatro días a diferentes temperaturas. Los resultados se muestran en la Figura 3B. La estabilidad química de los ingredientes farmacéuticos activos, especialmente de amitriptilina HCl y oximetazolina HCl, mejoró significativamente cuando se almacenaron en un tampón de citrato Na 50 mM a pH 5,5.

Ejemplo 4: La estabilidad química mejora con una cubierta de N₂ y protección de la luz durante el almacenamiento.

La estabilidad de los ingredientes farmacéuticos activos en la formulación líquida se ensayó en presencia de una cubierta de N₂ y protección de la luz. Se prepararon dos formulaciones, F10 y F11, y se almacenaron durante hasta 28 días en las condiciones mostradas en la Figura 4A, es decir, con o sin una cubierta de N₂ y protección de la luz. Ambas formulaciones incluyeron tampón de citrato Na 50 mM, pH 5,5, cetoprofeno (0,687 mg/mL), amitriptilina HCl (0,227 mg/mL), y oximetazolina HCl (0,227 mg/mL), y un 20% de PEG 400. Se preparó F10 con protección de la luz y una cubierta de N₂ después de la combinación y antes del llenado de la formulación en viales, mientras que F11 se preparó sin protección ni cubierta.

Como anteriormente, se usó una HPLC en gradiente para cuantificar los tres ingredientes farmacéuticos activos cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl, y las sustancias relacionadas en las formulaciones de soluciones tras el almacenamiento durante veinticuatro días a diferentes temperaturas. Los resultados se muestran en la Figura 4B. La estabilidad química de los ingredientes farmacéuticos activos, especialmente de oximetazolina HCl y cetoprofeno, mejoró significativamente cuando se cubrieron con N₂ después de la combinación y antes del llenado de los viales, y cuando además se protegieron de la luz durante el almacenamiento.

Ejemplo 5: La adición de antioxidantes mejora la estabilidad química.

Se ensayó el efecto de los antioxidantes sobre la estabilidad de los ingredientes farmacéuticos activos en la formulación líquida. Se prepararon dos formulaciones, F12 y F13, con los antioxidantes mostrados en la Figura 5A. F12 incluyó un 0,05% p/v de EDTA Na₂; no se añadió EDTA Na₂ a F13. Ambas formulaciones incluyeron tampón de citrato Na 50 mM, pH 5,5, cetoprofeno (0,687 mg/mL), amitriptilina HCl (0,227 mg/mL), y oximetazolina HCl (0,227 mg/mL), y un 20% de PEG 400. Además, ambas formulaciones se prepararon en las mismas condiciones, se protegieron de la luz con una cubierta de N₂ después de la combinación y antes del llenado de la formulación en los viales. También se ensayaron formulaciones que contuvieron bisulfito Na o metabisulfito Na.

Como anteriormente, se usó una HPLC en gradiente para cuantificar los tres ingredientes farmacéuticos activos cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl, y las sustancias relacionadas en las formulaciones de soluciones tras el almacenamiento durante treinta días a diferentes temperaturas. Los resultados se muestran en la Figura 5B. Se mejoró especialmente la estabilidad química de amitriptilina HCl en presencia de un 0,05% p/v de EDTA Na₂. El EDTA disódico, un agente quelante, quela los cationes divalentes y previene la oxidación de los ingredientes activos. Como para las formulaciones que contuvieron bisulfito Na o metabisulfito Na, se halló un gran pico de sustancia relacionada con amitriptilina HCl en ambas muestras después del almacenamiento durante treinta días. Datos no mostrados. No se llevaron a cabo experimentos adicionales con el uso de los agentes antioxidantes bisulfito Na o metabisulfito Na.

Ejemplo 6: La formulación líquida de los tres ingredientes farmacéuticos activos es estable durante al menos dos años.

Se seleccionó la siguiente formulación para el análisis del almacenamiento a largo plazo a diferentes temperaturas: citrato Na, pH 5,5; 20% v/v de PEG 400, 0,05% p/v de EDTA Na₂, cetoprofeno (0,687 mg/mL), amitriptilina HCl (0,227 mg/mL), y oximetazolina HCl (0,227 mg/mL). Se disolvió cetoprofeno en un 100% de PEG 400 líquido y se añadió a una solución de citrato Na 50 mM para llevar la solución al volumen final. Así, la concentración final de citrato Na fue de alrededor de 50 mM. Se fabricaron tres lotes con registro cGMP de la formulación, cada uno en un volumen de trescientos litros, y se almacenaron a temperaturas de 5°C, 25°C, 30°C o 40°C para el estudio de la estabilidad a largo plazo. Se tomaron alícuotas de cada lote a intervalos, y se analizó la potencia y la presencia de las sustancias relacionadas. Además, se inspeccionó visualmente el aspecto de los lotes, y también se monitorizó el pH. No se detectaron cambios medibles en el color y el aspecto del producto, el pH de la solución, o la potencia a lo largo de veinticuatro meses en ninguno de los tres lotes de registro almacenados a 5°C o 25°C. Datos no mostrados.

Se detectaron las sustancias relacionadas (SR) mediante HPLC. Se muestra un resumen de los datos de las sustancias relacionadas para un lote representativo en las Figuras 6A y 6B. Después de veinticuatro meses a 5°C, solamente una impureza de cetoprofeno estuvo de manera reproducible por encima del umbral de notificación del 0,08%. Después de veinticuatro meses a 25°C, tres impurezas, una de cada uno de los tres ingredientes farmacéuticos activos, estuvieron por encima del umbral de notificación del 0,08%. Las sustancias relacionadas totales oscilaron del 0,21% al 0,35% después de 24 meses. La extrapolación de estos resultados indica que estas formulaciones serán estables durante al menos tres a cuatro años, y posiblemente durante más tiempo.

La oximetazolina HCl en la formulación líquida permaneció estable durante dos años con un % total representativo de SR del 0,00% a 5°C y alrededor del 0,15% a 25°C. Sin embargo, el % total de SR de oximetazolina HCl se incrementó significativamente a lo largo de dos años cuando se almacenó a 30°C y 40°C, lo que indica que la degradación de oximetazolina HCl es dependiente de la temperatura.

A 25°C y 30°C, el porcentaje de SR de amitriptilina HCl se incrementó a lo largo de los primeros tres meses, y después fue estable durante hasta dos años. A 40°C, el porcentaje de SR de amitriptilina HCl se incrementó durante el primer mes y después se estabilizó. A 4°C, la SR de amitriptilina HCl estuvo presente de manera esporádica. Estos resultados indican que la amitriptilina HCl es estable en la formulación ensayada.

Una impureza de cetoprofeno estuvo ligeramente por encima del umbral de notificación del 0,08%, y no se incrementó con el tiempo en las dos condiciones de temperatura aceleradas, 30°C y 40°C. Este resultado indica que el cetoprofeno también es estable en la formulación ensayada en las cuatro condiciones de almacenamiento.

Ejemplo 7: Los tres ingredientes farmacéuticos activos son compatibles químicamente en la formulación líquida.

La incompatibilidad química entre las moléculas da como resultado cambios o reordenamientos moleculares para formar entidades químicas diferentes. Los fármacos pueden experimentar una diversidad de rutas de degradación química debido a la hidrólisis, oxidación (y reducción), y fotodegradación. Se ensayó la compatibilidad de los ingredientes farmacéuticos activos entre sí y con los excipientes. La formulación de excipientes fue citrato Na, pH 5,5; 20% v/v de PEG 400, 0,05% p/v de EDTA Na₂. Los ingredientes activos se añadieron en las concentraciones siguientes: cetoprofeno (0,687 mg/mL), amitriptilina HCl (0,227 mg/mL), y oximetazolina HCl (0,227 mg/mL). Los tres ingredientes activos y la formulación de excipientes, una formulación de control de vehículo (excipiente), y las formulaciones de cada sustancia farmacológica individual en el control de vehículo se estudiaron en cuanto a su aspecto visual (color y claridad), pH de la solución, potencia, y sustancias relacionadas. Cada una de las cinco formulaciones se preparó simulando el proceso de fabricación del producto final, y se llenaron en el sistema de envase y cierre propuesto para el mercado comercial. Las formulaciones de ensayo se almacenaron en orientaciones erguidas e invertidas a 5°C, 25°C, 30°C y 40°C. Las muestras se analizaron inmediatamente tras la producción y tras un, dos, tres, y seis meses.

Las incompatibilidades físicas relacionadas con los cambios de solubilidad o las interacciones con el envase incluyen la precipitación, turbidez o nebulosidad, los cambios de color o viscosidad, y la formación de capas líquidas inmiscibles. No se observaron tales incompatibilidades en ninguna de las formulaciones ensayadas. Las formulaciones en las orientaciones erguidas e invertidas, a todas las temperaturas, fueron soluciones claras e incoloras a lo largo del estudio de seis meses. Además, no se detectaron cambios del pH durante la investigación.

Se midieron las sustancias relacionadas con los ingredientes farmacéuticos activos en cada formulación. A medida que se incrementaron las temperaturas, se incrementó el número de sustancias relacionadas en cada una de las formulaciones. Se observaron cinco sustancias relacionadas (una de oximetazolina HCl y cuatro de cetoprofeno) en las formulaciones mantenidas a 5°C, mientras se detectaron once sustancias relacionadas (cinco de oximetazolina HCl, dos de amitriptilina HCl, y cuatro de cetoprofeno) en las formulaciones mantenidas a 25°C. Todas las sustancias relacionadas halladas en el producto de tres fármacos se hallaron también en las formulaciones de sustancias farmacológicas individuales. Así, no se generaron nuevos subproductos o impurezas a partir de las interacciones entre los tres ingredientes farmacéuticos activos o entre los tres ingredientes farmacéuticos activos y los excipientes de la formulación.

Ejemplo 8: Estudios adicionales de estabilidad de las formulaciones líquidas.

La adición de EDTA Na₂ mejoró la estabilidad de los ingredientes activos, especialmente de amitriptilina HCl. Las formulaciones sin EDTA Na₂ se ensayaron también con respecto a la estabilidad a largo plazo. Se llevó a cabo un estudio a largo plazo adicional para determinar la estabilidad de una formulación candidata sin EDTA Na₂ a una escala de un litro en comparación con una formulación similar con EDTA Na₂. En los estudios previos de cribado de formulaciones, se usaron matraces aforados de vidrio para la preparación de todas las formulaciones prototipo. Los volúmenes en exceso de las soluciones tampón, tales como los tampones de acetato Na y citrato Na, se hicieron antes de mezclarlos con la solución en PEG 400 de cetoprofeno, y se usaron para alcanzar el volumen de la formulación objetivo. Por lo tanto, no se conoció la cantidad exacta de ácido cítrico monohidrato y citrato Na dihidrato en la solución de la formulación final.

Para producir un producto farmacológico mediante el uso de buenas prácticas de fabricación (GMP), es necesario conocer la cantidad precisa de cada componente de producto farmacológico. Por lo tanto, se añadió ácido cítrico monohidrato sólido y citrato sódico dihidrato a las formulaciones acuosas. A la escala de formulación piloto de un litro, las cantidades por lote de los tres ingredientes farmacéuticos activos, cetoprofeno, amitriptilina HCl, y oximetazolina HCl fueron 687,0 mg/L, 226,5 mg/L, y 214,5 mg/L. Se incluyó un veinte por ciento de PEG 400. Cetoprofeno se disolvió en un 100% de PEG 400. La densidad de PEG 400 es 1,128 g/mL a 25°C. Por lo tanto, un 20% v/v de PEG 400 a una escala de 1 L (200 mL) es 225,60 g/L. Las cantidades por lote de ácido cítrico monohidrato y citrato Na dihidrato se calcularon para que fueran 1,969 g/L y 9,086 g/L, respectivamente. Se determinó que el peso total de un litro de formulación que carecía de EDTA Na₂ fue 1036,09 gramos, con una densidad de aproximadamente 1,036 g/mL. Se calculó que la cantidad por lote del agua para inyección fue 799,00 g/L. Para la formulación con EDTA Na₂, se añadieron 0,500 g/L de EDTA Na₂. Debido a que la cantidad por lote de EDTA Na₂ es mínima, se supone que la densidad de la formulación sin EDTA Na₂ fue la misma que la de la formulación con EDTA Na₂, 1,036 g/mL.

La producción de las formulaciones se llevó a cabo como sigue. Primero, se colocaron 687 mg de cetoprofeno USP en un envase de acero inoxidable de un litro. Con mezcla, se añadieron 225,6 g de PEG 400 al cetoprofeno en el recipiente, y se mezcló durante un mínimo de cinco minutos. Si no se disolvió, se continuó con la mezcla hasta que la disolución fue completa. Se registró la cantidad de PEG 400 añadido y el tiempo de mezcla necesario para disolver el cetoprofeno. Con mezcla, se añadió la cantidad por lote de 799,0 g de agua para inyección (WFI) a la solución de cetoprofeno/PEG 400 en el recipiente y se mezcló durante un mínimo de cinco minutos, o hasta que se obtuvo una solución clara.

Con mezcla, se añadió la cantidad por lote de 1,969 g de ácido cítrico monohidrato USP a la solución en el recipiente, y se mezcló durante un mínimo de cinco minutos o hasta que se disolvió. Con mezcla, se añadió la cantidad por lote de 9,086 g de citrato Na dihidrato USP a la solución en el recipiente, y se mezcló durante un mínimo de cinco minutos o hasta que se disolvió. Con mezcla, se añadió la cantidad por lote de 0,500 g de EDTA Na₂ USP a la solución en el recipiente, y se mezcló durante un mínimo de 5 minutos o hasta que se disolvió. Se añadió EDTA disódico solamente a una formulación.

Con mezcla, se añadió la cantidad por lote de 226,5 g de amitriptilina HCl USP a la solución en el recipiente, y se mezcló durante un mínimo de cinco minutos o hasta que se disolvió. Con mezcla, se añadió la cantidad por lote de 214,5 g de oximetazolina HCl USP a la solución en el recipiente, y se mezcló durante un mínimo de cinco minutos o hasta que se disolvió. Se midió el pH de la formulación final. Se filtraron cincuenta mililitros de la solución a través de un filtro Durapore de 0,22 µm en un recipiente receptor limpio como etapa de acondicionamiento, y el filtro se descartó. La solución restante se filtró a través del filtro Durapore de 0,22 µm preacondicionado en el recipiente receptor, y se registró el tiempo de filtración.

Se dispensaron aproximadamente 20 mL de la solución de cada formulación en uno de dos viales etiquetados. El espacio de aire del vial se purgó con N₂ (cubierta de N₂). Se colocó un tapón en cada vial llenado, y se selló con cierres de aluminio. Los viales se etiquetaron, y se colocaron en las cámaras de estabilidad a 5°C, y se usaron como las muestras de estabilidad en espera a t = 0.

Para la cubierta de N₂ tras la combinación y antes del llenado: El espacio de aire del recipiente de 1 litro se purgó con N₂ durante alrededor de cinco minutos, y la parte superior del recipiente se selló con parafilm. Para la inyección de N₂ tras la combinación y antes del llenado: A la disolución de 1 litro se le inyectó N₂ durante 30 minutos con agitación, y la parte superior del recipiente se selló con parafilm.

A las ocho horas, se extrajeron del recipiente aproximadamente 20 mL de la solución en dos viales etiquetados, y el espacio de aire del vial se purgó con N₂ (cubierta de N₂). Se colocó un tapón en cada vial llenado, y se selló con cierres de aluminio. Los viales se etiquetaron, y se colocaron en cámaras de estabilidad a 5°C antes del análisis mediante HPLC.

Después de veinticuatro horas, se extrajeron del recipiente aproximadamente 20 mL de la solución en dos viales etiquetados, y el espacio de aire del vial se purgó con N₂ (cubierta de N₂). Se colocó un tapón en cada vial llenado, y se selló con cierres de aluminio. Los viales se etiquetaron, y se colocaron en las cámaras de estabilidad a 5°C antes

del análisis mediante HPLC.

Se dispensaron alrededor de 20 mL de la formulación en los viales especificados, y el espacio de aire de los viales se purgó con N₂ durante quince segundos (cubierta de N₂). Se colocó un tapón en cada vial llenado, y se selló con cierres de aluminio. Los viales se etiquetaron, y se colocaron en las siguientes cámaras de estabilidad a 5°C, 25°C, 30°C y 40°C. En cada punto de tiempo, se retiró una muestra por formulación por condición de almacenamiento y se sometió a análisis visual, análisis del pH, ensayo de la potencia de los ingredientes activos (es decir, cetoprofeno, amitriptilina HCl y oximetazolina HCl), y las sustancias relacionadas. El espacio de aire del recipiente de 1 litro de la solución restante se purgó con N₂ (cubierta de N₂) durante alrededor de cinco minutos, y la parte superior del recipiente se selló con parafilm.

5 A las 32 horas, se extrajeron del recipiente aproximadamente 20 mL de la solución en dos viales etiquetados, y el espacio de aire del vial se purgó con N₂ (cubierta de N₂). Se colocó un tapón en cada vial llenado, y se selló con cierres de aluminio. Los viales se etiquetaron, y se colocaron en las cámaras de estabilidad a 5°C antes del análisis mediante HPLC.

10 A las 48 horas, se extrajeron del recipiente aproximadamente 20 mL de la solución en dos viales etiquetados, y el espacio de aire del vial se purgó con N₂ (cubierta de N₂). Se colocó un tapón en cada vial llenado, y se selló con cierres de aluminio. Los viales se etiquetaron, y se colocaron en las cámaras de estabilidad a 5°C antes del análisis mediante HPLC.

Resultados

20 El cetoprofeno se disolvió fácilmente en las soluciones de PEG 400 agitando brevemente durante 6-10 minutos. Los valores de pH medidos de las formulaciones sin EDTA Na₂ con cubierta de N₂ e inyección de N₂ fueron de alrededor de 5,76, debido a la naturaleza básica de PEG 400. Los valores de pH medidos de las formulaciones que contenían EDTA Na₂, cubierta de N₂ e inyección de N₂ fueron de alrededor de 5,73, solamente ligeramente inferior a 5,76 de las formulaciones sin EDTA Na₂, debido a la adición del EDTA Na₂ ácido. Las cuatro formulaciones fueron soluciones claras después de la combinación, y permanecieron claras durante el almacenamiento mediante análisis visual.

25 Se determinó la estabilidad combinada en bruto de las formulaciones a temperatura ambiente en los puntos de tiempo de 0, 8, 24, 32 y 48 horas. Tal como se ensayaron mediante la potencia y la ausencia de sustancias relacionadas, las cuatro formulaciones fueron estables a lo largo del periodo de espera de 48 horas.

30 Tras el estudio en espera combinado en bruto de 48 horas, los cuatro lotes de material se colocaron en un programa de estabilidad y se ensayaron con respecto a la potencia y las sustancias relacionadas. Después de seis meses, los datos de potencia resultantes de estos ensayos no mostraron ningún cambio significativo.

Las sustancias relacionadas con oximetazolina HCl fueron muy bajas a lo largo de seis meses, p.ej., menores del 1%. A 60°C, todas las formulaciones mostraron al menos cierta degradación mínima de oximetazolina HCl a 60°C.

35 La amitriptilina HCl se degradó más que la oximetazolina HCl a lo largo de seis meses. Las formulaciones con EDTA Na₂ tuvieron menos degradación de amitriptilina HCl que las formulaciones sin EDTA Na₂. En todas las muestras, las sustancias relacionadas con amitriptilina HCl estuvieron presentes en menos del 5%. La degradación de amitriptilina HCl no pareció verse afectada por la inyección de N₂ durante la combinación de las muestras.

La degradación de cetoprofeno fue mínima después de seis meses, incluso a las temperaturas de estabilidad acelerada. Las sustancias relacionadas estuvieron presentes en menos del 1,5%.

40 Como se muestra en la Figura 7, las sustancias relacionadas totales después de seis meses fueron mínimas en todas las formulaciones, es decir, un 3% o menos. La inyección de N₂ en la formulación en bruto durante la combinación no tuvo un efecto aparente sobre la estabilidad del producto final.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica líquida estable que comprende una solución de 550 µM a 1 M de cetoprofeno, 55 µM a 1 M de amitriptilina, 350 µM a 1 M de oximetazolina, 1-100% (v/v) de poliol, y 10-500 mM de citrato Na, pH 4,5-7,0.
- 5 2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la concentración de poliol es del 15-25% (v/v).
3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el poliol es PEG 400.
4. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la formulación es una formulación acuosa que comprende un 75-85% (v/v) de agua.
5. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el pH tiene un valor entre 5,2 y 5,8.
- 10 6. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el pH tiene un valor entre 5,4 y 5,6.
7. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el cetoprofeno, amitriptilina, oximetazolina son estables durante al menos seis meses, por ejemplo, al menos doce meses cuando se almacenan a una temperatura de entre 2°C y 30°C.
8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el cetoprofeno, amitriptilina, oximetazolina son estables durante al menos veinticuatro meses cuando se almacenan a una temperatura de entre 2°C y 30°C.
- 15 9. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además un 0,01-0,5% (p/v) de EDTA Na₂.
10. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la concentración de EDTA Na₂ es del 0,05% (p/v).
11. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la concentración de Citrato Na es de alrededor de 50 mM.
- 20 12. Una formulación farmacéutica líquida que comprende 0,1-1,0 g/L de cetoprofeno, 0,05-0,5 g/L de amitriptilina, 0,05-0,5 g/L de oximetazolina, alrededor del 0,002-1,0% (p/v) de EDTA Na₂, y 10-500 mM de citrato Na, en un medio que comprende un 10-70% (v/v) de PEG 400 y 30-90% v/v de agua, con un pH de 5,0-6,2, en la que el cetoprofeno, amitriptilina, y oximetazolina son solubles, y en la que el cetoprofeno, amitriptilina, oximetazolina son estables durante al menos seis meses cuando se almacenan a una temperatura de entre 2°C y 30°C.

25

Gradiente:	Tiempo	%A	%B
	0.0	100	0
	18	100	0
	19	0	100
	28	0	100
	28.1	100	0
	30	100	0

Fase móvil A: 62/38 Tampón de KH_2PO_4 , 25 mM, pH 2,5 / Acetonitrilo
 Fase móvil B: 35/65 Tampón de KH_2PO_4 , 25 mM, pH 2,5 / Acetonitrilo

FIG. 1A

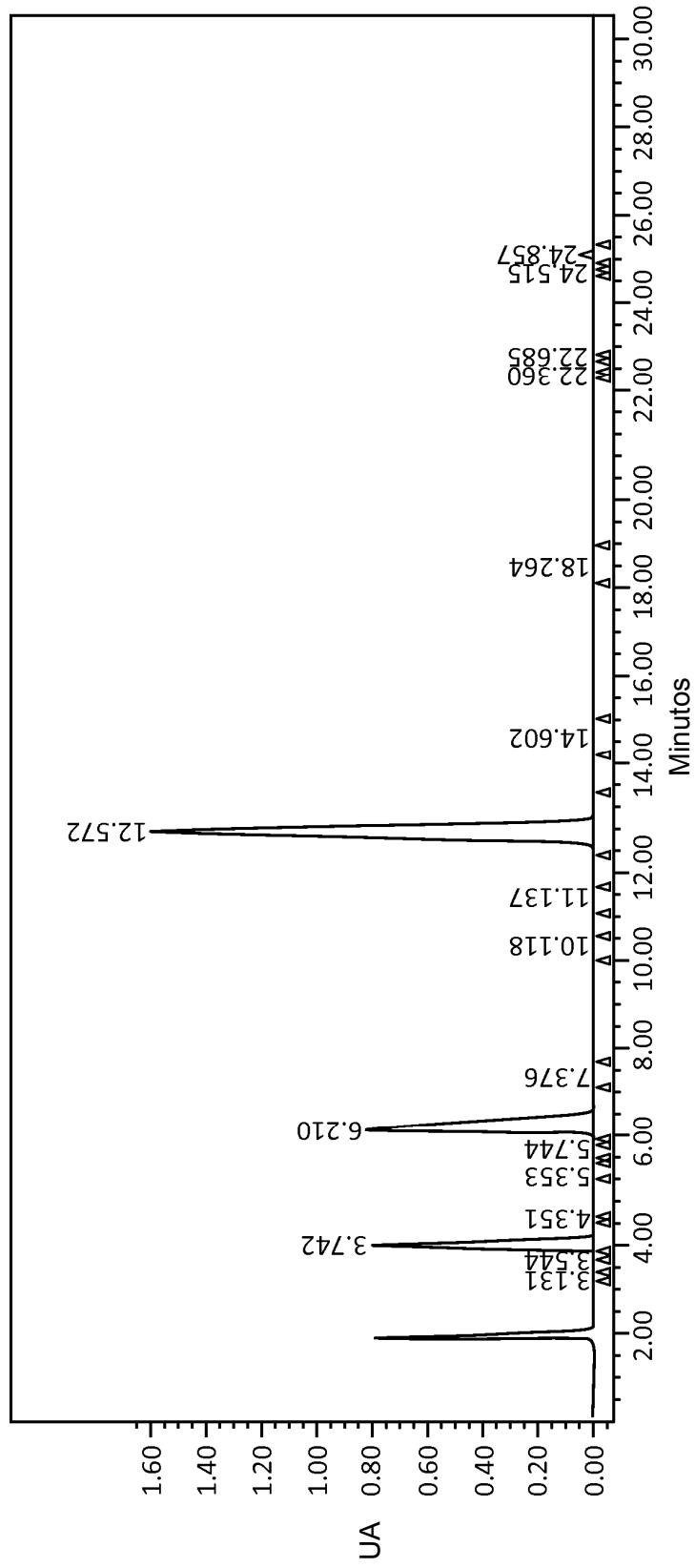


FIG. 1B

ID Formulación	Tampón de formulación
F6	Tampón acetato Na 50 mM pH 5,5
F7	Tampón citrato Na 50 mM pH 5,5

FIG. 2A

Muestra	Tiempo (días)	4°C				25°C				40°C				60°C			
		SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	Total (%)	SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	Total (%)	SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	Total (%)	SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	Total (%)
F6	0	3.56	0.02	0.08	3.66	3.56	0.02	0.08	3.66	3.56	0.02	0.08	3.66	3.56	0.02	0.08	3.66
	7	3.96	0.03	2.12	6.11					4.09	0.46	3.23	7.78	4.20	2.95	6.28	13.43
	14	4.03	0.05	2.03	6.11					4.10	0.94	3.87	8.91	4.14	3.92	9.00	17.06
	28	3.98	0.08	1.40	5.46	4.45	0.19	2.26	6.90	4.01	1.40	4.44	9.85	4.06	4.04	10.45	18.55
	56	4.42	0.11	1.76	6.29	4.12	0.38	2.52	7.02	4.21	2.65	5.19	12.05	4.19	8.38	6.76	19.33
	84	4.02	0.08	1.89	5.99	3.82	0.31	2.99	7.12	3.15	2.58	5.56	11.29	3.56	14.49	4.89	22.94
F7	0	1.14	0.00	0.00	1.14	1.14	0.00	0.00	1.14	1.14	0.00	0.00	1.14	1.14	0.00	0.00	1.14
	7	1.36	0.00	0.11	1.47					1.29	0.04	0.12	1.45	1.22	0.53	0.14	1.89
	14	1.66	0.00	2.15	3.81					1.49	0.08	3.28	4.85	1.32	0.95	5.27	7.54
	28	1.52	0.05	2.13	3.70	1.38	0.06	2.43	3.87	1.43	0.22	3.76	5.41	1.40	1.83	6.20	9.43
	56	1.34	0.05	2.01	3.40	1.43	0.06	3.67	5.16	3.30	0.36	3.54	7.20	1.75	3.42	6.94	12.11
	84	1.46	0.05	1.56	3.07	1.48	0.06	2.66	4.20	1.47	0.51	3.72	5.70	0.87	3.66	7.37	11.90

FIG. 2B

ID Formulación	Tampón de formulación	Concentración de fármacos (Cetoprofeno/Amitriptilina HCl/Oximetazolina HCl)
F8	Tampón citrato Na 50 mM pH 6,5	1.370/0.452/0.427 (mg/mL)
F9	Tampón citrato Na 50 mM pH 5,5	0.687/0.227/0.215 (mg/mL)

FIG. 3A

Muestra	Tiempo (días)	4°C				25°C				40°C				60°C			
		SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	Total (%)	SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	Total (%)	SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	Total (%)	SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	Total (%)
F8	0	1.05	0.00	0.00	1.05	1.05	0.00	0.00	1.05	1.05	0.00	0.00	1.05	1.05	0.00	0.00	1.05
	7	1.04	0.00	2.09	3.13					1.00	0.11	6.05	7.16	1.14	1.80	12.23	15.17
	14	1.25	0.00	2.36	3.61					1.13	0.22	7.96	9.31	1.11	3.94	13.98	19.03
	28	1.25	0.04	2.39	3.68	1.32	0.08	3.94	5.34	1.05	0.70	9.15	10.90	1.19	10.60	15.91	27.70
	56	0.89	0.00	2.75	3.64	0.84	2.44	4.97	8.25	1.24	1.53	9.60	12.37	0.13	16.44	14.74	31.31
F9	84	1.14	0.04	2.99	4.17	1.25	0.10	5.48	6.83	1.09	1.97	9.99	13.05	1.34	20.43	18.94	40.71
	0	1.14	0.00	0.00	1.14	1.14	0.00	0.00	1.14	1.14	0.00	0.00	1.14	1.14	0.00	0.00	1.14
	7	1.36	0.00	0.11	1.47					1.29	0.04	0.12	1.45	1.22	0.53	0.14	1.89
	14	1.66	0.00	2.15	3.81					1.49	0.08	3.28	4.85	1.32	0.95	5.27	7.54
	28	1.52	0.05	2.13	3.70	1.38	0.06	2.43	3.87	1.43	0.22	3.76	5.41	1.40	1.83	6.20	9.43
	56	1.34	0.05	2.01	3.40	1.43	0.06	3.67	5.16	3.30	0.36	3.54	7.20	1.75	3.42	6.94	12.11
	84	1.46	0.05	1.56	3.07	1.48	0.06	2.66	4.20	1.47	0.51	3.72	5.70	0.87	3.66	7.37	11.90

FIG. 3B

ID Formulación	Condiciones
F10	Protección de la luz y cubierta de N ₂
F11	Nada

FIG. 4A

Muestra	Tiempo (días)	4°C				25°C				30°C				40°C			
		SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)	SR Ceto (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Total (%)
F10	0	0.05	0.03	0.04	0.12	0.05	0.03	0.04	0.12	0.05	0.03	0.04	0.12	0.05	0.03	0.04	0.12
	0.3					0.00	0.03	0.00	0.03								
	1					0.00	0.03	0.00	0.03								
	1.3					0.00	0.00	0.12	0.12								
	2					0.00	0.00	0.07	0.07								
	30	0.00	0.04	0.25	0.29	0.00	0.28	0.18	.046	0.00	0.81	0.11	0.92	0.15	1.56	0.41	2.12
F11	0	1.14	0.00	0.00	1.14	1.14	0.00	0.00	1.14					1.14	0.00	0.00	1.14
	7	1.36	0.00	0.11	1.47									1.29	0.04	0.12	1.45
	14	1.66	0.00	2.15	3.81									1.49	0.08	3.28	4.85
	28	1.52	0.05	2.13	3.70	1.38	0.06	2.43	3.87					1.43	0.22	3.76	5.41

FIG. 4B

ID Formulación	Antioxidante
F12	0,05% p/v de EDTA Na
F13	Nada

FIG. 5A

Muestra	Tiempo (días)	4°C				25°C				30°C				40°C			
		SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)
	0	0.05	0.03	0.00	0.08	0.05	0.03	0.00	0.08	0.05	0.03	0.00	0.08	0.05	0.03	0.00	0.08
	0.3					0.05	0.03	0.00	0.08								
	1					0.06	0.03	0.00	0.09								
	1.3					0.05	0.00	0.08	0.13								
	2					0.05	0.00	0.00	0.05								
	30	0.00	0.26	0.17	.043	0.06	0.20	0.89	1.15	0.05	0.37	0.23	0.65	0.25	0.50	0.71	1.46
	0	0.05	0.03	0.04	0.12	0.05	0.03	0.04	0.12	0.05	0.03	0.04	0.12	0.05	0.03	0.04	0.12
	0.3					0.00	0.03	0.00	0.03								
	1					0.00	0.03	0.00	0.03								
	1.3					0.00	0.00	0.12	0.12								
	2					0.00	0.00	0.07	0.07								
	30	0.00	0.04	0.25	0.29	0.00	0.28	0.18	0.46	0.00	0.81	0.11	0.92	0.15	1.56	0.41	2.12

FIG. 5B

Tiempo (meses)	Configuración	5 ± 3 °C				25 ± 3 °C			
		SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)
0	Erguido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Invertido	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	Erguido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.12	0.24
	Invertido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.11	0.24
6	Erguido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.10	0.00	0.18
	Invertido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.09
9	Erguido	0.14	0.20	0.08	0.42	0.32	0.14	0.00	0.46
	Invertido	0.26	0.00	0.09	0.35	0.00	0.15	0.00	0.15
12	Erguido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.10	0.00	0.24
	Invertido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	0.09	0.00	0.21
18	Erguido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.09	0.00	0.31
	Invertido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18	0.09	0.00	0.27
24	Erguido	0.00	0.00	0.13	0.13	0.14	0.10	0.09	0.33
	Invertido	0.00	0.00	0.11	0.11	0.16	0.09	0.10	0.35

FIG. 6A

Tiempo (meses)	Configuración	30 ± 3°C				40 ± 3°C			
		SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)	SR Oxi (%)	SR Ami (%)	SR Ceto (%)	SR Total (%)
0	Erguido	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Invertido	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1	Erguido	N/A	N/A	N/A	N/A	0.20	0.20	0.00	0.40
	Invertido	N/A	N/A	N/A	N/A	0.20	0.20	0.00	0.40
2	Erguido	N/A	N/A	N/A	N/A	0.38	0.15	0.00	0.53
	Invertido	N/A	N/A	N/A	N/A	0.40	0.15	0.00	0.55
3	Erguido	0.17	0.16	0.12	0.45	0.59	0.21	0.00	0.80
	Invertido	0.16	0.18	0.11	0.45	0.60	0.21	0.00	0.81
6	Erguido	0.33	0.16	0.00	0.49	1.36	0.21	0.00	1.57
	Invertido	0.32	0.15	0.00	0.47	1.28	0.20	0.00	1.48
12	Erguido	0.44	0.14	0.00	0.58	N/A	N/A	N/A	N/A
	Invertido	0.47	0.13	0.00	0.60	N/A	N/A	N/A	N/A

FIG. 6B

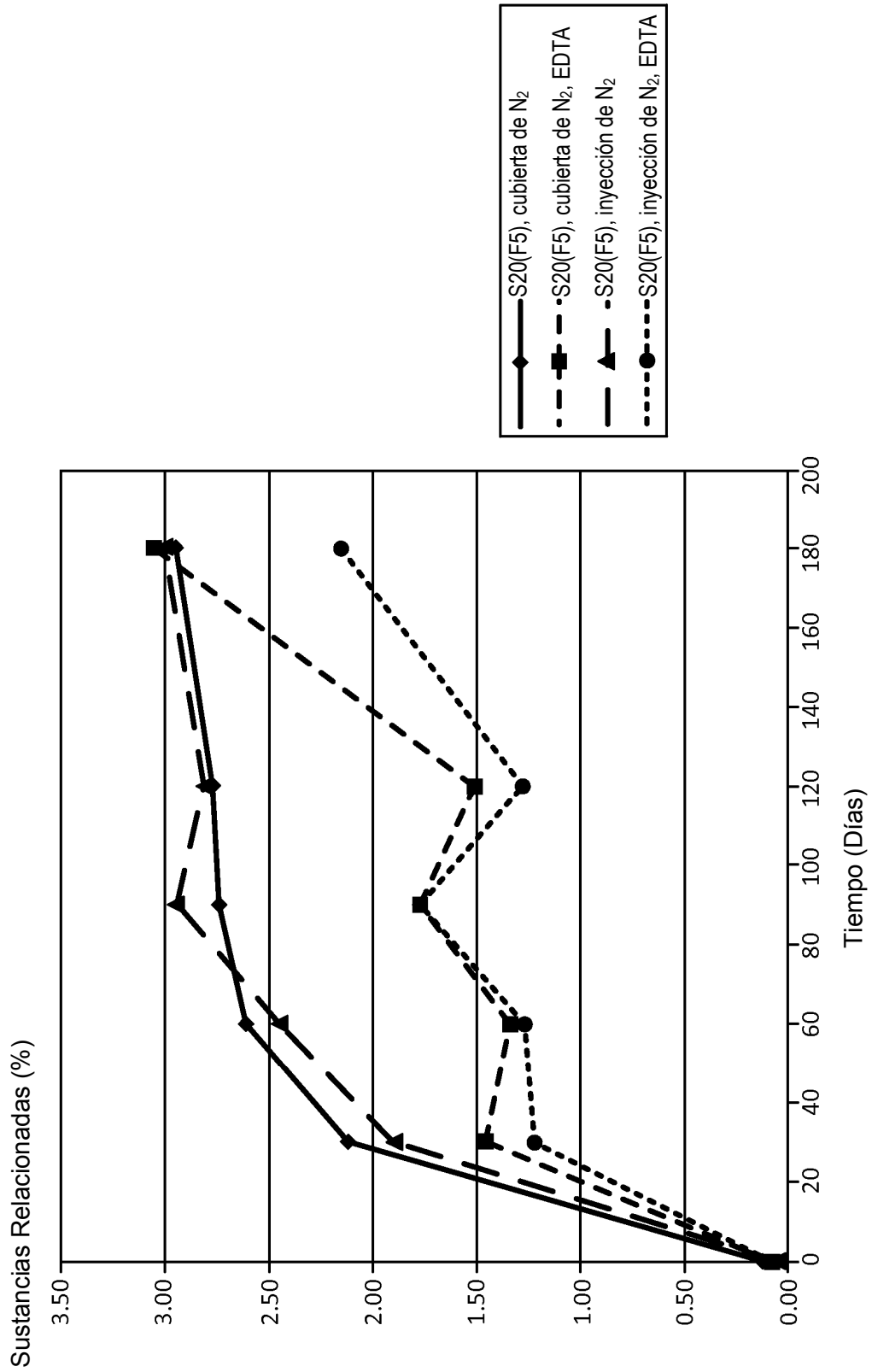


FIG. 7