

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 094**

51 Int. Cl.:

A61K 9/26 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

A61P 33/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2011** **PCT/EP2011/070592**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012** **WO12069427**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2011** **E 11788425 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 2642981**

54 Título: **Formas de dosificación sólida de oleil fosfolina**

30 Prioridad:

22.11.2010 WO PCT/EP2010/067926

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

26.09.2017

73 Titular/es:

OBLITA THERAPEUTICS BVBA (100.0%)
Rodendijk 40
2980 Zoersel, BE

72 Inventor/es:

JANSEN, FRANS HERWIG

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 634 094 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

Formas de dosificación sólida de oleil fosfolina

- 5 [0001] La presente invención se refiere a formas de preparacióndosificación sólida de oleil fosfolina (C18:1-PC), u OIPC, para administración oral.
- [0002] La miltefosina (MIL) pertenece al grupo químico de alquilfosfolinas y se utiliza generalmente para el tratamiento de la leishmaniosis visceral (LV). Sus ventajas particulares son una vía de administración oral y no se observa resistencia cruzada con cualquier otra terapia anti-leishmaniosis de primera y segunda línea.
- 10 [0003] Aunque tres nuevos fármacos o formulaciones de fármacos, incluyendo las miltefosina (anfotericina B liposomal, miltefosina y paromomicina) están disponibles actualmente para el tratamiento de la leishmaniosis, todos ellos sufren cualquiera de las limitaciones de costes, toxicidad o la necesidad de administración parenteral.
- 15 [0004] Una alternativa para la miltefosina es la alquiloleil fosfolina fosfolina (C18:1 PC), u OIPC, proporcionando, entre otras cosas, un tratamiento más eficaz de las enfermedades parasitarias tales como la leishmaniosis y la malaria tanto en los seres humanos como en los animales.
- 20 [0005] Aunque se sugiere el uso de oleil fosfolina para el tratamiento de varias enfermedades, las formulaciones sugeridas de oleil fosfolina son generalmente soluciones, suspensiones o emulsiones. Especialmente para la administración oral, hay una necesidad en la técnica para proporcionar oleil fosfolina en formas de dosificación sólida, tales como en forma de comprimidos.
- 25 [0006] La WO 2006/042751 divulga formulaciones sólidas que comprenden alquilfosfolinas, tales como oleil fosfolinas y comprimidos que comprenden excipientes tales como almidón o lactosa.
- [0007] La oleil fosfolina tiene un punto de fusión bajo (56.3 ° C), tamaño y forma de partícula irregular y es muy higroscópica. Estas características limitan en gran medida el desarrollo de formas de dosificación sólida, tales como comprimidos o rellenos de cápsulas, debido a las dificultades en la obtención de una mezcla homogénea de polvo seco que permite, por ejemplo, el moldeo por compresión en forma de comprimidos o la carga de cápsulas.
- 30 [0008] Con respecto a las formas de dosificación sólida de oleil fosfolina, también es importante tener en cuenta la estabilidad de la formulación. Por ejemplo, una forma de dosificación sólida de oleil fosfolina es preferiblemente estable durante períodos prolongados de tiempo, tal como al menos 1 año, en un rango de temperatura de 0°C a 40°C y una humedad relativa en el rango de 20% a 80 %.
- 35 [0009] Los factores adicionales a considerar en el diseño de formas de dosificación sólida de oleil fosfolina son las características de friabilidad, solubilidad y desintegración.
- 40 [0010] Es un objeto de la presente invención, entre otros objetos, proporcionar formas de dosificación sólida de oleil fosfolina, y formas de dosificación sólida, especialmente de oleil fosfolina para la administración oral a seres humanos y animales que satisfacen al menos uno, si no todos, las consideraciones anteriores expuestas.
- 45 [0011] El objeto anterior, entre otros objetos, se cumple por una forma de dosificación sólida de oleil fosfolina para la administración oral tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.
- [0012] Se divulga una forma de dosificación sólida de oleil fosfolina para la administración oral que comprende:
- 50 - 6 a 25% por peso de la forma de dosificación sólida de oleil fosfolina;
- 75 a 94% por peso de la forma de dosificación sólida de uno o más rellenos, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

[0013] A menos que se indique lo contrario, los porcentajes por peso que se presentan en este documento son porcentajes por peso con respecto al peso total de la forma de dosificación oral final.

[0014] Los diluyentes o rellenos adecuados según la presente invención se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste de carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), fosfato de calcio (tribásico), sulfato de calcio, celulosa, celulosa microcristalina, celulosa microcristalina modificada con sílice, celulosa en polvo, dextratos, dextrosa, fructosa, lactitol, monohidrato de lactosa, carbonato de magnesio, maltitol, maltodextrina, maltosa, manitol, cloruro de sodio, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, sacarosa, azúcar compresible, esferas de azúcar, talco, xilitol y combinaciones de los mismos.

[0015] Los aglutinantes adecuados de acuerdo con la presente invención se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste de agua, mucílago de acacia, ácido algínico, carbómero, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, etilcelulosa, gelatina, glucosa líquida, goma de guar, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil celulosa de baja sustitución, hidroxipropilmetilcelulosa, silicato de aluminio de magnesio, maltodextrina, metilcelulosa, polidextrosa, óxido de polietileno, povidona, copovidona, alginato de sodio, pasta de almidón, almidón pregelatinizado, sacarosa (jarabe) y combinaciones de los mismos.

[0016] Los lubricantes adecuados se pueden seleccionar preferiblemente del grupo que consiste en estearato de calcio, ácido fumárico, behenato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado, lauril sulfato de magnesio, estearato de magnesio, polietilenglicol 4000 ó 6000, lauril sulfato de sodio, estearil fumarato de sodio, almidón, ácido esteárico, talco, estearato de zinc y combinaciones de los mismos.

[0017] Los desintegrantes adecuados se pueden seleccionar del grupo que consiste en almidón, celulosa microcristalina, ácido algínico, metil celulosa, almidón de glicolato sódico, croscarmelosa sódica, crospovidona, silicato de calcio y combinaciones de los mismos.

[0018] La forma de dosificación sólida proporciona una friabilidad de menos de 1% por peso, preferiblemente menos de 0.5% por peso, de la forma de dosificación sólida tal como se determina de acuerdo con la prueba estándar de friabilidad de la Farmacopea Europea 2.9.7 y/o la presente forma de dosificación sólida proporciona una desintegración de menos de 15 minutos, preferiblemente menos de 10 minutos, tal como se determina de acuerdo con la prueba de desintegración estándar de la Farmacopea Europea 2.9.1 (disolución en 900 ml de HCl 0.1 N).

[0019] Las formas de dosificación sólida proporcionan por lo menos 85% por peso de liberación de oleil fosfocolina en 30 minutos, como se ha determinado de conformidad con la prueba de disolución estándar de las Farmacopea Europea 2.9.3.

[0020] Las formas de dosificación sólida divulgadas pueden comprender:

- 6 a 25% por peso de la forma de dosificación sólida de oleil fosfocolina;
- 20 a 35% por peso de la forma de dosificación sólida de un diluyente o relleno, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), fosfato de calcio (tribásico), sulfato de calcio, celulosa, celulosa microcristalina, celulosa microcristalina modificada con sílice, celulosa en polvo, dextratos, dextrosa, fructosa, lactitol, monohidrato de lactosa, carbonato de magnesio, maltitol, maltodextrina, maltosa, manitol, cloruro de sodio, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, sacarosa, azúcar compresible, esferas de azúcar, talco, xilitol y combinaciones de los mismos.
- 36 a 60% por peso de la forma de dosificación sólida de un aglutinante, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en agua, mucílago de acacia, ácido algínico, carbómero, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, etilcelulosa, gelatina, glucosa líquida, goma de guar, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil celulosa de baja sustitución, hidroxipropilmetilcelulosa, silicato de aluminio de magnesio, maltodextrina, metilcelulosa, polidextrosa, óxido de polietileno, povidona, copovidona, alginato de sodio, pasta de almidón, almidón pregelatinizado, sacarosa (jarabe) y combinaciones de los mismos.
- 5 a 20% por peso de la forma de dosificación sólida de un desintegrante, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en almidón, celulosa microcristalina, ácido algínico, metil celulosa, almidón de glicolato sódico, croscarmelosa sódica, crospovidona, silicato de calcio y combinaciones de los mismos;

- 0.05 a 1% por peso de la forma de dosificación sólida de un lubricante, seleccionado del grupo que consiste en estearato de calcio, ácido fumárico, behenato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado, lauril sulfato de magnesio, estearato de magnesio, polietilenglicol 4000 o 6000, lauril sulfato de sodio, estearil fumarato de sodio, almidón, ácido esteárico, talco, estearato de zinc y combinaciones de los mismos.

[0021] Las formas de dosificación sólida pueden comprender:

- 6 a 25% por peso de la forma de dosificación sólida de oleil fosfocolina;
- 20 a 35% por peso de la forma de dosificación sólida de lactosa, monohidrato de lactosa preferiblemente;
- 35 a 50% por peso de la forma de dosificación sólida de celulosa, preferiblemente celulosa microcristalina;
- 5 a 20% por peso de la forma de dosificación sólida de croscarmelosa, preferentemente croscarmelosa sódica;
- 1 a 10% por peso de la forma de dosificación sólida de hidroxipropilmetilcelulosa; y
- 0.05 a 1% por peso de la forma de dosificación sólida de un lubricante, preferiblemente estearato de magnesio.

[0022] Las formas de dosificación sólida pueden comprender:

- 10 a 15% por peso de la forma de dosificación sólida de oleil fosfocolina;
- 25 a 30% por peso de la forma de dosificación sólida de lactosa, preferiblemente monohidrato de lactosa;
- 42 a 47% por peso de la forma de dosificación sólida de celulosa, preferiblemente celulosa microcristalina;
- 10 a 15% por peso de la forma de dosificación sólida de croscarmelosa, preferentemente croscarmelosa sódica;
- 1 a 5% por peso de la forma de dosificación sólida de hidroxipropilmetilcelulosa; y
- 0.1 a 0.3% por peso de la forma de dosificación sólida de un lubricante, preferiblemente estearato de magnesio.

[0023] Las formas de dosificación sólida pueden comprender:

- 12 a 14, preferiblemente 13% por peso, de la forma de dosificación sólida de oleil fosfocolina;
- 27 a 29, preferiblemente 28% por peso, de la forma de dosificación sólida de lactosa, preferiblemente monohidrato de lactosa;
- 43 a 45, preferiblemente 44% por peso, de la forma de dosificación sólida de celulosa, preferentemente celulosa microcristalina;
- 11 a 13, preferiblemente 12% por peso, de la forma de dosificación sólida de croscarmelosa, preferentemente croscarmelosa sódica;
- 2 a 4, preferiblemente 3% por peso, de la forma de dosificación sólida de hidroxipropilmetilcelulosa; y
- 0.1 a 0.3, preferiblemente 0.2,% por peso de la forma de dosificación sólida de un lubricante, preferiblemente estearato de magnesio.

[0024] Las formas de dosificación sólida pueden estar en forma de un comprimido, tal como un comprimido que comprende un núcleo interno compuesto de:

- 12 a 14, preferiblemente 13% por peso, de la forma de dosificación sólida de oleil fosfocolina;
 - 27 a 29, preferiblemente 28% por peso, de la forma de dosificación sólida de lactosa, preferiblemente monohidrato de lactosa;
 - 43 a 45, preferiblemente 44% por peso, de la forma de dosificación sólida de celulosa, preferentemente celulosa microcristalina;
 - 5 a 7, preferiblemente 6% por peso, de la forma de dosificación sólida de croscarmelosa, preferentemente croscarmelosa sódica;
 - 2 a 4, preferiblemente 3% por peso, de la forma de dosificación sólida de hidroxipropilmetilcelulosa; y
- una capa exterior compuesta por:
- 5 a 7, preferiblemente 6% por peso, de la forma de dosificación sólida de croscarmelosa, preferentemente croscarmelosa sódica; y
 - 0.1 a 0.3, preferiblemente 0.2,% por peso de la forma de dosificación sólida de un lubricante, preferiblemente estearato de magnesio.

[0025] La presente invención se refiere a un método para la preparación de las presentes formas de dosificación sólida, el uso de los porcentajes por peso presentados anteriormente, que comprende las etapas de:

- a) añadir a una mezcla seca que comprende uno o más vehículos diluyentes/rellenadores, desintegrantes y/o aglutinantes farmacéuticamente aceptables que comprenden de 6 a 25% por peso de la forma de dosificación sólida de oleil fosfocolina;

- b) secado y tamizado de la mezcla obtenida en la etapa (a);
- c) la adición de uno o más desintegrantes y / o lubricantes a la mezcla obtenida en la etapa (b);
- d) mezclar la mezcla obtenida en la etapa (c);
- e) la preparación de una forma de dosificación oral de la mezcla de la etapa (d), preferentemente por moldeo por compresión.

[0026] Las formas de dosificación sólida de OIPC se obtienen por medio de la compresión de los gránulos resultantes de la granulación húmeda. Este proceso de pre-tratamiento de sólidos antes de la compresión sirve para varios propósitos:

- aumentar el tamaño de las partículas para mejorar la fluidez;
- mejorar las características de compresión; y
- prevenir la segregación de partículas.

[0027] Un proceso de granulación húmeda clásico, en un primer paso, implica la preparación de una mezcla de polvo seco que contiene el ingrediente activo farmacéutico (IFA), uno o más rellenos/diluyentes, un aglutinante y un desintegrante.

[0028] La incapacidad para producir una mezcla seca homogénea con OIPC condujo al desarrollo del presente procedimiento de granulación húmeda alternativa. En este nuevo procedimiento, se prepara una mezcla de polvo seco sin la presencia de los IFA. Los IFA se disuelven en el líquido de granulación y la solución obtenida se utiliza para granular la mezcla en polvo seca previamente preparada. Esto permite una distribución homogénea de los IFA de la segregación en la prevención de formulación debido al tamaño/forma de las partículas irregulares.

[0029] De acuerdo con una modalidad preferida de este aspecto, la presente invención se refiere a un método para la preparación de las presentes formas de dosificación sólida, utilizando los porcentajes por peso presentados anteriormente, que comprenden las etapas de:

- a) añadir a una mezcla seca que comprende lactosa, preferiblemente monohidrato de lactosa, celulosa, preferiblemente, celulosa microcristalina, croscarmelosa, preferentemente croscarmelosa sódica e hidroxipropilmetilcelulosa que comprende 6 a 25% por peso de la forma de dosificación sólida de oleil fosfocolina;
- b) secar y tamizar la mezcla obtenida en la etapa (a);
- c) añadir croscarmelosa, preferiblemente croscarmelosa sódica y un lubricante, preferiblemente estearato de magnesio, a la mezcla obtenida en la etapa (b);
- d) mezclar la composición obtenida en la etapa (c); y
- e) preparar una forma de dosificación oral de la mezcla de la etapa (d), preferentemente por moldeo por compresión.

[0030] Los métodos de acuerdo con la presente invención comprenden preferiblemente una primera etapa de tamizado, preferiblemente a través de un tamiz de 1400 nm, antes del secado y una segunda etapa de tamizado después del secado, preferiblemente a través de un tamiz de 710 nm.

[0031] Se describen formas de dosificación sólida que se pueden obtener por los presentes métodos.

[0032] La presente invención será aún más detallada en los siguientes ejemplos que muestran las modalidades no limitativas preferidas de la presente invención. En los ejemplos presentados a continuación, se hace referencia a las figuras en las que:

- La Figura 1 muestra la fórmula estructural del OIPC ($C_{23}H_{48}NO_4P$);
- La Figura 2 muestra una representación esquemática de un proceso de formulación preferida de las presentes formas de dosificación sólida de oleil fosfocolina;
- La Figura 3 muestra el perfil medio de disolución de los comprimidos de OIPC;
- La Figura 4 muestra la eficacia de la dosis comparando las administraciones orales únicas y múltiples de 25, 50, y 100 mg de dosis total/kg en comparación con el control de VIC en A) hígado, B) bazo y C) médula ósea.

Ejemplos

[0033]

Lista de excipientes farmacéuticamente aceptables probados en los procesos de formulación

- 1) Celulosa microcristalina (Avicel® PH 101) se utilizó como aglutinante/diluyente. Avicel PH 101 tiene un tamaño medio de partícula de 50 µm y se utiliza sobre todo para la granulación húmeda.
- 2) Monohidrato de lactosa (Pharmatose® 200M) se utilizó como relleno/aglutinante. El compuesto generalmente mejora las propiedades de compresión de la mezcla de polvos y gránulos.
- 3) Polivinilpirrolidona (Kollidon® 30) es una polivinilpirrolidona soluble, que se obtiene por polimerización de radicales de N-vinilpirrolidona con un Mv de peso molecular de 31.700 a 51.400 Da.
- 4) Hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel® E15 LV). La hidroxipropilmetilcelulosa se usa como aglutinante de comprimidos. La concentración entre el 2-5% p/p se puede utilizar en cualquiera de granulación húmeda o seca.
- 5) La croscarmelosa sódica (Ac-Di-Sol®) se utiliza como desintegrante. En la producción de comprimidos, la croscarmelosa sódica se puede utilizar tanto en la compresión directa como en los procesos de granulación húmeda. Cuando se utiliza en la granulación directa, la croscarmelosa sódica se podría añadir en las etapas húmedas y secas del proceso (intra y extra granular) para que la capacidad completa de mecha/inflamación del desintegrante se pueda utilizar.
- 6) Agua purificada. El agua purificada se puede preparar por destilación, por intercambio iónico, por ósmosis inversa o por cualquier otro método adecuado de agua que cumpla con las regulaciones sobre el agua destinada al consumo humano.

Técnicas utilizadas para evaluar la idoneidad de las presentes formulaciones

[0034]

- 1) Desintegración, Ph. Eur. 2.9.1. Esta prueba determina si los comprimidos o cápsulas se desintegran en el tiempo prescrito cuando se colocan en un medio líquido bajo las condiciones experimentales. Para fines de esta prueba, la desintegración no implica la disolución completa de la unidad o incluso de su constituyente activo. La desintegración completa se define como el estado en que cualquier residuo de la unidad, excepto fragmentos de revestimiento insoluble o cubierta de cápsula, que quedan en la pantalla del aparato de ensayo o que se adhieren a la superficie inferior de los discos, si se usan, es una masa blanda que no tiene núcleo firme palpable.
- 2) Fluidez, Ph. Eur. 2.9.16. Esta prueba determina la capacidad de los sólidos divididos (por ejemplo, polvos y gránulos) para fluir verticalmente bajo condiciones definidas.
- 3) Friabilidad, Ph. Eur. 2.9.7. Esta prueba está diseñada para evaluar la capacidad del comprimido para resistir a la abrasión en el embalaje, la manipulación y el envío.
- 4) Dureza - La prueba de dureza del comprimido también se conoce como fuerza de ruptura de comprimido y mide la integridad mecánica del comprimido.
- 5) Densidad aparente, Ph. Eur. 9.2.34. La densidad aparente de un polvo es la relación de la masa de una muestra de polvo sin explotar a su volumen, incluyendo la contribución del volumen de los huecos entre partículas. Por lo tanto, la densidad aparente depende tanto de la densidad de partículas de polvo como de la disposición espacial de las partículas en el lecho de polvo. Las propiedades de aumento de volumen de un polvo dependen de la preparación, tratamiento y almacenamiento de la muestra, es decir, la forma en que se ha manejado.
- 6) Prueba de disolución, Ph. Eur. 2.9.3. Los comprimidos orales siguen siendo uno de los medios más eficaces de tratamiento disponibles. La eficacia de tales formas de dosificación se basa en disolver el fármaco en los fluidos del tracto gastrointestinal antes de su absorción en la circulación sistémica. La velocidad de disolución del comprimido o cápsula es, por lo tanto, crucial.

Determinación del punto de fusión y estudio termogravimétrico

[0035] El comportamiento térmico de OIPC se evaluó usando un DSC Modulado 2920 (TA Instruments, Leatherhead, Reino Unido) equipado con un sistema de enfriamiento refrigerado (RCS por sus siglas en inglés). Helio seco a una velocidad de flujo de 40 ml/min fue utilizado como el gas de purga a través de la celda de DSC y 150 ml/min de nitrógeno a través de la unidad de RCS.

[0036] Las muestras (± 6 mg) se llevaron a cabo en cacerolas de aluminio cerradas proporcionadas por TA Instruments, la masa de cada cacerola de muestra vacía se corresponde con la masa de la cacerola de referencia vacía a ± 0.10 mg. El método experimental consistió en un período de equilibrio isotérmico inicial de 5 min a 0°C. Durante el calentamiento posterior se ejecutaron los siguientes parámetros experimentales: velocidad de calentamiento subyacente de 2°C/min entre 0 y 350°C, modulación de amplitud de 0.212°C y un período de 40 años.

[0037] La calibración de temperatura y entálpica se realizó con un estándar de indio, mientras que la calibración de la capacidad de calor se llevó a cabo con un estándar de zafiro. Los resultados fueron analizados utilizando el software de análisis de instrumentos de *TA Instruments*.

- 5 [0038] Se determinó que el OIPC tiene un punto de fusión de 56.3°C. Se realizaron ensayos adicionales para evaluar la temperatura de degradación mediante análisis termogravimétrico (TGA por sus siglas en inglés).

[0039] El análisis termogravimétrico (TGA) mide los cambios de peso en un material como una función de temperatura (o tiempo) bajo una atmósfera controlada. Su uso principal incluye la medición de la estabilidad
10 térmica de un material y su composición. El análisis TGA se realizó con un HR TGA 2950 (*TA Instruments*, Leatherhead, Reino Unido). Las muestras (± 15 mg) se equilibraron a 50°C y después se calentaron a 500°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/ min y el porcentaje de pérdida de peso fue registrado. El compuesto de OIPC mostró una degradación térmica a 159.27°C con 1% de pérdida de masa.

15 Espectroscopia dactiloscópica de OIPC

[0040] Las técnicas espectroscópicas de NIR y de Raman permiten una impresión dactilar detallada de un compuesto de estructura molecular y pueden sufrir modificaciones en el procesamiento.

- 20 [0041] La espectroscopia de Raman es un proceso de dispersión de luz en el que la sustancia objeto de examen se irradia con luz monocromática intensa (normalmente luz láser) y la luz dispersada por la muestra se analiza para cambio de frecuencia. La espectroscopia de Raman es una técnica complementaria para espectroscopia infrarroja debido a que las dos técnicas hacen propensas las vibraciones moleculares en un material, sin embargo, ambas tienen diferente sensibilidad relativa para los diferentes grupos funcionales.

25 [0042] Un espectrómetro de Raman Rxn1 (*Kaiser Optical Systems*, Ann Arbor, MI, EE.UU.), equipado con un detector de dispositivo acoplado de carga de aire refrigerado (CCD por sus siglas en inglés) (diseño de agotamiento profundo retroiluminado) se utilizó en combinación con la sonda de no contacto de fibra óptica para recolectar el espectro de polvo. La longitud de onda del láser durante los experimentos fue la línea de 785 nm de un láser de diodo de 785nm *Invictus NIR*. El espectro se registró a una resolución de 4 cm^{-1} utilizando una
30 potencia de láser de 400 mW. La recolección de datos, transferencia de datos y el análisis de datos se automatizaron con el software de hologramas de recopilación de datos (*Kaiser Optical Systems*), el análisis de reacción HoloREACT y software de perfilado (*Kaiser Optical Systems*) y el software Matlab (*The Mathworks*, versión 7.7). Se utilizó un tiempo de exposición a láser de 10 segundos. Se obtuvo un espectro Raman
35 característico de OIPC.

[0043] Un espectro NIR de reflectancia difusa se recolectó utilizando un espectrómetro *Fourier-Transform NIR* (*Thermo Fisher Scientific*, analizador de IR cercano *Nicolet Antaris II*) equipado con un detector de *InGaAs*, una lámpara de halógeno de cuarzo y una sonda de no contacto de fibra óptica. El análisis de datos se realizó
40 utilizando el software *Thermo Fisher Scientific's Result*. El espectro se recolectó en la región 10000 - 4000 cm^{-1} con una resolución de 16 cm^{-1} y un promedio de más de 32 exploraciones. Se obtuvo un espectro característico NIR de OIPC.

45 Higroscopicidad de OIPC

[0044] Los ingredientes farmacéuticos activos (IFA) con frecuencia muestran una propensión a interactuar con moléculas de agua, que conducen a la absorción de humedad en su estructura o a una mayor adsorción sobre sus superficies. Tal comportamiento puede afectar críticamente a muchas propiedades farmacéuticas, tales como la pureza, la solubilidad y la estabilidad química, densidad, área de superficie, el flujo de polvo, capacidad
50 de compactación y forma cristalina. Los compuestos se pueden clasificar como no higroscópicos, ligeramente higroscópicos, moderadamente higroscópicos o muy higroscópicos, con base en el porcentaje de ganancia de peso durante la exposición para definir las condiciones de humedad a una temperatura específica. La sorción dinámica de vapor (SDV) se analiza para determinar perfiles de higroscopicidad utilizando una muestra muy pequeña (≈ 15 mg), y proporcionar información cualitativa y cuantitativa sobre la captación de agua.

55 [0045] La sorción/desorción de agua isotérmica del OIPC se determinó gravimétricamente a 25°C (SD, 0.1°C) usando un *DVS Advantage 1* con una microbalanza *Cahn* (*Surface Measurement Systems*, Londres, Reino Unido). Entre 10 y 20 mg se pesaron en el recipiente de muestras del instrumento, se sometió a una etapa de secado con el fin de llevar la muestra a un peso constante y posteriormente se expuso a aumento de humedad
60 relativa (HR) (utilizando incrementos de 10% hasta 90%) . Después de la fase de sorción, la muestra se expuso a una humedad relativa decreciente (en pasos de 10% hasta 0% de humedad relativa). Cada paso continuó hasta

que se alcanzó el equilibrio (es decir, cuando el cambio en la masa es menor a 0.002% por minuto durante al menos 10 minutos) o hasta que hubieron pasado 6 horas. El cambio de masa se registró cada minuto con una resolución de $\pm 0.1 \mu\text{g}$.

- 5 [0046] Los perfiles de sorción y desorción de aguas de OIPC muestran que el OIPC es un compuesto muy higroscópico, que absorbe 41.67% de agua cuando se expone a 90% de humedad relativa.

Propiedades de flujo y ángulo de respuesta correspondiente

- 10 [0047] Las propiedades de flujo y el ángulo de respuesta correspondiente se determinaron como se describe en Carr RL. *Evaluating Flow Properties of Solids. Chem. Eng.* 1965; 72: 163-168. Usando los siguientes criterios:

15	Propiedades de Flujo	Ángulo de Reposo (grados)
	Excelente	25-30
	Bueno	31-35
20	Justo (no se necesita ayuda)	36-40
	Pasable (puede complicarse)	41-45
	Bajo (se debe agitar, vibrar)	46-55
	Muy bajo	56-65
25	Demasiado bajo	>66

- 30 Método de HPLC para la cuantificación de OIPC en comprimidos/mezcla

Condiciones del equipo:

[0048]

- 35 Tipo de detector: UV
 Longitud de onda: 206 nm
 Columna: Licrosphere® 100RP-8 extremo encapsulado (5 μm), Merck, Cat. no. 1.50827.0001
 Precolumna - Precolumna Licrosphere® RP-8 extremo encapsulado, Merck, Cat. no. 1.50961.0001
 Temperatura de columna: 25°C
 40 Velocidad de Flujo: 0.75 mL/min
 Volumen de inyección: 30 μl
 Fase móvil: metanol (87,5%) / 0.01 N HCl (12.5%)
 Tiempo aproximado de elución de OIPC: 5330 min

- 45 Preparación de la muestra:

- [0049] Dispersar la cantidad correspondiente a 1 comprimido (385.15 mg) en 50 ml de metanol grado HPLC (en el caso del comprimido tiene que ser pulverizado previamente en un mortero). Someter a la suspensión obtenida ultrasonidos durante 15 min. Agitar durante 5 min. Después centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos. Retirar
 50 con cuidado la fase superior transparente y colóquelo en una ampolla para inyección.

Método de HPLC para la cuantificación de OIPC en 0.1 N de HCl

Condiciones del equipo:

55

[0050]

- Tipo de detector: detector PDA y MS
 Longitud de onda DAD: 196 nm
 Columna: columna HPLC de Supleco Discovery C8 150*4.6mm*5 μm .
 60 Temperatura de la columna: 15°C
 Velocidad de flujo: isocrática 1.5 ml/min
 Volumen de inyección: 50 μl

Fase móvil: 800 ml de acetonitrilo. 200 ml de agua (Grado Mili Q), 500 µL de Ácido fórmico, 100 µl de trietilamina.

Preparación de la muestra:

Las muestras se homogeneizaron, introdujeron en ampollas y se inyectaron.

Formulación de formas de dosificación sólida

[0051] La figura 2 muestra una representación esquemática del proceso de formulación usado para proporcionar las formas de dosificación sólida de oleil fosfocolina ejemplificadas a continuación.

Ejemplo 1

[0052] El proceso de granulación húmeda para la formulación de la dosificación sólida de OIPC requiere que el OIPC se disuelva en agua. El OIPC tiene una solubilidad en agua de 0.2 g/ml, lo que implica que para cada comprimido con 50 mg de OIPC al menos 250µl de agua por comprimido tienen que ser incorporados en la mezcla de polvo seco.

[0053] Se desarrolló una mezcla de granulación húmeda (Tabla 1). La mezcla seca referida permite la incorporación (por peso de comprimido de 315 mg) de 250µl de solución de OIPC para una dosificación final de 50 mg. La masa húmeda obtenida se transmite fácilmente a través de un tamiz de 1400mm. Después del periodo de 12 horas de secado se obtuvieron gránulos de buena calidad.

Tabla 1: Descripción de mezcla de granulación húmeda, libre de OIPC

Formulación 01	Cuantitativo mg/tableta	Función	Proceso y condiciones		
Monohidrato de Lactosa (Pharmatose®200M)	100	Rellenador/diluyente	Mezclado en seco 2 min.	Tamiz de granulación 140 mm	Secado 12h 30°C/15% RH
Celulosa Microcristalina (Avicel®PH101)	200	Rellenador/diluyente			
Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	12	Súper desintegrante			
Polivinilpirrolidona (Kollidon® 30)	3	Aglutinante			
Peso en fase seca: 315 mg					
Agua desmineralizada 250µL de agua purificada					
Peso en gránulo: 315mg					

Ejemplo 2 Incorporación de OIPC en la formulación

[0054] Tras la producción de gránulos de placebo de buena calidad, el OIPC se introdujo en la formulación solubilizada en la solución acuosa de granulación (**Tabla 2**).

Tabla 2. Introducción de OIPC en la solución acuosa de granulación.

Formulación 02	mg/tableta	Función	Proceso y condiciones		
Monohidrato de lactosa (Pharmatose®200M)	100	Rellenador/diluyente	Secado en seco 2 min.	Tamiz de granulación 140mm	Secado 12h 30°C/15% RH
Celulosa microcristalina (Avicel®PH101)	200	Rellenador/diluyente			
Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	12	Súper desintegrante			
Polyvinylpyrrolidone (Kollidon® 30)	3	Aglutinante			
Peso en fase seca: 315 mg					
Solución acuosa de OlPC (50mg OlPC/250µL de agua purificada)					
Peso en gránulos: 365mg					

[0055] La masa húmeda obtenida era menos fácil de granular, sin embargo, se obtuvieron buenos gránulos. Después de un período de secado, los gránulos se comprimieron en comprimidos con un punzón cóncavo de 10 mm y usando fuerza de compresión de 1KN. Después de la compresión, se obtuvieron comprimidos de 365 mg. Se evaluó la friabilidad y el tiempo de desintegración del comprimido.

[0056] Los comprimidos producidos presentaron altos niveles de friabilidad y tiempo de desintegración. Se observó que la presencia de polivinilpirrolidona en solución con OIPC induce a la formación de un precipitado desconocido que indica la presencia de una incompatibilidad entre los dos compuestos.

[0057] Otro aglutinante, hidroxipropilmetilcelulosa, se ensayó y no se observó tal incompatibilidad. Se seleccionó a continuación hidroxipropilmetilcelulosa para reemplazar la polivinilpirrolidona como aglutinante en los subsiguientes ensayos de formulación.

Ejemplo 3 Reemplazo de polivinilpirrolidona por hidroxipropilmetilcelulosa

[0058] En el ejemplo 2 se demostró la necesidad del reemplazo de polivinilpirrolidona por hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) debido a la incompatibilidad de la polivinilpirrolidona con OIPC en solución. Para producir gránulos adecuados con el uso de HPMC E15, se necesita una mayor cantidad de aglutinante (Tabla 3).

Tabla 3: Uso de hidroxipropilmetilcelulosa como aglutinante en la mezcla de granulación

Formulación 03	mg/tableta	Función	Proceso y condiciones		
Monohidrato de lactosa (Pharmatose®200M)	100	Rellenador/diluyente	Secado en seco 2 min.	Tamiz de granulación 140mm	Secado 12h 30°C/15% RH
Celulosa microcristalina (Avicel®PH101)	200	Rellenador/diluyente			
Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	12	Súper desintegrante			
Hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel®E15 Premium LV)	11.25	Aglutinante			
Peso en fase seca: 323.25 mg					
Solución acuosa de OlPC (50mg OlPC/250µL de agua purificada)					
Peso en gránulos: 373.25mg					

[0059] La masa húmeda producida fue fácil de granular y se obtuvieron gránulos de buena calidad. Después de 12 horas de período de secado, los gránulos producidos mostraron mejorar la dureza al tacto, y cuando se colocaron en agua a 37°C, no se desintegraron antes de 15 minutos. Para obtener una buena desintegración de gránulos, se seleccionó la cantidad de croscarmelosa sódica que se iba a aumentar.

Ejemplo 4 *Aumento de la cantidad de croscarmelosa sódica súper desintegrante.*

[0060] La pérdida de la capacidad de desintegración debido a la introducción de HPMC fue compensada por el aumento de la cantidad de croscarmelosa sódica (**Tabla 4**).

Tabla 4: *Aumento de la cantidad de croscarmelosa sódica desintegrante en la mezcla de granulación.*

Formulación 04	mg/tableta	Función	Proceso y condiciones		
Monohidrato de lactosa (Pharmatose®200M)	100	Rellenador/ diluyentes	Mezclado 2 min.	Tamiz de granulación 140mm	Secado 12h 30°C/15% RH
Celulosa microcristalina (Avicel®PH101)	200	Rellenador/ diluyentes			
Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	22.5	Súper desintegrante			
Hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel®E15 Premium LV)	11.25	Aglutinante			
Peso en fase seca: 333.75 mg					
Solución acuosa de OIPC (50mg OIPC/250µL de agua purificada)					
Peso en gránulos: 383.75mg					

[0061] El aumento de la cantidad de croscarmelosa sódica mejoró en gran medida la desintegración en agua a 2 minutos. Por lo tanto, los comprimidos preparados por compresión a 1KN fueron evaluados en cuanto a tiempo de desintegración.

[0062] Aunque los gránulos producidos se desintegraron fácilmente en agua, dicha capacidad se ve afectada a la compresión. Para potenciar la capacidad de desintegración de los comprimidos producidos, se mezcló después una cantidad similar de croscarmelosa sódica con los gránulos secos.

Ejemplo 5 *Incorporación de croscarmelosa sódica como fase externa*

[0063] Con el objetivo de mejorar la desintegración del comprimido a la compresión, una cantidad igual de croscarmelosa sódica fue mezclada en seco con los gránulos preparados. Debido a la diferencia de tamaño de partículas entre la croscarmelosa sódica y los gránulos obtenidos, un paso de calibración de gránulo fue incluido para evitar la segregación durante el proceso de mezcla. Este proceso incluye que los gránulos secos sean forzados a través de un tamiz de 710 mm y luego se mezclen durante 1 minuto con croscarmelosa sódica (**Tabla 5**).

Tabla 5: Incorporación de croscarmelosa sódica como fase externa para mejorar el tiempo de desintegración de los comprimidos.

	Formulación 05	mg/ tableta	Función	Flujo de proceso y condiciones			
Fase interna	Monohidrato de lactosa (Pharmatose®200M)	100	Rellenador/ diluyente	Mezclado 2 min.	Tamiz de granulación 140mm	Secado 12h 30°C/15% RH	Tamiz de Calibración 710 mm
	Celulosa microcristalina (Avicel®PH101)	200	Rellenador/ diluyente				
	Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	22.5	Súper desintegrante				
	Hidroxipropil metilcelulosa (Methocel®E15 Premium LV)	11.25	Aglutinante				
	Peso en fase mezclado seco: 333.75 mg						
	Solución acuosa de O1PC (50mg O1PC/250µL de agua purificada)						
Peso en gránulos: 383.75mg							
Fase externa	Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	22.5	Súper desintegrante				
	Fase de mezclado en seco para peso de compresión: 406.25 mg						

[0064] La mezcla obtenida se comprimió a 1KN para producir comprimidos de 384.25 mg. Se evaluaron los comprimidos obtenidos en relación con el tiempo de desintegración y friabilidad.

[0065] Con la introducción de una fase externa de croscarmelosa sódica, el tiempo de desintegración del comprimido se redujo en gran medida. Sin embargo, durante el proceso de compresión se observó que los comprimidos tenían la tendencia de pegarse al troquel inferior. Tal situación fue corregida por la introducción de un agente lubricante tal como estearato de magnesio en la fase externa de los comprimidos.

Ejemplo 6 Incorporación de un agente lubricante (estearato de magnesio) en la fase externa de los comprimidos.

[0066] Estearato de magnesio se incorporó en la fase externa junto con croscarmelosa sódica para evitar la adherencia del comprimido al punzón inferior (**Tabla 6**).

Tabla 6: Incorporación de un agente lubricante en la fase externa de los comprimidos

	Formulación 06	mg/tableta	Función	Flujo de proceso y condiciones			
Fase interna	Monohidrato de lactosa (Pharmatose®200M)	100	Rellenador/ diluyente	Mezclado 2 min.	Tamiz de granulación 140mm	Secado 12h 30°C/15% RH	Tamiz de Calibración 710 mm
	Celulosa microcristalina (Avicel®PH101)	200	Rellenador/ diluyente				
	Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	22.5	Súper desintegrante				
	Hidroxipropil metilcelulosa (Methocel®E15 Premium EL)	11.25	Aglutinante				
	Peso en fase mezclado seco: 333.75 mg						
Solución acuosa de OIPC (50mg OIPC/250µL de agua purificada)				Mezclado 1 min.	Compresión 1kN		
Peso en gránulos: 383.75mg							
Fase externa	Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	22.5	Súper desintegrante				
	Estearato de magnesio	0.9	Lubricante				
Fase de mezclado en seco para peso de compresión: 406.25 mg							

[0067] Se evaluaron los comprimidos obtenidos con respecto a la desintegración y la friabilidad y no se observó ningún efecto debido a la introducción del lubricante. No se observó adherencia durante la compresión. Sin embargo, los comprimidos obtenidos aún presentan alta friabilidad.

Ejemplo 7 Disminución de la friabilidad de los comprimidos

[0068] Con el objetivo de disminuir la friabilidad de los comprimidos, se realizó un cambio en la relación de los dos diluyentes. Celulosa microcristalina (MCC) se utiliza con frecuencia con lactosa en los procesos de granulación húmeda. La lactosa se conoce por compactarse predominantemente por fractura frágil mientras que la celulosa microcristalina tiene una deformación más plástica. De esta manera, la relación de estos dos materiales de relleno se sabe que afecta a las propiedades del comprimido. La granulación húmeda de la mezcla con relaciones más altas de MCC conduce a la densificación de gránulos, la pérdida de la capacidad de compactación y el aumento de friabilidad de los comprimidos. Por lo tanto, al reducir la relación de MCC, se espera la disminución de la friabilidad del comprimido (**Tabla 7**).

Tabla 7: Modificación de la relación entre celulosa microcristalina y monohidrato de lactosa con el fin de disminuir la friabilidad de los comprimidos.

	Formulación 07	mg/tableta	Función	Flujo de proceso y condiciones			
Fase interna	Monohidrato de lactosa (Pharmatose®200M)	106.9	Rellenador/ diluyentes	Mezclado 2 min.	Tamiz de granulación 140mm	Secado 12h 30 °C/15% RH	Tamiz de Calibración 710 mm
	Celulosa microcristalina (Avicel®PH101)	171.1	Rellenador/ diluyentes				
	Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	22.5	Súper desintegrantes				
	Hidroxipropil metilcelulosa (Methocel®E15 Premium LV)	11.25	Aglutinante				
	Peso en fase mezclado seco: 311.75 mg						
	Solución acuosa de OIPC (50mg OIPC/250µL de agua purificada)						
Peso en gránulos: 361.75mg							
Fase externa	Croscarmelosa sódica (Ac-di-Sol®)	22.5	Súper desintegrantes				
	Estearato de magnesio	0.9	Lubricante				
	Fase de mezclado en seco para peso de compresión: 385.15 mg						

[0069] Se evaluaron los comprimidos obtenidos (peso 385.15mg) y se evaluaron para la friabilidad y el tiempo de desintegración. Estos presentaron resultados satisfactorios (**Tabla 8**).

Tabla 8: Evaluación de la Formulación experimental 07

Especificaciones	Tableta	Resultados
Características		
Dosis	50mg oleilo fosfocolina	No evaluados
Liberación de fármaco	85% en los primeros 30 min.	No evaluados
Friabilidad	Menos del 1% del peso total	0.45%
Desintegración	Menos de 15 min	8 min

Ejemplo 8 Preparación de un lote de 150 comprimidos con base en la Formulación 7

[0070] Para la evaluación adicional de la mezcla y de las características del comprimido, un lote de 150 comprimidos se produjo con base en la Formulación 7. La preparación fue evaluada por la relación masa-volumen (densidad aparente, densidad amainada, relación de Hausner y el índice de compresibilidad) y las propiedades de flujo (ángulo de reposo). Los resultados en cuanto a la mezcla de polvo OIPC/gránulo para la compresión se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Mezcla de polvo para la evaluación reológica de compresión

Parámetro	Resultados
Fluidez	Excelente
Ángulo de reposo	29.7°

[0071] La uniformidad de masa del comprimido se realizó de acuerdo a: *"Uniformity of mass of single dosage preparations"* Ph. Eur. 2.9.5. 20 comprimidos se pesaron y una desviación de 19.26mg ($\pm 5\%$) se consideró. La uniformidad de la prueba de masa demostró poca variación entre los comprimidos dentro del lote.

[0072] El contenido de fármaco del comprimido se determinó para evaluar la uniformidad de contenido de los comprimidos. La prueba de uniformidad de contenido demuestra que cada comprimido contiene la cantidad de sustancia de fármaco pretendida (50 mg) con poca variación entre los comprimidos.

Ejemplo 9 Preparación de un lote de 1000 comprimidos con base en la Formulación 7

[0073] Basándose en los datos obtenidos en el ejemplo 8, se produjo un lote de 1000 comprimidos para las pruebas de estabilidad después del envasado en bolsas de aluminio (*VaporFlex*® VBVF5800-159). Las propiedades reológicas de la mezcla se determinaron antes de la de compresión (**Tabla 10**).

Tabla 10: Mezcla de polvo para evaluación reológica de la compresión

Parámetro	Resultados
Fluidez	Excelente (Anexo V)
Ángulo de reposo	29.5°
Densidad aparente	0.43 g/mL
Densidad amainada	0.49 g/mL
Relación de Hausner	1.14
Índice de compresibilidad	12%

[0074] Tras la determinación de la masa y la densidad amainada, la relación de Hausner, el índice de compresibilidad y el ángulo de reposo calculados son indicadores de una excelente fluidez.

[0075] El contenido de fármaco en el comprimido se determinó para evaluar la uniformidad de contenido de los comprimidos. La prueba de uniformidad de contenido demuestra que cada comprimido contiene la cantidad de sustancia de fármaco pretendida (50 mg) con poca variación entre los comprimidos.

[0076] El promedio de la uniformidad de contenido en la mezcla se llevó a cabo por medio de HPLC. Esta prueba se basa en el ensayo de los contenidos individuales de la sustancia activa de 3 muestras de mezcla (cada uno equivalente al peso teórico del comprimido) obtenido de 20 comprimidos pulverizados y mezclados en un mortero. El promedio de la uniformidad de contenido en la mezcla de prueba confirma el alto grado de homogeneidad en la distribución de OIPC dentro de la mezcla.

[0077] La uniformidad de masa del comprimido se realizó de acuerdo a: *"Uniformity of mass of single dosage preparations"*; Ph. Eur. 2.9.5. 20 comprimidos se pesaron y una desviación de 19.26mg ($\pm 5\%$) se consideró. La uniformidad de la masa en las comprimidos de OIPC muestra un proceso de compresión reproducible sin variaciones significativas.

[0078] La liberación del fármaco de los comprimidos (*"Dissolution test for solid dosage forms"*, Ph. Eur. 2.9.3) se realizó en 900 ml 0.1N de HCl, ($37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$), utilizando un aparato de paletas (Aparato Ph. Eur. 2) a 100 rpm.

La concentración acuosa de OIPC se determinó por medio de HPLC. Los perfiles de disolución individuales y medios (**Figura 3**) se determinaron. Los comprimidos lograron una liberación de OIPC de >85% en menos de 30 minutos en cumplimiento con *Ph. Eur.* 5.17.1.

5 Ejemplo 10 Comparativo de eficacia curativa de miltefosina (MIL) y oleilfosfolina (OIPC) contra *Leishmania infantum* en el modelo de hámster después de la administración oral a 20 y 40 mg/kg durante 5 días usando diferentes formulaciones.

[0079] La miltefosina (MIL) pertenece al grupo químico de las alquilfosfolinas y es un fármaco que se comercializa para el tratamiento de la leishmaniosis visceral (LV). Sus ventajas particulares son vía de administración oral y el hecho de que no existe resistencia cruzada con otras terapias anti-leishmania de primera línea y segunda línea.

[0080] Aunque tres nuevos fármacos o formulaciones de fármacos (anfotericina B liposomal, miltefosina y paromomicina) están disponibles para el tratamiento de la LV actualmente, todos ellos sufren cualquiera de las limitaciones de costes, toxicidad o la necesidad de administración parenteral. Las alquilfosfolinas novedosas y las formulaciones alternativas potencialmente más baratas se están estudiando como posible valor agregado a las opciones terapéuticas actuales.

20 Animales

[0081] Hámsteres dorados (hembras, 75 g) se asignaron al azar a 7 grupos de 8 animales por grupo.

- G1:** control del vehículo infectado (VIC): 200 µl de vehículo en blanco por vía oral 5 días
- G2:** MIL-PBS: 5 x 40 mg / kg (= 98.1 µmol / kg) por vía oral durante 5 días
- G3:** MIL-PBS: 5 x 20 mg / kg (= 49.1 µmol / kg) por vía oral durante 5 días
- G4:** OIPC-PBS: 5 x 42.5 mg / kg (= 98.1 µmol / kg) por vía oral durante 5 días
- G5:** OIPC-PBS: 5 x 21.2 mg / kg (= 49.1 µmol / kg) por vía oral durante 5 días
- G6:** liposomas de OIPC: 5 x 2.4 ml / kg (= 98.1 µmol / kg) vía oral durante 5 días
- G7:** liposomas de OIPC: 5 x 1.2 ml / kg (= 49.1 µmol / kg) vía oral durante 5 días

[0082] El agua potable y los alimentos estaban disponibles *ad libitum* durante todo el experimento. El peso de los animales individuales no difirió demasiado de la media del grupo.

Infección artificial

[0083] Amastigotes de *Leishmania infantum* (MHOM/MA (BE)/67) se obtuvieron del bazo de hámsteres donantes gravemente infectados. La carga total del parásito se determinó en frotis teñidos con *Giemsa*. Los amastigotes en el homogeneizado de bazo se concentraron utilizando dos etapas de centrifugación (baja velocidad (300 rpm) con la recolección del sobrenadante - alta velocidad (4200 rpm) con la recolección de la pastilla). Las cargas parasitarias en el bazo se calcularon utilizando la técnica de *Stauber* y la suspensión de amastigotes se diluyó para preparar el inóculo infeccioso de infección intracardial que contiene 2×10^7 amastigotes/100 µl. A los 21 días después de la infección (= inicio del tratamiento), los niveles de infección se comprobaron en 4 animales elegidos al azar, haciendo un frotis de una biopsia de hígado para la determinación de la carga parasitaria (*cfr. infra*).

Sustancias y formulaciones de prueba

[0084]

- La miltefosina se formuló en 20 mg/ml y 10 mg/ml en PBS y se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad. Se obtuvo una solución clara y transparente.
- OIPC-PBS se formuló a 21.25 mg/ml y 10.63 mg/ml en PBS y se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad. Se obtuvo una solución clara y transparente.
- La formulación de liposoma de OIPC se preparó a 18 mg/ml (a dosis de 2.4 ml/kg = 120 µl/50 gramos). La formulación se diluyó 2 veces en PBS para obtener una formulación de OIPC de 9 mg/ml (a dosis de 1.2 ml/kg = 120 µl/50 gramos))

Tratamiento

[0085] El tratamiento oral se inició 21 días después de la infección (dpi) y se continuó durante 5 días consecutivos. El volumen de dosificación fue de 100 µl por 50 gramos de PC (peso corporal).

- Grupo 1: PBS: 100 µl por 50 gramos

- Grupo 2: MIL: 20 mg / ml PBS: 100 µl por 50 gramos
- Grupo 3: MIL: 10 mg / ml PBS: 100 µl por 50 gramos
- Grupo 4: OIPC-PBS: 21.5 mg / ml PBS: 100 µl por 50 gramos
- Grupo 5: OIPC-PBS: 10.6 mg / ml PBS: 100 µl por 50 gramos
- 5 - Grupo 6: liposomas de OIPC: 18 mg / ml: 120 µl por 50 gramos
- Grupo 7: liposomas de OIPC: 9 mg / ml: 120 µl por 50 gramos

Parámetros de evaluación

- 10 [0086] *Síntomas clínicos*: los animales se observaron diariamente para detectar la aparición/presencia de efectos adversos o clínicos durante el curso de 5 semanas del experimento. Peso corporal: todos los animales se pesaron dos veces por semana durante el curso del experimento para controlar su estado de salud general (gravedad de la infección y toxicidad de la medicación).
- 15 [0087] *Carga de parásitos*: cargas de amastigotes en los diferentes órganos objetivo (hígado, bazo, médula ósea) se determinaron 10 días después del último tratamiento (es decir, día 35 del experimento). Los órganos de los animales individuales se pesaron (con excepción de la médula ósea); frotis de impresiones fueron fijados en metanol y se tiñeron con *Giemsa* para evaluación microscópica del número de amastigotes por célula contando un mínimo de 500 núcleos. Los resultados se expresan como Unidades de Leishman Donovan (LDU) = número
- 20 medio de amastigotes por núcleo por mg de peso del órgano. El porcentaje de reducción en comparación con los animales de control infectados tratados con vehículo (VIC) se utiliza como una medida de la actividad del fármaco. En particular, para el bazo y la médula ósea, se evaluó la viabilidad de las posibles cargas residuales utilizando el ensayo de transformación de promastigotes.

25 Resultados y discusión

- [0088] El tratamiento se inició después de la verificación de las cargas parasitarias del hígado 21 días después de la infección. Los cuatro controles positivos se infectaron de forma correcta (1.30 ± 0.3 amastigotes/núcleo en una biopsia hepática). Todos los resultados se resumen en la **Tabla 11**:
- 30 - Los controles infectados tratados con vehículo (VIC) desarrollaron altos niveles de infección en todos los órganos diana (hígado, bazo y médula ósea).
- El fármaco de referencia MIL a 40 mg / kg mostró reducción de 65% de valores LDU en el hígado, 99% en el bazo y 95% en la médula ósea. A 20 mg / kg, no se obtuvo ninguna reducción en el hígado, 61% en el bazo y el 39% en la médula ósea.
- 35 - OIPC-PBS a 40 mg / kg mostró reducción del 100% de valores LDU en el hígado, el bazo y la médula ósea. A 20 mg / kg, se obtuvo la reducción de 91% en el hígado, 99% en el bazo y el 98% en la médula ósea. Reacciones adversas menores (ojos cerrados, agitación) se observaron inmediatamente después de la alimentación, desapareciendo después de alrededor de media hora. En el grupo de 40mg/kg, un hámster murió dos días después de finalizar el tratamiento, pero se considera que no está relacionado
- 40 con el fármaco.
- Liposomas de OIPC a 40 mg / kg mostraron una reducción de 100% de los valores LDU en el hígado, el bazo y la médula ósea. A 20 mg / kg, se obtuvo la reducción de 71% en el hígado, 99% en el bazo y el 93% en la médula ósea.
- 45 - En la necropsia, no se observaron lesiones macroscópicas-patológicas en ninguno de los animales tratados.

[0089] Se llegó a la conclusión de que ambas formulaciones de OIPC son aproximadamente equipotentes, con una eficacia notablemente mayor en comparación con el fármaco MIL de referencia a niveles de dosis equivalentes.

Tabla 11: Cargas parasitarias en hámsteres infectados con *Leishmania* tratados por vía oral durante 5 días

	Hígado		Bazo		Médula Ósea	
	Media ± SE de LDU	%rojo	Media ± SE de LDU	%rojo	Media ± SE de amastigotes por núcleo	%rojo
VIC - PBS	7981±1366		479±72		1.5±0.5	
Miltefosina 98.1 µmol/kg	2764±847	65	3.7±1.67	99.2	0.1±0,014	95
Miltefosina 49.1 µmol/kg	9017±1489	0	188±44	61	1.0 ± 0.34	39
OIPC/PBS 98.1 µmol/kg	29±15	99.6	0	100	0	100
OIPC/PBS 49.1 µmol/kg	717±295	91	3.0±1.45	99.4	0.03 ± 0.014	98
OIPC/liposoma 98.1 µmol/kg	0	100	0	100	0	100
OIPC/liposoma 49.1 µmol/kg	2283±889	71	6.0±2.4	98.7	0.1 ± 0.03	93

[0090] En un experimento de seguimiento, se utilizó el mismo protocolo experimental para comparar la eficacia de la oleil fosfocolina oral (OIPC) a dosis totales de 25, 50 y 100 mg/kg cuando se administra como administraciones orales únicas o múltiples (5 X 5, 10 y 20 mg/kg, respectivamente).

[0091] Los resultados muestran que los niveles globales de supresión de parásito fueron similares cuando las dosis fueron dadas como administraciones únicas o múltiples, lo que sugiere que la exposición total (AUC) era más importante que la concentración plasmática alta (C_{max}) para la matanza de parásitos.

[0092] Curiosamente, incluso la administración única de hasta 100 mg/kg fue bien tolerada en los hámsteres y no se observó ningún signo de toxicidad durante el experimento. Una vez más las dos formulaciones de oleil fosfocolina probadas (acuosa y liposomas) fueron igualmente bien toleradas.

[0093] Hámsteres hembras (n = 60) fueron infectados intracardialmente con 2×10^7 amastigotes de *Leishmania infantum* (MHOM/MA (BE)/67) en el día 0. El tratamiento se inició en el día +21 después de la infección durante 5 días consecutivos una vez al día con una dosis total de 25, 50 y 100 m/kg administrados en administraciones orales únicas o múltiples. Las cargas de amastigotes en los diferentes órganos diana (hígado, bazo, médula ósea) se determinaron 10 días después del último tratamiento (día +35). Los órganos de los animales individuales se pesaron (con excepción de la médula ósea); frotis de impresiones fueron fijados en metanol y se tiñeron con *Giemsa* para la evaluación microscópica del número de amastigotes por célula contando un mínimo de 500 núcleos. Los resultados (**Figura 4**) se expresan como Unidades de Leishman Donovan (LDU) = número medio de amastigotes por núcleo por mg de peso de los órganos.

Tratamiento de perros infectados de forma natural

[0094] La dosis de 4 mg/kg/día de oleil fosfocolina se utiliza para tratar por vía oral durante 14 días a un grupo de 6 perros de un refugio naturalmente infectados con *L. infantum* y clasificados como clínicamente enfermos. Los perros fueron evaluados en la clínica (examen físico y anomalías clínico-patológicas) y los niveles parasitológicos al comienzo del tratamiento (día 0) y en los días 15, 30 y 90.

[0095] En cuanto a la tolerancia, dos de los seis perros tratados sufrieron diarrea durante la primera semana después del tratamiento, y un tercer perro tuvo diarrea y un episodio de vómito. Los otros tres perros toleraron el tratamiento sin ningún efecto secundario. En el día 0, el promedio de la puntuación clínica (CS) de los perros fue de 19 (rango 14-31; grave). Este CS bajó a 12 (rango 7-16) al final del periodo de tratamiento (día 15), luego a 5 (rango 1-10) en el día 30 y el día 2 a 90 (rango 0-5), traduciendo una excelente mejoría clínica después del tratamiento.

Ejemplo 11 Estabilidad de la formulación de dosificación sólida de OIPC

1. Objetivo

- 5 [0096] Monitorear el contenido de fármaco de los comprimidos de OIPC durante un período de 12 meses durante el almacenamiento en condiciones ambientales controladas.

2. Formulación

10	[0097]	
	Oleil fosfocolina	50 mg
	Monohidrato de Lactosa (<i>Pharmatose 200M</i>)	106.9 mg
	Celulosa microcristalina (<i>Avicel PH101</i>)	171.1 mg
	Croscarmelosa sódica (<i>Ac-Di-Sol</i>)	45 mg
15	Hidroxipropilmetilcelulosa (<i>Methocel E15 LV</i>)	11.25 mg
	Estearato de magnesio	0.9 mg

3. Métodos

20 *Elaboración de comprimidos*

- [0098] Los comprimidos (φ 10 mm, peso 385.15 mg) fueron fabricados según el proceso descrito en el ejemplo 7. Un lote de 1000 comprimidos (lote 01101007) se preparó bajo para las pruebas de estabilidad en condiciones ambientales controladas. Después de la fabricación, los comprimidos se envasaron en sobres de aluminio herméticamente sellados (*Vaporflex* VBV5800-159) y se almacenaron en condiciones ambientales controladas hasta su posterior análisis.

Cuantificación del contenido de OIPC en comprimidos

- 30 [0099] Después de 0, 1, 3, 6 y 12 meses de almacenamiento en condiciones ambientales controladas, se determinó el contenido de fármaco de los comprimidos individuales de OIPC (10 comprimidos por cada condición de almacenamiento) mediante un método HPLC.

- 35 [0100] Una sola tableta de OIPC fue triturada con mortero y aplastada, y una cantidad pesada con precisión fue transferida a un matraz volumétrico de 50 ml. Se añadieron alrededor de 35 ml de fase móvil (véase más adelante para la composición). Después de 15 min de sonicación en un baño de ultrasonidos y 5 min de agitación para disolver el API, se añadió la fase móvil para obtener un volumen total de 50.0 ml. Una muestra homogénea de aproximadamente 5 ml se transfirió a una ampolla.

- 40 [0101] Para eliminar la fracción insoluble, la muestra se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm. Después, una alícuota del sobrenadante claro se transfirió a una ampolla de HPLC. Las soluciones estándares correspondientes a 40, 60, 80, 100 y 120% del contenido teórico de fármaco se prepararon por disolución de la cantidad requerida de OIPC en metanol.

45 *Configuración de HPLC:*

- [0102]
- | | | |
|----|--------------------------------|---|
| 50 | Columna: | <i>LichroCart 125-4, Licrospher 100</i> tapón de salida de 5μm |
| | Pre-columna: | <i>LichroCart 4-4, Licrospher 100 RP</i> tapón de salida de 5μm |
| | Fase móvil: | Metanol/0.01N de HCl (875/125, v/v) |
| | Tasa de flujo: | 0.75 ml/min |
| | Volumen de inyección: | 30 μl |
| | Detección de longitud de onda: | 206 nm |
| 55 | Tiempo de elución OIPC: | ± 5.3 min |

4. Resultados

- [0103] El estudio de estabilidad controló el contenido de fármaco por comprimido (media ± desviación estándar) en función de las condiciones de almacenamiento y el tiempo de almacenamiento. El contenido de fármaco se

expresa como un porcentaje del contenido teórico de fármaco, es decir, 50 mg por comprimido. Los resultados se resumen en la **tabla 12** a continuación.

Tabla 12 Estabilidad de las formas de dosis sólidas de OIPC

Tiempo de Almacenamiento (meses)	Condiciones de almacenamiento			
	2-8°C	25°C - 60% RH	30°C - 65% RH	40°C - 75% RH
0	101.2 ± 2.3 %	101.2 ± 2.3 %	101.2 ± 2.3 %	101.2 ± 2.3 %
1	101.3 ± 1.7 %	--	101.7 ± 1.2 %	103.0 ± 1.7 %
3	--	104.2 ± 2.9 %	102.7 ± 1.6 %	102.6 ± 2.0 %
6	100.4 ± 1.8 %	101.3 ± 1.3 %	101.4 ± 1.2 %	99.1 ± 5.6 %
12	94.9 ± 1.1 %	95.8 ± 1.3 %	97.7 ± 0.7 %	--

5. Conclusión

[0104] Este ejemplo indica que el contenido de fármaco se mantiene estable en la formulación del comprimido de OIPC durante al menos 12 meses en todas las temperaturas probadas.

[0105] La reducción del contenido medio de fármaco después de 12 meses de almacenamiento más probablemente es no indicativo de la degradación del fármaco debido a que no se observaron picos adicionales en los cromatogramas.

REIVINDICACIONES

1.- Método para la preparación de una forma de dosificación sólida de oleil fosfocolina para su administración oral, caracterizado porque comprende:

- a) añadir a una mezcla seca que comprende uno o más diluyentes/rellenadores, desintegrantes y/o aglutinantes farmacéuticamente aceptables, agua que comprenden de 6 a 25% por peso de oleil fosfocolina;
- b) secar y tamizar la mezcla obtenida en la etapa (a);
- c) añadir uno o más desintegrantes y/o lubricantes a la mezcla obtenida en la etapa (b);
- d) mezclar la mezcla obtenida en la etapa (c);
- e) preparar una forma de dosificación oral de la mezcla de la etapa (d), preferentemente por moldeo por compresión;

en donde dicha forma de dosificación sólida proporciona una friabilidad menor a 1% por peso, preferentemente menos de 0.5% por peso, de la forma de dosificación sólida como se determinó de conformidad con la prueba de friabilidad estándar de *European Pharmacopoeia* 2.9.7 y/o dicha forma de dosificación sólida proporciona una desintegración menor a 15 minutos, preferentemente menor a 10 minutos, según se determinó con la prueba de desintegración estándar de *European Pharmacopoeia* 2.9.1.

2.- Método de conformidad con la reivindicación 1, que comprende:

- a) añadir a una mezcla seca que comprende lactosa, preferiblemente monohidrato de lactosa, celulosa, preferiblemente celulosa microcristalina, croscarmelosa, preferentemente croscarmelosa sódica e hidroxipropilmetilcelulosa, agua que comprende de 6 a 25% por peso de oleil fosfocolina;
- b) secar y tamizar la mezcla obtenida en la etapa (a);
- c) añadir croscarmelosa, preferiblemente croscarmelosa sódica y un lubricante, preferiblemente estearato de magnesio, a la mezcla obtenida en la etapa (b);
- d) mezclar la composición obtenida en la etapa (c); y
- e) preparar una forma de dosificación oral de la mezcla de la etapa (d), preferentemente por moldeo por compresión.

3.- Método de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado además porque el tamizado comprende una primera etapa de tamizado, preferentemente a través de un tamiz de 1400 nm, antes del secado y una segunda etapa de tamizado después del secado, preferentemente a través de un tamiz de 710 nm.

4.- Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicha forma de dosificación sólida proporciona al menos 85% por peso de liberación de oleil fosfocolina a los 30 minutos según se determinó de conformidad con la prueba de disolución estándar de *European Pharmacopoeia* 2.9.3.

5.- Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, donde uno o más diluyentes o rellenos se seleccionan del grupo que consiste en carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), fosfato de calcio (tribásico), sulfato de calcio, celulosa, celulosa microcristalina, celulosa microcristalina modificada con sílice, celulosa en polvo, dextratos, dextrosa, fructosa, lactitol, monohidrato de lactosa, carbonato de magnesio, maltitol, maltodextrina, maltosa, manitol, cloruro de sodio, sorbitol, almidón, almidón pregelatinizado, sacarosa, azúcar compresible, esferas de azúcar, talco, xilitol y combinaciones de los mismos.

6.- Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 5, donde uno o más aglutinantes se seleccionan del grupo que consiste en agua, mucílago de acacia, ácido algínico, carbómero, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, etilcelulosa, gelatina, glucosa líquida, goma de guar, hidroxietil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil celulosa de baja sustitución, hidroxipropilmetilcelulosa, silicato de aluminio de magnesio, maltodextrina, metilcelulosa, polidextrosa, óxido de polietileno, povidona, copovidona, alginato de sodio, pasta de almidón, almidón pregelatinizado, sacarosa (jarabe) y combinaciones de los mismos.

7.- Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 6, donde uno o más lubricantes se seleccionan del grupo que consiste en estearato de calcio, ácido fumárico, behenato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado, lauril sulfato de magnesio, estearato de Magnesio, polietilenglicol 4000 ó 6000, lauril sulfato de sodio, estearil fumarato de sodio, almidón, ácido esteárico, talco, estearato de zinc y combinaciones de los mismos.

8.- Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 7, donde uno o más desintegrantes se seleccionan del grupo que consiste en almidón, celulosa microcristalina, ácido algínico, metil celulosa, almidón de glicolato sódico, croscarmelosa sódica, crospovidona, silicato de calcio y combinaciones de los mismos.

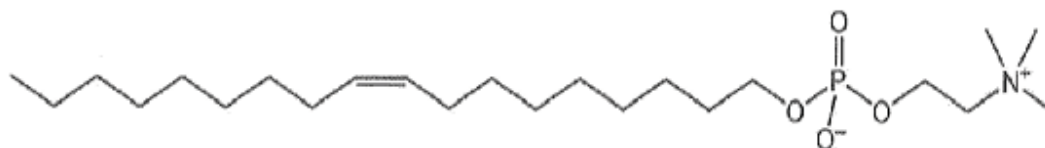


FIGURA 1

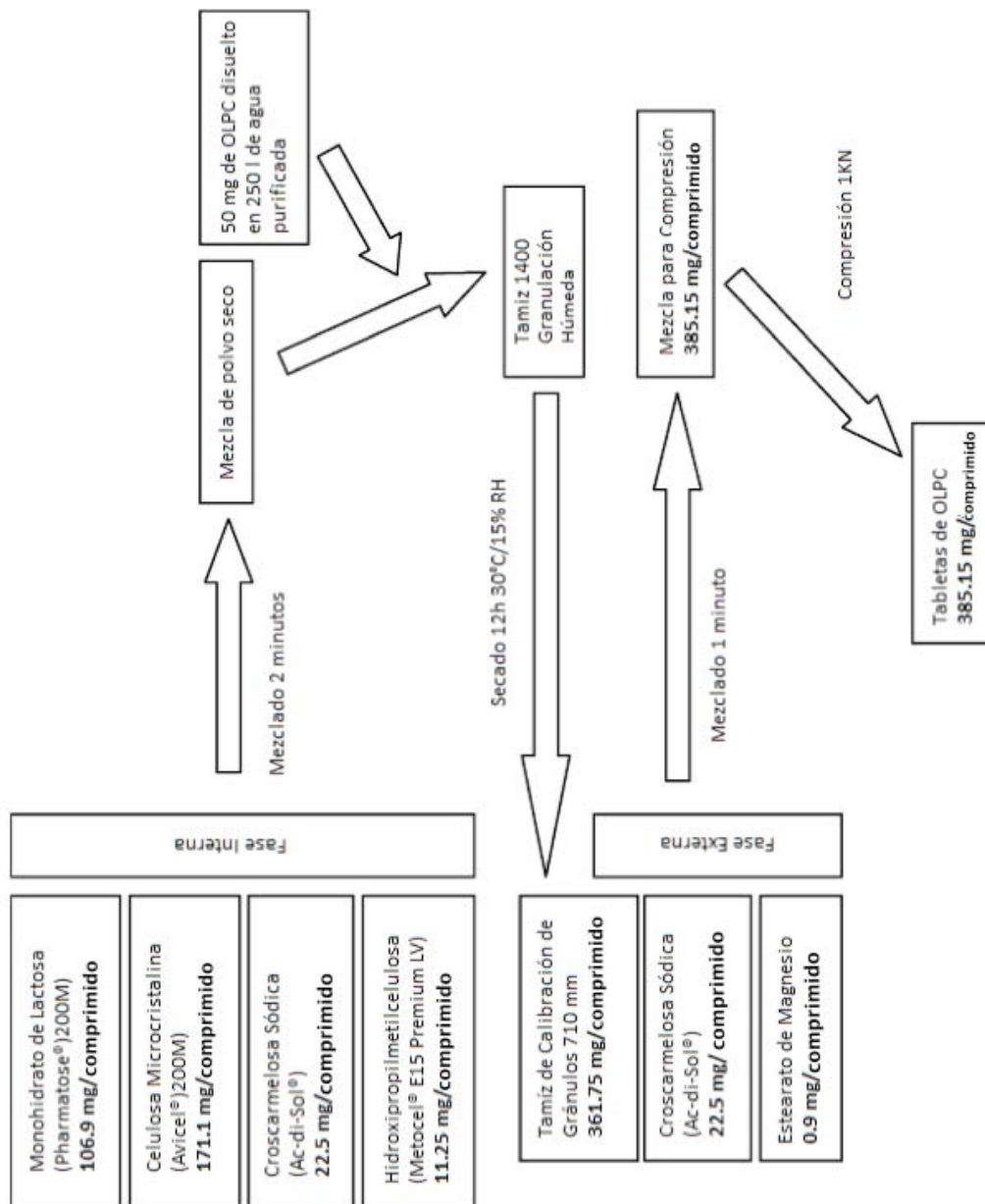


FIGURA 2

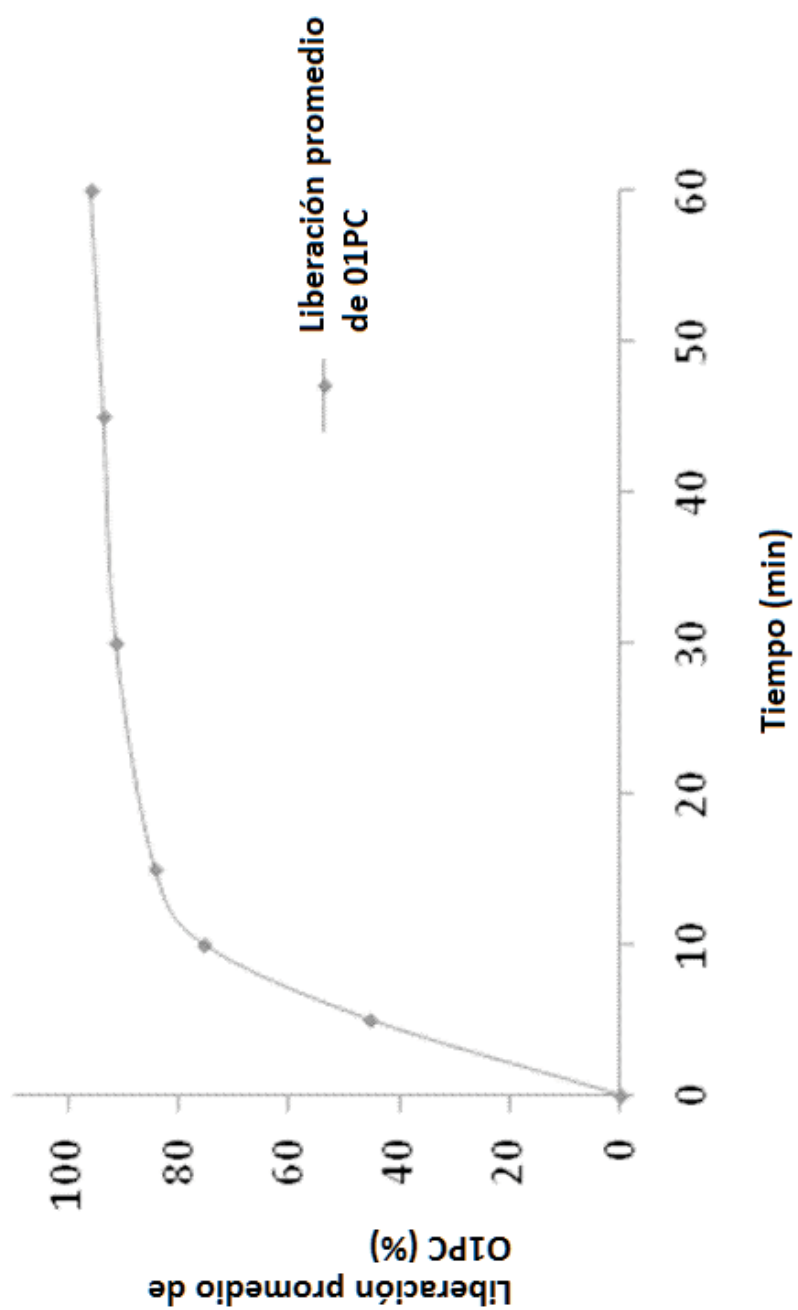


FIGURA 3

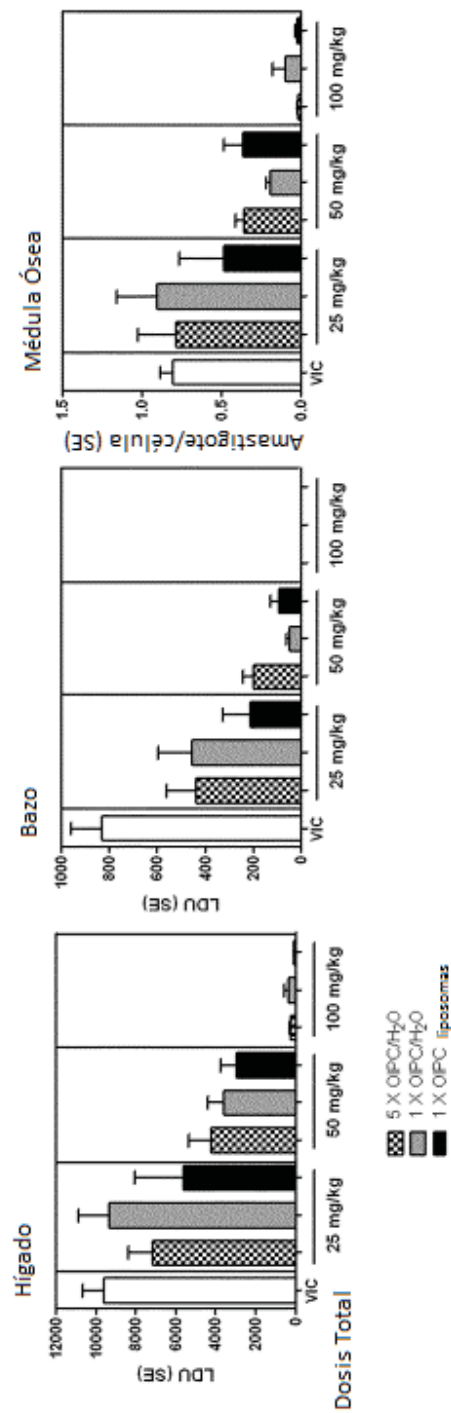


FIGURA 4