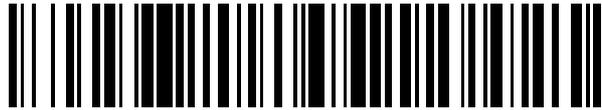


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 836**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/593** (2006.01)  
**A61K 47/44** (2007.01)  
**A61K 47/22** (2006.01)  
**A61K 9/48** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2005 PCT/JP2005/001749**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2005 WO05074943**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2005 E 05709801 (4)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 1714656**

54 Título: **Preparación de ED-71**

30 Prioridad:

**06.02.2004 JP 2004030702**

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

**24.10.2017**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
5-1, UKIMA 5-CHOME  
KITA-KU, TOKYO 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**KATSUKI, HISAKAZU;  
SHIBATA, MASAKI C/O CHUGAI SEIYAKU  
KABUSHIKI;  
MURAMATSU, KAZUNORI;  
MIZUTANI, AKIHIKO;  
YAMAUCHI, TSUYOSHI C/O CHUGAI SEIYAKU  
KABUSHIKI y  
SUZUKI, KOUJI C/O CHUGAI SEIYAKU  
KABUSHIKI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 638 836 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**

Preparación de ED-71

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una preparación que comprende (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)trieno-1,3,25-triol (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado "ED-71"). La presente invención también se refiere a un isómero trans de ED-71, (5E,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)trieno-1,3,25-triol (en lo sucesivo en el presente documento, también denominado una "forma trans").

**Antecedentes de la técnica**

15 El (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)trieno-1,3,25-triol es un derivado sintético de de la vitamina D<sub>3</sub> activa con acción de formación ósea desarrollado por Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. y es un fármaco que actualmente se está sometiendo a ensayos clínicos como fármaco terapéutico para la osteoporosis (*Bone*, Vol. 30 (4), 582-588, 2002).

20 Para producir preparaciones de ED-71, pueden usarse enfoques para la producción de preparaciones tales como cápsulas blandas, como en los derivados de vitamina D conocidos en la técnica. Por ejemplo, se ha informado con respecto a preparaciones de derivados de vitamina D conocidos en la técnica que el 1 $\alpha$ ,25-dihidroxicolecalciferol se puede mantener de manera estable mediante la adición del 0,01 al 5 % en peso de tocoferoles a una composición farmacéutica que comprende el 1 $\alpha$ ,25-dihidroxicolecalciferol (Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N.º 6-87750) y que la estabilidad en almacenamiento del alfacalcidol puede potenciarse mediante la adición de dl- $\alpha$ -tocoferol y dibutilhidroxitolueno en una relación 1:1 en peso y en una cantidad del 0,005 % o más en total como antioxidantes a una cápsula blanda que comprende el alfacalcidol (Patente Japonesa Abierta a la Inspección Pública N.º 5-4925). Sin embargo, ninguna de las divulgaciones menciona si la generación de productos de degradación de los grupos de vitamina D puede suprimirse.

30 De acuerdo con la directriz publicada por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón (Directriz Tripartita Armonizada ICH (Impurezas en Nuevos Productos Farmacológicos, Q3B(R), Comité Directivo de la ICH, 2003), la confirmación de la seguridad de un producto de degradación es estrictamente necesaria cuando el contenido del producto de degradación en una preparación supera el 1 %. Por tanto, es importante para la producción de preparaciones de fármacos que el contenido de cada uno de los productos de degradación en la preparación no supere el 1 %.

35 Por tanto, para producir preparaciones de ED-71, también es importante en la práctica no solo potenciar la estabilidad en almacenamiento de ED-71 que sirve como principio activo, sino también suprimir la generación de los principales productos de degradación.

40 El documento WO 03/047595 divulga el uso de antioxidantes para suprimir la oxidación de un compuesto de vitamina D activa.

45 El documento US 6.448.421 divulga cristales purificados del derivado de vitamina D de ED-71.

En el documento US 2003/0170324 A1, se describe una preparación líquida oleosa con mayor estabilidad, que comprende un antioxidante y una 25-hidroxi vitamina D<sub>3</sub>, que se describe como que es propensa a la oxidación.

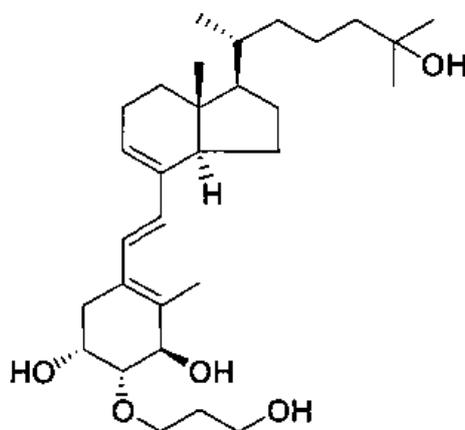
50 El documento JP 53-12414 A divulga que una solución oleosa de 1 $\alpha$ -hidroxi vitaminas puede estabilizarse mediante la adición de una pequeña cantidad de uno o más de BHT, un galato y un tocoferol.

**Divulgación de la invención****PROBLEMAS QUE SE HAN DE RESOLVER POR LA INVENCION**

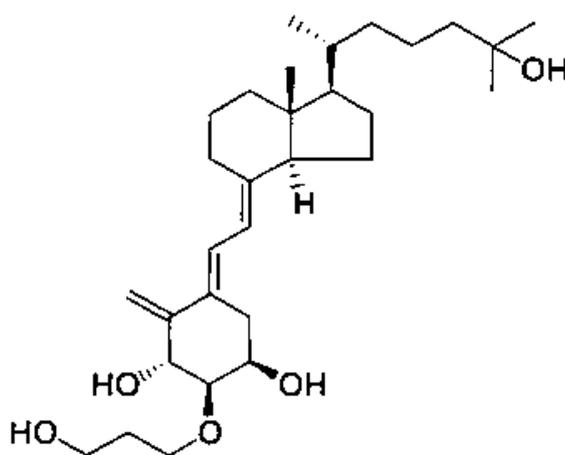
55 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método de supresión de la isomerización como se define en la reivindicación independiente 1 que se produce en una preparación oleosa que comprende ED-71.

**MEDIOS PARA RESOLVER LOS PROBLEMAS**

60 Los presentes inventores han realizado estudios exhaustivos para resolver los problemas y, en consecuencia, han encontrado que los principales productos de degradación de ED-71 en grasa y aceite son un isómero de tipo taquisterol de ED-71 representado por la siguiente fórmula estructural:

**[Fórmula 1]**

5 (6E-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5(10),6,8(9)-trieno-1,3,25-triol; en lo sucesivo en el presente documento, también denominado una "forma de taquisterol" de ED-71), y una forma trans de ED-71 representada por la siguiente fórmula estructural:

**[Fórmula 2]**

10 ((5E,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol). Los presentes inventores han completado la presente invención descubriendo adicionalmente que la generación de estos productos de degradación se puede suprimir en una preparación oleosa que comprende ED-71 mediante la adición de un antioxidante como se define en la reivindicación independiente 1 al mismo.

15 En la preparación, preferentemente, la generación de un producto de degradación de (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol se suprime. El producto de degradación de (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol puede ser 6E-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5(10),6,8(9)-trieno-1,3,25-triol y/o (5E,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol. Preferentemente, el producto de degradación de (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol es 6E-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5(10),6,8(9)-trieno-1,3,25-triol y (5E,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol.

25 En la preparación, preferentemente, la degradación de (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol en 6E-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5(10),6,8(9)-trieno-1,3,25-triol y/o (5E,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol se suprime.

En la preparación, preferentemente, el antioxidante es un miembro seleccionado entre butilhidroxianisol, catequina, tocoferol, dibutilhidroxitolueno y ácido cítrico. Más preferentemente, el antioxidante es el dl- $\alpha$ -tocoferol.

Preferentemente, la preparación es una preparación oleosa. Más preferentemente, la preparación es una cápsula blanda, cápsula dura o preparación líquida oleosa (en particular, una cápsula blanda).

- 5 La preparación debe comprender del 0,000001 al 0,01 % en peso de (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol con respecto a la grasa y el aceite y del 0,0001 al 12 % en peso del antioxidante con respecto a la grasa y el aceite.

#### VENTAJA DE LA INVENCION

- 10 El método de la presente invención hace posible proporcionar una formulación farmacéutica capaz de suprimir la generación de un producto de degradación de ED-71.

#### Breve descripción de los dibujos

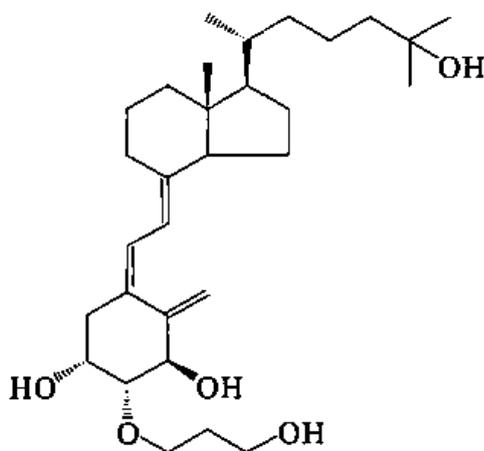
- 15 La figura 1 muestra un cromatógrafo de UV-HPLC (265 nm) de una solución de fármaco que se ha dejado durante 33 días en la condición de 40 °C/HR del 75 %; y  
La figura 2 muestra un cromatógrafo de IR-HPLC de la solución de fármaco que se ha dejado durante 33 días en la condición de 40 °C/HR del 75 %.

#### 20 MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá un aspecto más específico de la presente invención y un método para poner en práctica la presente invención.

- 25 (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol (ED-71) es un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:

#### [Fórmula 3]



- 30 El ED-71 puede obtenerse, por ejemplo, de acuerdo con el método descrito en la Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública n.º 10-72432, sometiendo (1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)colest-5,7-dieno-1,3,25-triol utilizado como material de partida a irradiación ultravioleta y reacción de isomerización térmica y después a purificación por HPLC de fase inversa y concentración, seguido de cristalización con acetato de acetato.

- 35 Un "antioxidante" utilizado en la presente invención incluye butilhidroxianisol (BHA), catequina, tocoferol, dibutilhidroxitolueno (BHT) y ácido cítrico. Estos antioxidantes pueden usarse solos o en combinación de 2 o más de ellos. El antioxidante es preferentemente dl- $\alpha$ -tocoferol.

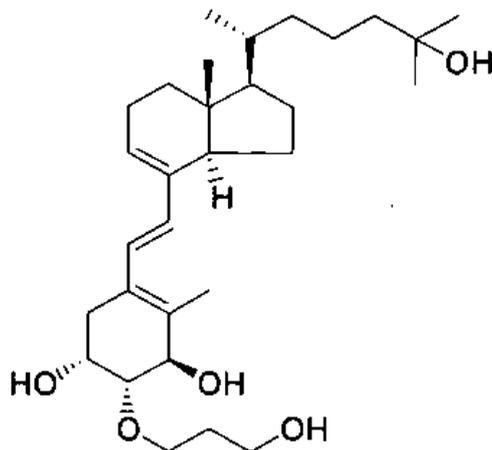
- 40 "Grasa y aceite" utilizados en la presente invención incluyen triglicéridos de cadena media (en lo sucesivo en el presente documento, también denominados "TCM"), tricaprilina, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y aceite vegetal. En este contexto, el aceite vegetal incluye aceite de coco, aceite de oliva, aceite de colza, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de soja, aceite de semilla de algodón, aceite de uva y aceite de cártamo. La grasa y el aceite son preferentemente TCM, tricaprilina, ácido caproico, ácido caprílico o ácido cáprico libre de ácidos grasos insaturados, preferentemente en particular TCM.

- 45 En la presente invención, "producto de degradación de ED-71" se refiere a los principales productos de degradación detectados durante el almacenamiento de ED-71 en forma de una preparación oleosa y es específicamente el

taquisterol y las formas trans de ED-71.

La forma de taquisterol de ED-71 es un compuesto que tiene la estructura principal de taquisterol y que se representa por la siguiente fórmula estructural, y cuyo nombre químico es 6E-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)9,10-secocolesta-5(10),6,8(9)trieno-1,3,25-triol:

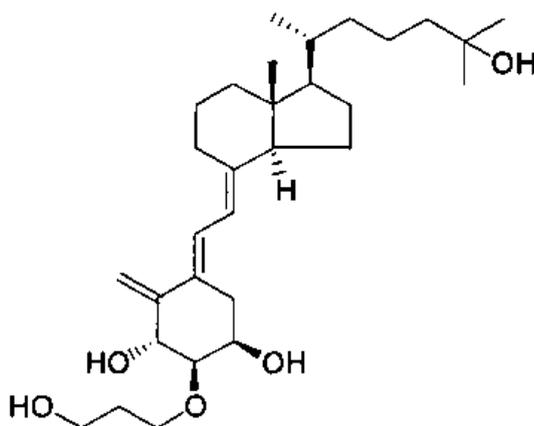
[Fórmula 4]



La forma de taquisterol puede sintetizarse de acuerdo con el método descrito en, por ejemplo, la Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N.º 10-72432, y también puede sintetizarse mediante el siguiente método: la forma taquisterol puede obtenerse sometiendo una solución en tetrahidrofurano de (1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-colesta-5,7-dien-1,3,25-triol utilizado como material de partida a irradiación ultravioleta a una temperatura baja en una atmósfera de argón y seguido de purificación por HPLC de fase inversa y concentración a sequedad.

La forma trans de ED-71 es un compuesto que tiene un doble enlace trans en la posición 5-6, que está representado por la siguiente fórmula estructural, y cuyo nombre químico es (5E,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol:

[Fórmula 5]



Como se ha descrito anteriormente, es importante para la producción de preparaciones de fármacos que el contenido de cada producto de degradación de un principio activo no supere el 1 %.

De acuerdo con los estudios realizados por los presentes inventores, después de que una preparación de ED-71, donde una solución de ED-71 disuelto en TCM se encapsula en una cápsula blanda, se almacenara durante 12 meses a 30 °C, que es el límite superior de la "temperatura ambiente", las cantidades de las formas tanto de taquisterol y como trans generadas excedieron el 1 % (véanse las Tablas 2 y 3 que se describen a continuación). Por tanto, en la producción de preparaciones de ED-71, se requiere suprimir la generación de estos productos de

degradación principales. Es decir, para poner la preparación de ED-71 en uso práctico, es importante no solo evitar la degradación del ED-71, sino también, preferentemente, evitar la degradación del mismo en las formas de taquisterol y trans.

- 5 La existencia de las formas de taquisterol y trans se puede confirmar mediante la detección de los mismos por cromatografía líquida de fase inversa y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de medición de 265 nm.

10 En un estado en el que se suprime la generación del producto de degradación de ED-71, las cantidades de cada una de las formas de taquisterol y trans generadas después de un almacenamiento de 12 meses a temperatura ambiente en la sombra son preferentemente del 1 % o menos, más preferentemente del 0,3 % o menos y preferentemente en particular del 0,1 % o menos.

15 En la presente invención, "preparación oleosa" se refiere a una preparación administrable por vía oral producida a partir de una solución de fármaco en grasa y aceite.

La preparación oleosa disponible en la presente invención incluye una cápsula blanda, una cápsula dura y una preparación líquida oleosa.

20 Una cápsula blanda se refiere a una preparación donde una solución de mezcla de un fármaco disuelto en grasa o aceite está encerrada en una cubierta compuesta principalmente por un componente formador de película tal como gelatina. Puede usarse en la presente invención cualquier método para la producción de una cápsula blanda, tal como un método de goteo o un método rotatorio-matricial, a condición de que el método sea capaz de producir cápsulas blandas. El método de goteo utiliza un principio de manera que un flujo de fluido de dos fases de una sustancia que sirve como un núcleo de cápsula y una sustancia que sirve como una cubierta de cápsula, cuando éstas se gotean simultáneamente desde una boquilla en un refrigerante, se transforman en gotitas por la tensión entre las superficies de contacto, que se enfrían a cápsulas de espuma que tienen cubiertas endurecidas. En el método rotatorio-matricial, pasan láminas (láminas que contienen un componente formador de gel, tal como gelatina) continuamente a través de dos rodillos de formación que rotan al contrario, que a su vez estampan cuerpos formadores de cápsulas fuera de las láminas mientras que el material de relleno se inyecta en el espacio entre dos secciones estampadas que luego se sueldan en sus extremos por acción térmica para formar una cápsula blanda con costura. Las cápsulas blandas de vitamina D y sus métodos de producción incluyen los descritos en las Publicaciones Internacionales N.º W001/15702, WO02/13755 y WO03/094897, y la Solicitud de Patente Internacional N. PCT/JP03/07885.

35 Una cápsula dura es una preparación donde una solución que contiene un fármaco se introduce en una cápsula de cubierta que consiste en un capuchón y un cuerpo que se componen principalmente de un componente formador de película tal como gelatina, y donde una porción solapada del capuchón y el cuerpo se sella mediante la aplicación de una solución de gelatina o similar a la misma, para evitar la fuga de la solución.

40 Las cubiertas de las cápsulas blandas y las cápsulas duras se componen de un componente formador de película, un plastificante, un agente tonalizador y así sucesivamente, que se mezclan juntos.

45 Un componente formador de película puede ser un componente derivado de animales, tal como diversos tipos de gelatinas o un componente no derivado de animales tal como diversos tipos de polímeros solubles en agua. Uno o más de estos componentes pueden mezclarse en una proporción arbitraria para su uso en una película. Un componente derivado de animales incluye la gelatina tratada con álcali, la gelatina tratada con ácido y la gelatina modificada químicamente. La gelatina modificada químicamente que puede usarse en la presente invención no se limita particularmente por su forma de modificación y puede ser la producida por reacción de un grupo amino de la gelatina con una sustancia tal como ácido succínico, ácido ftálico y ácido acético. La gelatina utilizada para la gelatina modificada químicamente también puede ser gelatina tratada con álcali o gelatina tratada con ácido. El componente no derivado de animales incluye: polisacáridos extraídos de algas marinas tales como agar, carragenano y ácido algínico; polisacáridos obtenidos de semillas de plantas tales como goma de algarroba, goma guar, goma de tamarindo, goma de Cassia y goma de semilla de tara; polisacáridos secretados por plantas tales como goma arábiga, goma de tragacanto, goma de almendra, y goma damson; polisacáridos extraídos de plantas tales como pectina, arabinogalactano y glucomanano; polisacáridos obtenidos a partir de microorganismos tales como goma de gelano, goma de xantano, pululano, dextrano y curdlano; y gomas de celulosa tales como celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa cristalinas.

60 Un plastificante incluye glicerina, sorbitol, maltosa, glucosa, maltitosa, sacarosa, xilitol, manitol, eritritol y polietilenglicoles (peso molecular: de 400 a 6000). En la presente invención, pueden usarse uno o más de estos plastificantes.

65 Un agente tonalizador incluye: óxidos metálicos tales como óxido de titanio, sesquióxido de hierro (colcothar), óxido férrico amarillo, óxido de hierro amarillo y óxido de cinc; compuestos inorgánicos tales como talco, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, silicato de magnesio y anhídrido silícico ligero; y colorantes alimentarios tales como caramelo, laca de aluminio rojo alimentario N.º 3, laca de aluminio amarillo alimentario N.º 4, laca de aluminio

amarillo alimentario N.º 5, laca de aluminio verde alimentario N.º 3, laca de aluminio azul alimentario N.º 2 y clorofilina de cobre de sodio. En la presente invención, pueden usarse uno o más de estos agentes tonalizadores insolubles en agua.

5 "Preparación líquida oleosa" se refiere a una preparación en la que una solución oleosa que contiene un fármaco se introduce en un recipiente herméticamente sellado (por ejemplo, un recipiente de vidrio, un recipiente de plástico y un recipiente de envasado de sobrecitos).

10 La cantidad de grasa y aceite utilizada en la preparación de la presente invención no se limita particularmente. Sin embargo, la cantidad es preferentemente de 50 a 500 mg, preferentemente en particular de 60 a 250 mg, por cápsula (cápsulas blandas y cápsulas duras). La cantidad de la grasa y el aceite utilizados en una preparación de líquido oleoso es preferentemente de 0,5 a 5 g, preferentemente en particular de 1 a 3 g, por recipiente.

15 El contenido de ED-71 contenido en una preparación se define adicionalmente en la reivindicación independiente 1. La cantidad de ED-71 por preparación unitaria es preferentemente de 0,05 a 5 µg, preferentemente en particular de 0,5 a 0,75 µg. Cuando esta cantidad se convierte en una concentración de ED-71 en grasa y aceite, la concentración para una cápsula es preferentemente del 0,00001 % o más en peso, preferentemente en particular del 0,0002 % o más en peso a preferentemente el 0,01 % o menos en peso, preferentemente en particular el 0,00125 % o menos en peso. Para una preparación líquida oleosa, esta concentración es preferentemente del 0,000001 % o más en peso, preferentemente en particular del 0,000017 % o más en peso a preferentemente el 0,001 % o menos en peso, preferentemente en particular el 0,000075 % o menos en peso.

25 La cantidad de un antioxidante que puede mezclarse en grasa o aceite se define adicionalmente en la reivindicación independiente 1. En general, puede usarse un antioxidante en cantidades no mayores que la cantidad máxima de uso que es tolerada por los antioxidantes (por ejemplo, cantidades no superiores a la cantidad máxima de uso ya aprobada y descrita en *Pharmaceutical Additive Dictionary* (Yakuji Nippo, 2000) o no superior al límite de uso descrito en *The Japan's Specifications and Standards for Food Additives* (Japan Food Additives Association, 1999)).

30 Entre otros, el dl- $\alpha$ -tocoferol está contenido en grasa y aceite en una cantidad de, preferentemente, el 0,0001 % o más en peso, más preferentemente el 0,002 % o más en peso, preferentemente en particular el 0,01 % o más en peso, a preferentemente el 12 % o menos en peso, más preferentemente el 1 % o menos en peso, preferentemente en particular el 0,1 % o menos en peso, en cápsulas. En una preparación oleosa líquida, preferentemente el 0,0001 % o más en peso, más preferentemente el 0,002 % o más en peso, preferentemente en particular el 0,01 % o más en peso a preferentemente el 1,2 % o menos en peso, más preferentemente el 1 % o menos en peso, preferentemente en particular el 0,1 % o menos en peso de dl- $\alpha$ -tocoferol está contenido en grasa y aceite. Dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, galato de propilo y similares son iguales que en el caso anterior de dl- $\alpha$ -tocoferol.

## 40 Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con todo detalle con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, la presente invención no tiene por objeto limitarse a estos Ejemplos de ninguna manera. En los Ejemplos a continuación, ED-71 y una forma de taquisterol utilizada se sintetizaron mediante el método descrito en la Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N.º 10-72432.

45 Ejemplo 1: Síntesis de la forma trans ((5E,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol ) y sus datos de propiedades físicas

(Procedimientos de síntesis y purificación)

50 Se colocó ED-71 (500 mg) en un matraz de forma de berenjena de 50 ml en una atmósfera de nitrógeno, al que se le inyectaron 30 ml de dióxido de azufre líquido y se calentaron a reflujo (aproximadamente a -15 °C) con agitación durante 3 horas. El dióxido de azufre se separó por destilación para obtener 560 mg de (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-6,19-sulfona-9,10-secocolesta-5(10),7-dieno-1,3,25-triol (en lo sucesivo en el presente documento, denominado un "aducto de dióxido de azufre") en forma de un sólido de color amarillo pálido. Se añadieron el aducto de dióxido de azufre (200 mg), 500 mg de hidrogenocarbonato de sodio y 20 ml de etanol a un matraz de forma de berenjena de 50 ml y se sometieron a reflujo en agitación durante 210 minutos. Después de enfriar, la materia insoluble se separó por filtración y el filtrado se concentró a sequedad. El concentrado seco se disolvió en 10 ml de etanol y 10 ml de éter dietílico y se filtró y el filtrado resultante se concentró a sequedad.

60 El concentrado seco se desarrolló y se trató en HPLC preparativa de fase inversa (aparato: fabricado por Hitachi, Ltd., columna: Kromasil ODS (KR100-7-C18, 250 × 20 mm de D.I., fabricado por Eka Chemicals), fase móvil: solución de acetonitrilo al 50 %, caudal: 9,99 ml/min, detección: UV = 220 nm y 265 nm) para fraccionar una porción eluida de 54 minutos a 68 minutos. La solución fraccionada se concentró a sequedad para obtener 65 aproximadamente 50 mg de sólido de color blanco. El sólido de color blanco obtenido se disolvió en una pequeña cantidad de etanol y 0,5 ml de acetato de etilo y se cristalizó en una cámara de congelación fijada a -20 °C. Se

separó un cristal precipitado de este modo, después se lavó con una cantidad traza de acetato de etilo y se secó para obtener 39 mg de la forma trans (rendimiento: 22 %).

(Datos de propiedad física)

5 Pureza de la HPLC: 99,6 % (condiciones de HPLC: Kromasil 100-5C18 ODS, 5 µm, 4,6 mm de D.I. × 250 mm, solución de acetonitrilo al 55 %, caudal: 0,9 ml/min, 220 nm, 1 mg/ml 10 µl, intervalo de área medida: de 4 a 30 min).

10 RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) (ppm): 6,63 (1H, d, J = 11,2 Hz), 5,85 (1H, d, J = 11,6 Hz), 5,18 (1H, t, J = 1,8 Hz), 5,13 (1H, t, J = 1,8 Hz), 4,43 (1H, d, J = 8,3 Hz), 4,28 (1H, ddd, J = 3,6 Hz, 3,6 Hz, 3,6 Hz), 3,7-4,0 (3H, m), 3,34 (1H, dd, J = 2,8 Hz, 8,4 Hz), 1,21 (6H, s), 0,93 (3H, d, J = 6,3 Hz), 0,56 (3H, s).

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) (ppm): 149,2, 145,4, 132,0, 123,4, 116,0, 109,0, 84,2, 71,3, 71,1, 66,3, 61,2, 56,5, 45,9, 44,4, 40,5, 36,4, 36,0, 31,8, 29,3, 29,2, 29,1, 27,6, 23,5, 22,3, 20,8, 18,8, 18,4, 12,2.

UV (etanol) (λ máx): 209,8 nm (ε 12300), 274,6 nm (ε 23200).

15 IR (KBr) (cm<sup>-1</sup>): 3365, 2951, 2935, 2877, 2845, 1628, 1468, 1458, 1437, 1375, 1363, 1350, 1333, 1215, 1120, 1080, 1059, 1034, 997, 958, 947, 933, 904, 891, 872, 729, 715, 683, 638, 627.

#### Ejemplo 2: identificación de los principales productos de degradación en la cápsula blanda que comprende ED-71

20 (Procedimientos)

Se usó ED-71 marcado con tritio (2β-([3-<sup>3</sup>H]-3-hidroxiopropil)-1α,3β-25-trihidroxicolesta-5,7,10(19)-trieno (denominado como alternativa (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-([3-<sup>3</sup>H]-3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol, en lo sucesivo en el presente documento denominado "<sup>3</sup>H-ED-71")) (*J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 42, 519-525 (1999)) y se disolvió junto con ED-71 no marcado en TCM (concentración de ED-71 1 µg/100 mg, concentración de <sup>3</sup>H-ED-71: 1,38 MBq/ml). Esta solución de fármaco se cargó (0,08 ml/cápsula) en cápsulas blandas vacías (que tenían una cubierta que consistía en 47,67 mg de gelatina, 16,68 mg de glicerina y 0,65 mg de óxido de titanio y se produjeron mediante un método de troquel giratorio) por medio de una jeringuilla con una aguja. Las cápsulas se sellaron con gelatina y se dejaron durante 33 días en 40 °C/HR del 75 % y sombra. Los productos de degradación generados en la solución de fármaco se detectaron con HPLC (fabricada por Shimadzu) equipada con detectores de UV e IR.

Condiciones del análisis por HPLC

35 Columna: YMC-Pack ODS AM-303 (250 × 4,6 mm, 5 µm), fabricada por YMC Co., Ltd.

Fase móvil: acetonitrilo/agua = 1:1

Caudal: 1,2ml/min

Detección de picos: UV 265 nm, IR

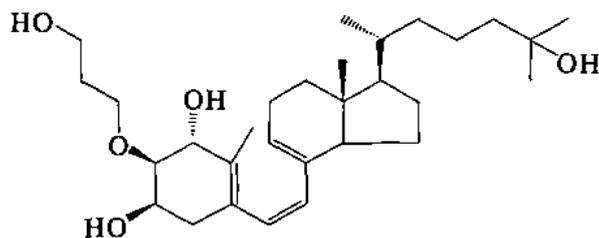
Temperatura de la columna: 30 °C

40 (Resultados)

Los cromatogramas obtenidos por medición por HPLC de la solución de fármaco que se ha dejado durante 33 días en las condiciones de 40 °C/HR del 75 % se muestran en las Figuras 1 y 2. En el cromatograma de IR, se detectaron picos menores a aproximadamente 16 minutos y 24 minutos ambos, además de un pico principal correspondiente a ED-71 y un pico menor correspondiente a la forma pre de ED-71 a aproximadamente 17 minutos. Estos dos picos no se detectan en una muestra antes del almacenamiento a 40 °C/HR del 75 % y los picos detectados en IR-HPLC derivan de <sup>3</sup>H-ED-71. Por tanto, se sugirió que estos dos componentes son los productos de degradación principales de ED-71. El pico eluido a aproximadamente 16 minutos fue casi idéntico a la posición del pico principal eluido detectado en el análisis de una solución patrón de la forma de taquisterol en las mismas condiciones de HPLC y, por tanto, se considera que deriva de la forma de taquisterol. El pico eluido a aproximadamente 24 minutos fue casi idéntico a la posición del pico principal eluido detectado en el análisis de una solución patrón de la forma trans en las mismas condiciones de HPLC y, por tanto, se considera que deriva de la forma trans.

55 La forma pre de ED-71 (nombre químico: 6Z-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopropoxi)-9,10-secocolesta-5(10),6,8(9)-trieno-1,3,25-triol) es un compuesto existente en forma de un isómero que tiene una relación de equilibrio con ED-71 en una solución oleosa o acuosa o en un disolvente orgánico tal como etanol (Patente Japonesa Abierta a Inspección Pública N.º 10-72432) y se representa por la siguiente fórmula estructural:

[Fórmula 6]



Forma pre de ED-71

Ejemplo 3:

- 5 Para examinar la influencia de un antioxidante sobre la generación de los principales productos de degradación en una preparación que comprende ED-71, se almacenaron cápsulas blandas rellenas con una solución de TCM que contenía ED-71 y un antioxidante en diversos tipos de condiciones y se evaluaron para determinar el comportamiento de generación del taquisterol y las formas trans.

10 (Formulación)

La formulación de la cápsula blanda de ensayo se muestra en la Tabla 1. Se mezcló ED-71 en la formulación en una cantidad del 0,0001 % en peso con respecto al TCM. Se usaron dl- $\alpha$ -tocoferol (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y BHT (dibutilhidroxitolueno) (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) solos o en combinación como un antioxidante. La cantidad de cada uno de los antioxidantes añadidos se fijó en el 0,02 % en peso con respecto al TCM. Las formulaciones que contienen el antioxidante o antioxidantes se definieron como Formulaciones 1, 2 y 3, mientras que una formulación sin antioxidantes se definió como Formulación de Control 1. [Tabla 1]

20

Tabla 1 Formulación de cápsula blanda

| Nombre del material           | Formulación de Control 1 | Formulación 1 | Formulación 2     | Formulación 3            |
|-------------------------------|--------------------------|---------------|-------------------|--------------------------|
|                               | Sin antioxidante         | BHT añadido   | Tocoferol añadido | BHT + tocoferol añadidos |
| <b>Cubierta de la cápsula</b> |                          |               |                   |                          |
| Gelatina (APB-H)              | 47,67 mg                 |               |                   |                          |
| Glicerina                     | 16,68 mg                 |               |                   |                          |
| Óxido de titanio              | 0,65 mg                  |               |                   |                          |
| Agua purificada               |                          |               |                   |                          |
| Subtotal                      | 65,00 mg                 |               |                   |                          |
| <b>Solución de núcleo</b>     |                          |               |                   |                          |
| ED-71                         | 1 $\mu$ g                | 1 $\mu$ g     | 1 $\mu$ g         | 1 $\mu$ g                |
| Etanol anhidro                | 1,30 mg                  | 1,30 mg       | 1,30 mg           | 1,30 mg                  |
| BHT                           |                          | 0,02 mg       |                   | 0,02 mg                  |
| dl- $\alpha$ -tocoferol       |                          |               | 0,02 mg           | 0,02 mg                  |
| TCM (ODO-C)                   | 98,70 mg                 | 98,68 mg      | 98,68 mg          | 98,66 mg                 |
| Subtotal                      | 100,00 mg                | 100,00 mg     | 100,00 mg         | 100,00 mg                |
| Total                         | 165,00 mg                | 165,00 mg     | 165,00 mg         | 165,00 mg                |

(Procedimientos de producción para la cápsula blanda)

- 25 Las cápsulas blandas se produjeron mediante un método de goteo por medio de una máquina de llenado de cápsulas sin costura (SPHEREX, fabricado por Freund Corporation) de manera que los pesos de la solución de fármaco y de la cubierta eran de 100 mg y 65 mg, respectivamente, por cápsula.

(Condiciones de almacenamiento)

- 30 Aproximadamente 100 cápsulas, cada una de las cápsulas blandas se pusieron en un vial. Después, los viales se sellaron herméticamente o se dejaron sin sellar y se almacenan durante 12 meses en las condiciones de 30 °C/HR del 60 % y sombra.

(Procedimientos de confirmación para las formas de taquisterol y trans)

Después de la terminación del período de almacenamiento, la solución de fármaco se extrajo de cada una de las cápsulas blandas y una alícuota de 50 µl de las mismas se sometió a análisis por HPLC.

- 5           Columna: YMC-Pack ODS AM-303 (250 × 4,6 mm, 5 µm), fabricada por YMC Co., Ltd.  
               Fase móvil: acetonitrilo/agua = 1:1  
               Caudal: 1,2ml/min  
               Detección de picos: 265 nm  
 10          Temperatura de la columna: 30 °C

Una relación de área del pico de la forma de taquisterol o trans con respecto a la suma total de las áreas de los picos detectados se calculó y se usó como un índice de la cantidad de la forma de taquisterol o trans generada.

15 (Procedimientos de medición para el contenido de ED-71)

El contenido de ED-71 se midió mediante un método de HPLC que se muestra a continuación para determinar una tasa residual después de que termina el período de almacenamiento.

20 • Procedimientos de preparación para la solución de patrón interno:

Se pesaron con precisión aproximadamente 2 mg de 4-hidroxibenzoato de heptilo y se añadió etanol a un volumen de 100 ml con precisión. Esta solución se diluyó 10 veces con etanol y se usó como una solución de patrón interno.

25 • Procedimientos de preparación para la solución patrón:

Se pesaron con precisión aproximadamente 2 mg de un patrón de ED-71 y se añadió etanol a un volumen de 200 ml con precisión. Se tomó con precisión una alícuota 2,5 ml de esta solución y se añadió etanol a un volumen de 20 ml con precisión. La solución resultante se usó como una solución patrón sin diluir.

30 Se colocaron aproximadamente 300 mg de TCM en un matraz en forma de pera de 10 ml, al que después se le añadieron 2 ml de la solución patrón sin diluir y 2 ml de la solución de patrón interno. Esta solución de mezcla se secó a una presión reducida en un evaporador a temperatura ambiente durante 10 o más minutos. La solución de TCM restante se usó como una solución patrón.

35 • Procedimientos de preparación para la solución de muestra:

40 Las soluciones de fármaco se extrajeron de las cápsulas y se pesaron con precisión aproximadamente 300 mg y se colocaron en un matraz en forma de pera de 10 ml. A estas soluciones del matraz, se les añadieron con precisión 2 ml de la solución de patrón interno y después se secaron a una presión reducida en un evaporador a temperatura ambiente durante 10 minutos. La solución de TCM restante se usó como solución de muestra.

• Condiciones del análisis por HPLC:

45 Las soluciones de muestra y la solución patrón (50 µl cada uno) se sometieron a análisis por HPLC con cambio de columna en las condiciones que se describen a continuación.

- 50           Columna: YMC-Pack ODS AM-303 (250 × 4,6 mm, 5 µm), fabricada por YMC Co., Ltd.  
               Fase móvil: (precolumna) TCM se eluye en un gradiente usando un gradiente de solución de mezcla de acetonitrilo/agua (1:1) como Solución A y acetonitrilo como solución B.  
               (Columna de análisis): solución de mezcla de acetonitrilo/agua (1:1)  
               Caudal: 1,2 ml/min  
               Longitud de onda de detección: 265 nm  
               Temperatura de la columna: 23 °C

55 (Resultados)

Los resultados de detección de la forma de taquisterol, la forma trans y ED-71 por HPLC se muestran en las Tablas 2 a 4. [Tabla 2]

60

Tabla 2 Relación de área de pico de la forma de taquisterol después del almacenamiento de un vial herméticamente sellado o sin sellar que almacenaba una cápsula blanda que contenía 1 µg de ED-71 a 30 °C/HR del 60 % y sombra

| Condiciones de almacenamiento               | Período de almacenamiento (meses) | Relación de área de pico de la forma de taquisterol |               |               |                 |
|---|-----------------------------------|---|---------------|---------------|-----------------|
|   |                                   | Formulación de control 1                            | Formulación 1 | Formulación 2 | Formulación 3   |
|   |                                   | Sin antioxidante                                    | BHT           | Tocoferol     | BHT + tocoferol |
| 30 °C/HR del 60 %<br>Herméticamente sellado | 0                                 | N.D.  | N.D.          | N.D.          | N.D.            |
|   | 6                                 | 1,31  | N.D.          | N.D.          | N.D.            |
|   | 12                                | 1,85  | 0,56          | N.D.          | N.D.            |
| 30 °C/HR del 60 %<br>Sin sellar             | 0                                 | N.D.  | N.D.          | N.D.          | N.D.            |
|   | 6                                 | 1,54  | N.D.          | N.D.          | N.D.            |
|   | 12                                | 2,06  | 0,63          | N.D.          | N.D.            |

n = 1, N.D. < 0,1 % [0075]

[Tabla 3]

5 Tabla 3 Relación de área de pico de la forma trans después del almacenamiento de un vial herméticamente sellado o sin sellar que almacenaba una cápsula blanda que contenía 1 µg de ED-71 a 30 °C/HR del 60 % y sombra

| Condiciones de almacenamiento               | Período de almacenamiento (meses) | Relación de área de pico de la forma trans |               |               |                 |
|---|-----------------------------------|--|---------------|---------------|-----------------|
|   |                                   | Formulación de control 1                   | Formulación 1 | Formulación 2 | Formulación 3   |
|   |                                   | Sin antioxidante                           | BHT           | Tocoferol     | BHT + tocoferol |
| 30 °C/HR del 60 %<br>Herméticamente sellado | 0                                 | N.D.                                       | N.D.          | N.D.          | N.D.            |
|   | 6                                 | 1,31                                       | N.D.          | N.D.          | N.D.            |
|   | 12                                | 1,85                                       | 0,56          | N.D.          | N.D.            |
| 30 °C/HR del 60 %<br>Sin sellar             | 0                                 | N.D.                                       | N.D.          | N.D.          | N.D.            |
|   | 6                                 | 1,54                                       | N.D.          | N.D.          | N.D.            |
|   | 12                                | 2,06                                       | 0,63          | N.D.          | N.D.            |

n = 1, N.D. < 0,1 %

[Tabla 4]

10 Tabla 4 Tasas residuales de ED-71 después del almacenamiento de un vial herméticamente sellado o sin sellar que almacenaba una cápsula blanda que contenía 1 µg de ED-71 a 30 °C/HR del 60 % y sombra

| Condiciones de almacenamiento               | Período de almacenamiento (meses) | Tasa residual de ED-71 (%) |               |               |                 |
|---|-----------------------------------|----------------------------|---------------|---------------|-----------------|
|   |                                   | Formulación de control 1   | Formulación 1 | Formulación 2 | Formulación 3   |
|   |                                   | Sin antioxidante           | BHT           | Tocoferol     | BHT + tocoferol |
| 30 °C/HR del 60 %<br>Herméticamente sellado | 6                                 | 96,7                       | 99,9          | 100,5         | 100,0           |
|   | 12                                | 93,0                       | 98,3          | 98,3          | 98,6            |
| 30 °C/HR del 60 %<br>Sin sellar             | 6                                 | 93,6                       | 98,0          | 97,6          | 97,9            |
|   | 12                                | 88,1                       | 93,7          | 95,0          | 95,5            |

n = 1

15 Como puede observarse a partir de las Tablas 2 a 3, las cantidades de las formas de taquisterol y trans generadas en la preparación de la formulación de control durante el almacenamiento de 12 meses en el estado sin sellar fueron del 1,741 % y el 2,06 %, respectivamente, en términos de la relación de área del pico, mientras que las cantidades en ambas formulaciones 2 y 3 se suprimieron al límite de detección (0,1 %) o inferior. Como puede observarse en la Tabla 4, las tasas residuales de ED-71 en las Formulaciones 1, 2 y 3 fueron más altas que en la Formulación de control. Los resultados mostraron que la generación de las formas de taquisterol y trans se suprime en todas las

20 Formulaciones 1, 2 y 3 a las que se les añadieron un antioxidante o antioxidantes, en comparación con la formulación de control.

Ejemplo 4:

25 Para examinar la influencia de la cantidad de un antioxidante añadido en la generación de los principales productos de degradación en una preparación que comprende ED-71, se almacenaron cápsulas blandas rellenas con una solución de TCM que contenía ED-71 con cantidades variables de dl- $\alpha$ -tocoferol añadido a la misma, en diversos

tipos de condiciones y se evaluaron para determinar el comportamiento de generación de las formas de taquisterol y trans.

(Formulación)

5 La formulación de la cápsula blanda de ensayo se muestra en la Tabla 5. Se mezcló ED-71 en la formulación en una cantidad del 0,001 % en peso con respecto al TCM. Se usó dl- $\alpha$ -tocoferol (fabricado por Eisai Co., Ltd.) como antioxidante y se mezcló en una cantidad del 0,002 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 % y 0,04 % en peso con respecto al TCM (en las Formulaciones 4, 5, 6, 7 y 8, respectivamente). Una formulación sin dl- $\alpha$ -tocoferol se definió como  
10 Formulación de Control 2.

[Tabla 5]

| Tabla 5 Formulaciones de cápsula blanda |                          |               |               |
|---|--------------------------|---------------|---------------|
| Nombre del material                     | Formulación de Control 2 | Formulación 4 | Formulación 5 |
|   | 0 %                      | 0,002 %       | 0,005 %       |
| <u>Cubierta de la cápsula</u>           |                          |               |               |
| Gelatina (APB-H)                        | 47,67 mg                 |               |               |
| Glicerina                               | 16,68 mg                 |               |               |
| Óxido de titanio<br>(Agua purificada)   | 0,65 mg<br>(71,84 mg)    |               |               |
| Total                                   | 65,00 mg                 |               |               |
| <u>Solución de núcleo</u>               |                          |               |               |
| ED-71                                   | 0,001 mg                 | 0,001 mg      | 0,001 mg      |
| Etanol anhidro                          | 1,300 mg                 | 1,300 mg      | 1,300 mg      |
| dl- $\alpha$ -tocoferol                 | 0,000 mg                 | 0,002 mg      | 0,005 mg      |
| TCM (ODO-C)                             | 98,700 mg                | 98,697 mg     | 98,694 mg     |
| Total                                   | 100,000 mg               | 100,000 mg    | 100,000 mg    |
| Nombre del material                     | Formulación 6            | Formulación 7 | Formulación 8 |
|   | 0,01 %                   | 0,02 %        | 0,04 %        |
| <u>Cubierta de la cápsula</u>           |                          |               |               |
| Gelatina (APB-H)                        | 47,67 mg                 |               |               |
| Glicerina                               | 16,68 mg                 |               |               |
| Óxido de titanio<br>(Agua purificada)   | 0,65 mg<br>(71,84 mg)    |               |               |
| Total                                   | 65,00 mg                 |               |               |
| <u>Solución de núcleo</u>               |                          |               |               |
| ED-71                                   | 0,001 mg                 | 0,001 mg      | 0,001 mg      |
| Etanol anhidro                          | 1,300 mg                 | 1,300 mg      | 1,300 mg      |
| dl- $\alpha$ -tocoferol                 | 0,010 mg                 | 0,020 mg      | 0,040 mg      |
| TCM (ODO-C)                             | 98,689 mg                | 98,679 mg     | 98,659 mg     |
| Total                                   | 100,000 mg               | 100,000 mg    | 100,000 mg    |

15 (Procedimientos de producción de cápsulas blandas)

Las cápsulas blandas se produjeron mediante un método de goteo por medio de una máquina de llenado de cápsulas sin costura (SPHEREX, fabricado por Freund Corporation) de manera que los pesos de la solución de fármaco y la cubierta eran de 100 mg y 65 mg, respectivamente, por cápsula.  
20

(Condiciones de almacenamiento y procedimientos de confirmación para formas de taquisterol y trans)

25 Se pusieron aproximadamente 100 cápsulas, cada una de las cápsulas blandas, en un vial y se almacenaron a 40 °C durante 3 meses en condiciones de sombra, con el vial herméticamente sellado. Después de la terminación del período de almacenamiento, la solución de fármaco se extrajo de cada uno de las cápsulas blandas y las cantidades de las formas de taquisterol y trans generadas se midieron mediante el método descrito en el Ejemplo 3.

(Resultados)

30 Los resultados de detección de la forma de taquisterol y la forma trans por HPLC se muestran en las Tablas 6 y 7.

[Tabla 6]

Tabla 6 Relación de área de pico de la forma de taquisterol después del almacenamiento de un vial herméticamente sellado que almacenaba una cápsula blanda que contenía 1 µg de ED-71 a 40 °C con sombra

| Condiciones de almacenamiento   | Período de almacenamiento (mes) | Relación de área de pico de la forma de taquisterol |                         |                         |
|---------------------------------|---------------------------------|---|-------------------------|-------------------------|
|                                 |                                 | Formulación de control 2 (0 %)                      | Formulación 4 (0,002 %) | Formulación 5 (0,005 %) |
| 40 °C<br>Herméticamente sellado | 0                               | N.D.  | N.D.                    | N.D.                    |
|                                 | 1                               | 1,22  | 0,46                    | 0,27                    |
|                                 | 2                               | 2,81  | 0,90                    | 0,51                    |
|                                 | 3                               | 4,04  | 1,34                    | 0,86                    |

| Condiciones de almacenamiento   | Período de almacenamiento (mes) | Relación de área de pico de la forma de taquisterol |                        |                        |
|---------------------------------|---------------------------------|---|------------------------|------------------------|
|                                 |                                 | Formulación 6 (0,01 %)                              | Formulación 7 (0,02 %) | Formulación 8 (0,04 %) |
| 40 °C<br>Herméticamente sellado | 0                               | N.D.  | N.D.                   | N.D.                   |
|                                 | 1                               | 0,24  | N.D.                   | N.D.                   |
|                                 | 2                               | 0,46  | 0,28                   | N.D.                   |
|                                 | 3                               | 0,64  | 0,42                   | 0,23                   |

Los porcentajes entre paréntesis son la cantidad de dl-α-tocoferol añadida.  
n = 1, N.D. < 0,1 %

5

[Tabla 7]

Tabla 7 Relación de área de pico de la forma trans después del almacenamiento de un vial herméticamente sellado que almacenaba una cápsula blanda que contenía 1 µg de ED-71 a 40 °C con sombra

| Condiciones de almacenamiento   | Período de almacenamiento (mes) | Relación de área de pico de la forma trans |                         |                         |
|---------------------------------|---------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|
|                                 |                                 | Formulación de control 2 (0 %)             | Formulación 4 (0,002 %) | Formulación 5 (0,005 %) |
| 40 °C<br>Herméticamente sellado | 0                               | N.D.                                       | N.D.                    | N.D.                    |
|                                 | 1                               | 0,87                                       | N.D.                    | N.D.                    |
|                                 | 2                               | 2,18                                       | N.D.                    | N.D.                    |
|                                 | 3                               | 3,33                                       | 0,60                    | 0,14                    |

| Condiciones de almacenamiento   | Período de almacenamiento (mes) | Relación de área de pico de la forma trans |                        |                        |
|---------------------------------|---------------------------------|--|------------------------|------------------------|
|                                 |                                 | Formulación 6 (0,01 %)                     | Formulación 7 (0,02 %) | Formulación 8 (0,04 %) |
| 40 °C<br>Herméticamente sellado | 0                               | N.D.                                       | N.D.                   | N.D.                   |
|                                 | 1                               | N.D.                                       | N.D.                   | N.D.                   |
|                                 | 2                               | N.D.                                       | N.D.                   | N.D.                   |
|                                 | 3                               | N.D.                                       | N.D.                   | N.D.                   |

Los porcentajes entre paréntesis son la cantidad de dl-α-tocoferol añadida.  
n = 1, N.D. < 0,1 %

10

Como puede observarse a partir de las Tablas 6 y 7, se observó un efecto de supresión de la generación de las formas de taquisterol y trans en las Formulaciones 4 a 8 (incluso cuando la cantidad de dl-α-tocoferol añadida fue del 0,002 % en peso) en comparación con la formulación de control. El efecto de supresión de la generación de la forma de taquisterol se observó de manera que el efecto era dependiente de la cantidad de dl-α-tocoferol añadida. Por otra parte, para el efecto de supresión de la generación de la forma trans, la cantidad de la forma trans generada fue del 0,1 % o menos en todas las regiones donde la cantidad de dl-α-tocoferol añadida fue del 0,01 % o más. Estos resultados muestran que el dl-α-tocoferol suprime la generación de los principales productos de degradación de ED-71 de una manera dependiente de la concentración, e incluso cuando se añade en una cantidad del 0,002 % en peso, tiene un efecto notable de supresión de la generación de los principales productos de degradación.

15

20

Ejemplo 5:

Para evaluar los efectos de diversos tipos de antioxidantes sobre la generación de los principales productos de degradación en una preparación que comprende ED-71, se almacenaron soluciones de TCM que contenían ED-71

junto con diversos tipos de antioxidantes añadidos a 50 °C durante 1 mes y se evaluaron para determinar el comportamiento de generación de las formas de taquisterol y trans.

(Formulación)

5 Se mezcló ED-71 en una cantidad del 0,0017 % en peso con respecto al TCM en formulaciones. Se usaron dl- $\alpha$ -tocoferol (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), dibutilhidroxitolueno (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), butilhidroxianisol (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y galato de propilo (fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) solos como un antioxidante. La cantidad de cada uno de los  
10 antioxidantes añadidos se fijó al 0,2 % en peso con respecto al TCM. Las formulaciones que contenían un antioxidante se definieron como las Formulaciones 9, 10, 11 y 12, mientras que una formulación sin el antioxidante se definió como Formulación de Control 3.

(Condiciones de almacenamiento y procedimientos de confirmación para las formas de taquisterol y trans)

15 Se colocó aproximadamente 1 g de cada una de las soluciones de fármaco de las Formulaciones 9 a 12 en un tubo de muestreo. El tubo se cerró herméticamente y se almacenó a 50 °C durante 1 mes en una condición de sombra. Después de la finalización del período de almacenamiento, las cantidades de las formas de taquisterol y trans generadas en cada una de las soluciones de fármaco se midieron mediante el método descrito en el Ejemplo 3.

(Resultados)

Los resultados de detección de la forma de taquisterol y la forma trans por HPLC se muestran en la Tabla 8.

25 [Tabla 8] Relaciones de área de pico de las formas de taquisterol y trans después del almacenamiento de una solución de TCM que contenía ED-71 a 50 °C durante 1 mes en una condición de sombra

| Formulación              | Antioxidante            | Relación de área de pico (%) |                |
|--------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------|
|                          |                         | La forma de taquisterol      | La forma trans |
| Formulación de Control 3 | No se usó               | 0,76                         | 0,43           |
| Formulación 9            | dl- $\alpha$ -tocoferol | N.D.                         | N.D.           |
| Formulación 10           | dibutilhidroxitolueno   | N.D.                         | N.D.           |
| Formulación 11           | Butilhidroxianisol      | N.D.                         | N.D.           |
| Formulación 12           | Galato de propilo       | N.D.                         | N.D.           |

n = 1, N.D. < 0,1 %

Como puede observarse a partir de la Tabla 8, todos los antioxidantes utilizados suprimieron notablemente la generación de las formas de taquisterol y trans.

Ejemplo 6

35 Se prepararon preparaciones que comprendían ED-71 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4, excepto por que las cápsulas de preparación de ensayo eran cápsulas blandas que tenían las formulaciones que se describen a continuación, y se evaluaron para determinar el comportamiento de generación de las formas de taquisterol y trans. Todas las preparaciones de las formulaciones suprimieron la generación de las formas de taquisterol y trans.

[Tabla 9]

40

Tabla 9 Formulación de cápsula blanda

| Nombre del material     | Formulación 13 | Formulación 14 |
|-------------------------|----------------|----------------|
|                         | (0,02 %)       | (0,02 %)       |
| Cubierta de la cápsula  |                |                |
| Gelatina (APB-H)        | 54,71 mg       |                |
| Sorbitol                | 8,34 mg        |                |
| Caramelo (2MC)          | 1,95 mg        |                |
| (Agua purificada)       | (82,33 mg)     |                |
| Total                   | 65,00 mg       |                |
| Solución de núcleo      |                |                |
| ED-71                   | 0,0005 mg      | 0,001 mg       |
| Etanol anhidro          | 1,300 mg       | 1,300 mg       |
| dl- $\alpha$ -tocoferol | 0,020 mg       | 0,020 mg       |
| TCM (ODO-C)             | 98,6795 mg     | 98,679 mg      |

| Nombre del material | Formulación 13 | Formulación 14 |
|---------------------|----------------|----------------|
|                     | (0,02 %)       | (0,02 %)       |
| Total               | 100,000 mg     | 100.000 mg     |

**Aplicabilidad industrial**

- 5 El método de la presente invención hace posible proporcionar una formulación farmacéutica capaz de suprimir la generación de un producto de degradación de ED-71. La forma trans de ED-71 es útil como un patrón en el análisis de la preparación de ED-71 y también es útil como un material para la síntesis de diversos tipos de compuestos a base de vitamina D.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de supresión de la isomerización que se produce en una preparación oleosa que comprende (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol, y grasa y aceite, que comprende
- 5 añadir un antioxidante a la preparación, donde la isomerización es que (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol se isomeriza a 6E-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5(10),6,8(9)-trieno-1,3,25-triol y/o (5E,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol, y el antioxidante se añade a la preparación de manera que la preparación comprende del 0,0001 al 12 % en peso del antioxidante con respecto a la grasa y el aceite,
- 10 donde la preparación comprende del 0,000001 al 0,01 % en peso de (5Z,7E)-(1R,2R,3R)-2-(3-hidroxiopoxi)-9,10-secocolesta-5,7,10(19)-trieno-1,3,25-triol con respecto a la grasa y el aceite, y donde el antioxidante se selecciona entre el grupo que consiste en butilhidroxianisol (BHA), catequina, dl- $\alpha$ -tocoferol, dibutilhidroxitolueno (BHT) y ácido cítrico.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el antioxidante es dl- $\alpha$ -tocoferol.

Figura 1

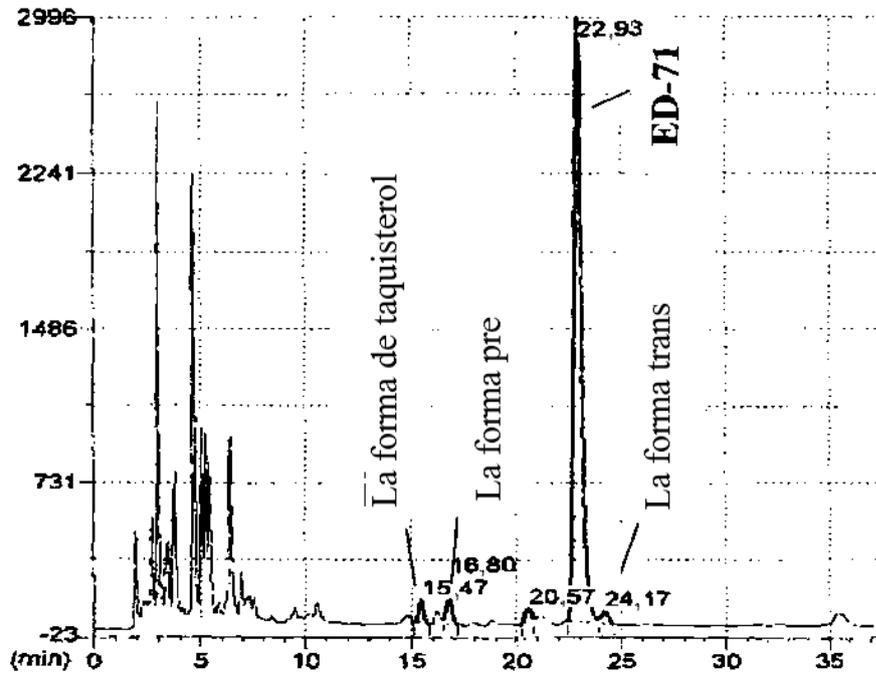


Figura 2

