

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 871**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2007 PCT/CH2007/000097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2007 WO07098625**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2007 E 07701897 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 1991864**

54 Título: **Procedimiento para evaluar propiedades de absorción de compuestos de baja solubilidad**

30 Prioridad:

**28.02.2006 US 777976 P**

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

**11.06.2018**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)  
GRENZACHERSTRASSE 124  
4070 BASEL, CH y  
PION INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**AVDEEF, ALEX y  
KANSY, MANFRED**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 671 871 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

Procedimiento para evaluar propiedades de absorción de compuestos de baja solubilidad

## 5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a un procedimiento para evaluar el efecto de excipientes, pH y combinaciones de estos en las propiedades de absorción predichas de compuestos de baja solubilidad.

## 10 TÉCNICA ANTERIOR

[0002] La absorción intestinal humana (HIA, por su sigla en inglés) de compuestos ionizables puede depender simultáneamente de tres propiedades clave: solubilidad, permeabilidad y  $pK_a$  (Avdeef A., «Absorption and Drug Development», Wiley Interscience, Nueva York, 2003). Esta asociación se ejemplifica mediante el Potencial de Absorción (Dressman JB et al., «J. Pharm. Sci.», 1985, 74, 588), el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (Guía para la industria, «Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System», FDA, Washington, D.C., EE.UU., agosto, 2000), y la función de Dosis Máxima Absorbible (Curatolo W. «Pharm. Sci. Tech. Today», 1998, 1, 387). En términos sencillos, las leyes de difusión de Fick subyacen todos estos modelos.

[0003] En el intestino, las bases débiles solubles en agua se absorben mejor desde regiones ligeramente alcalinas (p. ej., en el íleo distal), y los ácidos débiles se absorben mejor desde regiones ligeramente ácidas (p. ej., yeyuno proximal). Esto fue justificado por Brodie y colaboradores (Shore PA et al., «J. Pcol. Exp. Therap.», 1957, 119, 361), quienes presentaron la Hipótesis de Partición del pH para explicar la influencia del pH en la absorción intestinal de fármacos ionizables. Se perfundieron intestinos de rata *in situ* con una disolución de fármacos de pH variados. Al mismo tiempo, el fármaco se inyectó por vía intravenosa. La concentración del fármaco en el perfusado luminal se ajustó hasta que no hubo transporte neto a través de la pared intestinal, de modo que resultara imposible definir la relación de barrera sangre-lumen.

$$D = \frac{[\text{fármaco}]_{\text{SANGRE}}}{[\text{fármaco}]_{\text{LUMEN}}} \quad (1)$$

[0004] Si solo la forma neutra del fármaco penetra, entonces se puede predecir la ecuación (1) de la  $pK_a$  del fármaco y el gradiente de pH entre los dos lados de la barrera intestinal (Shore PA et al., «J. Pcol. Exp. Therap.» 1957, 119, 361):

$$D = \frac{(1+10^{-pK_a+pH_{\text{SANGRE}}})}{(1+10^{-pK_a+pH_{\text{LUMEN}}})} \quad (2)$$

[0005] La ecuación (2) se deriva de la dependencia del pH de la permeabilidad, según la ecuación de Henderson-Hasselbalch (HH) bien conocida. La medición directa de las velocidades de absorción de perfusión intestinal *in situ* confirmaron la dependencia del pH, confirmando además que la observación se condecía con la teoría en estos experimentos tempranos.

[0006] La Hipótesis de Partición del pH sugiere que la permeabilidad de la membrana será más elevada con el pH al cual la molécula está menos cargada. Pero este es también el pH al cual la molécula es menos soluble. En especial, es importante señalar que en el trabajo de Brodie, todos los compuestos analizados tienen solubilidad en agua relativamente elevada. En el sitio de absorción, tanto la cantidad de especies sin carga como la tendencia de las especies neutras a cruzar la barrera de la membrana fosfolipídica son indicadores importantes de absorción. El coeficiente de permeabilidad intrínseca,  $P_0$ , caracteriza el transporte por la membrana de las especies sin carga. La concentración de las especies sin carga,  $C_0$ , depende de la dosis, la solubilidad, la  $pK_a$  de una molécula, y el pH en el sitio de absorción, según la ecuación HH.

[0007] Los programas de química combinatoria han tendido a seleccionar moléculas de peso molecular más elevado, que tienen predeciblemente baja solubilidad. Las herramientas de «alerta temprana», tales como la Regla de cinco de Lipinski (Lipinski C., «Amer. Pharm. Rev. » 2002, 5, 82), y los programas informáticos que predicen la solubilidad de una estructura 2-D intentan descartar dichas moléculas pronto en programas de descubrimiento de fármacos. Aun así, muchas moléculas problemáticas en cuanto a solubilidad siguen sin ser reconocidas, debido a

que los procedimientos tempranos que se utilizan para medir la solubilidad son demasiado simples, y debido al efecto de enmascaramiento de los disolventes orgánicos (p. ej., dimetilsulfóxido) utilizados en mediciones de descubrimiento de fármacos. Podría decirse que las mediciones de solubilidad cinética basadas en nefelometría, aunque son rápidas, no son más fiables que los procedimientos de predicción por ordenador (Glomme A. et al. «J. Pharm. Sci.» 2005, 94, 1).

**[0008]** La medición de solubilidad de moléculas poco solubles, p. ej., compuestos o fármacos, constituye un reto por varias razones. En particular, la ecuación HH solo predice escasamente la dependencia del pH de moléculas poco solubles (Bergström CAS et al., «Eur. J. Pharm. Sci. », 2004, 22, 387 y patente de Estados Unidos US 6.569.686 B2), mayormente debido a la prevalencia de agregados y estructuras de tipo micela en disolución. Dichos agregados tienen solubilidad inusualmente elevada (en disoluciones de pH donde persisten las especies cargadas), con una dependencia sensible de la temperatura.

**[0009]** La medición de solubilidad también va acompañada de una incertidumbre considerable, puesto que los resultados dependen, en particular, de cómo se abordan el análisis del pH, la capa límite acuosa (ABL, por su sigla en inglés), y el balance de materia incompleto en dichos ensayos (tanto ensayo de permeabilidad de membrana artificial como celular) por parte de los distintos laboratorios (Avdeef et al., «Eur. J. Pharm. Sci.» 2005, 24, 333).

**[0010]** Por lo tanto, serían particularmente útiles procedimientos de permeabilidad y solubilidad más precisos (pero que sigan siendo rápidos) en la etapa de selección de candidatos en investigación y desarrollo farmacéuticos para reconocer moléculas verdaderamente problemáticas con una antelación mucho mayor (Bergström CAS et al., «Eur. J. Pharm. Sci.», 2004, 22, 387 y Glomme A. et al. «J. Pharm. Sci.» 2005, 94, 1).

**[0011]** Además de los efectos descritos de pH, solubilidad y permeabilidad en procesos de absorción, en particular en procesos de HIA, el uso de excipientes puede afectar los procesos de absorción de manera esencial, en particular los procesos de absorción de moléculas poco solubles. Teniendo en cuenta la complejidad de los efectos antes mencionados, la evaluación de excipientes adecuados que sean capaces de optimizar los procesos de absorción es una tarea muy difícil. En la actualidad, dicha evaluación se lleva a cabo realizando experimentos con animales. Por lo general, los experimentos con animales llevan comparativamente mucho tiempo, requieren esfuerzos comparativamente considerables y son controvertidos desde el punto de vista ético.

**[0012]** Por consiguiente, existe una necesidad de desarrollar un procedimiento éticamente aceptable que permita llevar a cabo una predicción de propiedades de absorción de moléculas poco solubles, es decir, compuestos o fármacos de baja solubilidad, rápida, que permita ahorrar compuesto, económica y razonablemente precisa, teniendo en cuenta el efecto de excipientes en dicha absorción.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

**[0013]** Según la invención esta necesidad se satisface con un procedimiento como se define en las características de la reivindicación independiente 1. Las realizaciones preferidas están sujetas a las reivindicaciones dependientes.

**[0014]** En particular, la invención trata sobre un procedimiento para evaluar el efecto de excipientes, pH y combinaciones de estos en las propiedades de absorción predichas de compuestos de baja solubilidad, que comprende la etapa de evaluar un cambio en una función de flujo para una combinación de un compuesto de baja solubilidad y un excipiente como se especifica en la reivindicación 1.

**[0015]** El término «baja solubilidad» como se utiliza a continuación se basa en las definiciones de solubilidad del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica adoptado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, por su sigla en inglés) como una norma reguladora de biodisponibilidad-bioequivalencia (Guía para la industria de la FDA, «waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms containing certain active moieties/active ingredients based on a biopharmaceutics classification system», CDERGUID\2062dft.wpd Borrador, enero, 1999). En particular, la escala de solubilidad se define en términos del volumen, p. ej., en mililitros (mL) de agua requerida para disolver la intensidad de la dosis más elevada con la solubilidad más baja en un intervalo de pH de 1 a 8, siendo 250 mL la línea divisoria entre alta y baja solubilidad. Por consiguiente, baja solubilidad se refiere a la disolución incompleta de la dosis más elevada en 250 mL en el intervalo de pH de 1 a 8.

**[0016]** «Función de flujo» como se usa a continuación se refiere al capítulo 2 de Avdeef A., «Absorption and Drug Development», Wiley Interscience, Nueva York, 2003 que define que la función de flujo corresponde a partículas o materia que pasan una barrera por unidad de superficie y unidad de tiempo.

**[0017]** Más exactamente, lo que sigue se describe en dicho capítulo 2: La primera ley de Fick aplicada a una

membrana muestra que la difusión pasiva de un soluto es el producto de la difusividad y el gradiente de concentración del soluto dentro de la membrana. El coeficiente de partición aparente membrana/agua relaciona el último gradiente interno con la diferencia de concentración de agua a granel externa entre las dos disoluciones separadas por la membrana. Para que una molécula ionizable penetre por difusión pasiva de manera más eficaz, la molécula necesita estar en su forma sin carga en la superficie de la membrana (Hipótesis de Partición del pH). La cantidad de la forma sin carga presente a determinado pH, que directamente contribuye al flujo, depende de distintos factores importantes, tales como pH, unión a vehículos nativos (proteínas y ácidos biliares), auto-unión (formación de micelas o agregados), y solubilidad (una forma de auto-unión de estado sólido). La baja solubilidad entra en la consideración del transporte como «atenuador de velocidad» termodinámico, como una condición que disminuye la oportunidad de transporte. De esta forma, la permeabilidad y la solubilidad son las partes cinética y termodinámica enlazadas de transporte a través de una membrana.

**[0018]** Consideremos un recipiente dividido en dos cámaras, separadas por una membrana lípida homogénea. El lado izquierdo es el compartimento donante, donde primero se introducen las moléculas de muestra; el lado derecho es el compartimento aceptor, que al principio no tiene moléculas de muestra. La primera ley de Fick aplicada a membranas homogéneas en estado estacionario constituye una ecuación de transporte.

$$J = D_m \frac{dC_m}{dx} = D_m [C_m^0 - C_m^h] / h \quad (3)$$

donde J es el flujo, en unidades de mol por  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ , donde  $C_m^0$  y  $C_m^h$  son las concentraciones, en unidades de mol por  $\text{cm}^3$ , de la forma sin carga del soluto dentro de la membrana en los dos límites agua-membrana, y donde  $D_m$  es la difusividad del soluto dentro de la membrana en unidades de  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ . En estado estacionario, el gradiente de concentración,  $dC_m/dx$ , dentro de la membrana, es lineal. El estado estacionario tarda alrededor de 3 minutos en establecerse en una membrana de un grosor de 125  $\mu\text{m}$ , asumiendo que la disolución se ha agitado muy bien.

**[0019]** La limitación de la ecuación (3) es que la medición de las concentraciones de soluto dentro de distintas partes de la membrana es muy poco conveniente. No obstante, debido a que es posible estimar o posiblemente medir los coeficientes de distribución entre el agua a granel y la membrana,  $\log K_d$  (el coeficiente de partición aparente dependiente del pH), la ecuación (3) se puede convertir a una forma más accesible.

$$J = D_m K_d (C_D - C_A) / h \quad (4)$$

donde la sustitución de  $K_d$  nos permite utilizar concentraciones de agua a granel en los compartimentos donante y aceptor,  $C_D$  and  $C_A$ , respectivamente. (Con moléculas ionizables,  $C_A$  and  $C_D$  se refieren a las concentraciones del soluto sumadas para todas las formas de estado de carga.) Estas concentraciones se pueden medir fácilmente mediante técnicas estándar. La ecuación (4) no llega a ser suficientemente conveniente, puesto que es preciso estimar  $D_m$  y  $K_d$ . Es común agrupar estos parámetros y el grosor de la membrana en un parámetro compuesto, denominado «permeabilidad de membrana»  $P_m$ ,

$$P_m = D_m K_d / h \quad (5)$$

**[0020]** La importancia de la ecuación (4), que predice cuán rápido las moléculas pasan a través de membranas simples, en cuanto a solubilidad es en términos de concentración. Consideremos condiciones de perfecta solubilidad del principio activo o «de sumidero», donde  $C_A$  es esencialmente cero. La ecuación (4) se reduce a la siguiente ecuación de flujo.

$$J = P_m C_D \quad (6)$$

**[0021]** El flujo depende del producto de la permeabilidad efectiva del soluto por la concentración del soluto sumado para todas las formas de estado de carga en el lado agua de la superficie donante de la membrana. Idealmente esta concentración puede equivaler a la dosis del fármaco, a menos que la dosis exceda el límite de solubilidad en el pH considerado, en cuyo caso equivale a la solubilidad. Puesto que la especie molecular sin carga es la sustancia penetrante, la ecuación (6) puede reformularse como

$$J = P_o C_o \leq P_o S_o \quad (7)$$

donde  $P_o$  y  $C_o$  son la permeabilidad intrínseca y la concentración de la especie sin carga, respectivamente. La permeabilidad intrínseca no depende del pH, pero su cofactor en la ecuación de flujo,  $C_o$ , sí. La concentración de la

especie sin carga es siempre igual a o inferior a la solubilidad intrínseca de la especie,  $S_0$ , que tampoco depende del pH.

[0022] Obsérvese que para la especie sin carga, la ecuación (5) adopta la forma

$$P_o = D_m K_p / h \quad (8)$$

donde  $K_p = C_m(0) / C_{D0}$ ; también,  $K_p = C_m(h) / C_{A0}$ ;  $C_{D0}$  y  $C_{A0}$  son las concentraciones de disolución acuosa de las especies sin carga en los lados donante y aceptor, respectivamente.

[0023] En disoluciones saturadas (es decir, con presencia de sólido en exceso) a determinado pH, la gráfica de  $\log C_o$  vs. pH para una molécula ionizable tiene una forma extraordinariamente simple: es una combinación de segmentos rectos, unidos en puntos de discontinuidad que indican el límite entre el estado saturado y el estado de disolución completa. El pH de estos puntos de unión depende de la dosis utilizada en el cálculo, y el valor máximo de  $\log C_o$  es siempre igual a  $\log S_0$  en una disolución saturada.

[0024] El procedimiento según la invención permite llevar a cabo una evaluación rápida, precisa y económica de la capacidad de un excipiente para optimizar la absorción de moléculas, es decir, compuestos o fármacos de baja solubilidad. Asimismo, se pueden excluir los experimentos con animales y se puede reducir el uso de compuestos en dicha evaluación. Por lo tanto, se justifica el cribado para determinar la eficacia de formulaciones futuras (efectos de pH y excipiente en solubilidad y permeabilidad) de candidatos a fármacos, puesto que el procedimiento es rápido, permite ahorrar compuesto, económico y razonablemente preciso.

[0025] De acuerdo con el procedimiento según la invención, evaluar el cambio de la función de flujo comprende las etapas de: preparar una disolución donante de calibración a un valor de pH predefinido que comprende el compuesto; preparar una disolución donante al valor de pH predefinido que comprende el compuesto y el excipiente; preparar una disolución receptora al valor de pH predefinido libre de compuesto y excipiente; proporcionar la disolución donante de calibración en una primera cámara donante separada de una primera cámara receptora mediante una barrera, proporcionar la disolución donante en una segunda cámara donante separada de una segunda cámara receptora mediante la barrera y proporcionar la disolución receptora en la primera y la segunda cámara receptora; incubar dichas disoluciones durante un periodo de tiempo predefinido; y medir la respuesta del compuesto en la disolución receptora de la primera y la segunda cámara receptora. El término «respuesta» como se utiliza a continuación comprende dimensiones apropiadas para evaluar el cambio de la función de flujo, en particular la concentración. Dicho procedimiento permite llevar a cabo una evaluación eficaz del efecto del excipiente en las propiedades de absorción del compuesto. Asimismo, permite efectuar un procesamiento altamente automatizado, en particular cuando se realiza en dispositivos apropiados tales como, por ejemplo, en un dispositivo como el que se describe en la patente de Estados Unidos US 7.022.528 B2.

[0026] De acuerdo con el procedimiento según la invención, evaluar el cambio de la función de flujo además comprende llevar a cabo de manera reiterada las etapas descritas anteriormente con una pluralidad de valores de pH predefinidos. Repetir en dicho contexto no se limita a procesar cronológicamente las etapas a un valor de pH después de otro sino que, en particular, también incluye procesar las etapas en paralelo a una pluralidad de valores de pH al mismo tiempo. Dicha evaluación permite expandir el efecto en las propiedades de absorción del compuesto a efectos relacionados con el pH y combinar el efecto del excipiente con los efectos relacionados con el pH. Por ende, todos dichos efectos pueden tenerse en consideración para la evaluación de un excipiente, de modo que la calidad de la evaluación se pueda mejorar sin afectar sustancialmente la eficacia de la evaluación. Puede resultar ventajoso elegir la pluralidad de valores de pH del intervalo de alrededor de pH 5 a alrededor de pH 7,5, en particular la pluralidad de los valores de pH puede comprender, por ejemplo, los valores pH 5, pH 6,2 y pH 7,5.

[0027] De acuerdo con el procedimiento según la invención, evaluar el cambio de la función de flujo además comprende la etapa de determinar una relación entre la medición de la respuesta, p. ej. la concentración, del compuesto en la disolución receptora de la primera cámara receptora y la correspondiente medición de la respuesta, p. ej. la concentración, del compuesto en la disolución receptora de la segunda cámara receptora. Dicha relación permite efectuar una representación conveniente de la función de flujo de modo que una pluralidad de relaciones basada en una pluralidad de compuestos, una pluralidad de excipientes y una pluralidad de valores de pH se puedan mostrar y resumir de manera conveniente.

[0028] De acuerdo con el procedimiento según la invención, medir la respuesta, p. ej. la concentración, del compuesto en la disolución receptora de la primera y la segunda cámara receptora comprende la medición de propiedades espectroscópicas de la disolución receptora. Dichas mediciones de propiedades espectroscópicas se pueden llevar a cabo mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo,

cromatografía líquida-espectrometría de masas, espectrometría de absorción ultravioleta/visible, espectroscopía infrarroja, espectroscopía de emisión, espectroscopía Raman, o similares. El uso de dispositivos apropiados en dichos procedimientos permite medir la respuesta de manera rápida y eficaz, es decir, en particular la concentración, del compuesto en la disolución receptora.

**[0029]** De acuerdo con el procedimiento según la invención, la barrera se selecciona del grupo constituido por tejidos humanos, tejidos animales, tejidos vegetales, modelos de cultivos celulares y membranas artificiales. En este contexto, barrera se refiere, en particular, a barreras de difusión activa o pasiva que imitan propiedades físicas y químicas de barreras biológicas. En consecuencia, se prefieren más las barreras lipofílicas.

**[0030]** Preferentemente, evaluar el cambio de la función de flujo se lleva a cabo para una pluralidad de compuestos de baja solubilidad y una pluralidad de excipientes mediante las siguientes acciones:

preparar una pluralidad de disoluciones donantes al valor de pH predefinido que comprende cada combinación de cada uno de la pluralidad de compuestos y cada uno de la pluralidad de excipientes; proporcionar la pluralidad de disoluciones donantes en una pluralidad de segundas cámaras donantes separadas de una pluralidad de segundas cámaras receptoras mediante la barrera y proporcionar la disolución receptora en la pluralidad de segundas cámaras receptoras; y

medir la respuesta, p. ej. la concentración, del compuesto en la disolución receptora de la pluralidad de segundas cámaras receptoras. Dicho procesamiento en paralelo permite efectuar una evaluación eficaz y rápida de la función de flujo para una pluralidad de compuestos, una pluralidad de excipientes y una pluralidad de valores de pH. Dicho procesamiento en paralelo puede, por ejemplo, llevarse a cabo utilizando el procedimiento y el dispositivo descritos en la patente de Estados Unidos US 7.022.528 B2.

**[0031]** En una segunda realización preferida del procedimiento según la invención (no reivindicada), evaluar el cambio de la función de flujo comprende las etapas de: preparar una disolución donante de calibración a un valor de pH predefinido que comprende el compuesto; preparar una disolución donante al valor de pH predefinido que comprende el compuesto y el excipiente; medir la solubilidad del compuesto en la disolución donante de calibración y en la disolución donante; medir la permeabilidad de la disolución donante de calibración y de la disolución donante; y combinar los resultados de medición de permeabilidad y los resultados de medición de solubilidad en la función de flujo. Dicho procedimiento permite llevar a cabo una evaluación eficaz del efecto del excipiente en las propiedades de absorción del compuesto. En particular, combina cambios tanto en permeabilidad como en solubilidad para monitorizar el efecto de excipientes en el potencial de absorción de compuestos sin determinar explícitamente la permeabilidad y solubilidad como entidades separadas, lo cual hace que la segunda realización del procedimiento según la invención sea particularmente rápida. Puede comprender monitorizar el cambio en respuesta, p. ej. en concentración, de los compuestos que aparecen en una cámara receptora de un sistema de permeación de dos cámaras, estando las dos cámaras divididas por una barrera lipofílica, a la vez que se varían los componentes de excipientes (tipo y/o concentración) en una cámara donante. La barrera puede constituir una membrana artificial (p. ej., un filtro impregnado con una disolución lipofílica, es decir, el modelo del ensayo de permeabilidad de membranas artificiales en paralelo (PAMPA, por su sigla en inglés), células endoteliales cultivadas (p. ej., RBE4), u otros modelos de cultivos celulares (p. ej., Caco-2, MDCK, etc.). La consideración del grosor de la capa límite acuosa relevante desde el punto de vista biológico y el pH también se puede tener en cuenta. Esta segunda realización del procedimiento según la invención da pie a una técnica de cribado en pre-formulación de alto rendimiento, que permite llevar a cabo una evaluación temprana, rápida y económica de la influencia de excipientes en las propiedades de absorción y farmacocinéticas de compuestos en investigación.

**[0032]** Preferiblemente, evaluar el cambio de la función de flujo comprende llevar a cabo de manera reiterada las etapas descritas anteriormente con una pluralidad de valores de pH predefinidos. Con respecto a la expresión «reiterar» lo antedicho también se aplica a continuación. Dicha evaluación permite expandir el efecto en las propiedades de absorción del compuesto a efectos relacionados con el pH y combinar el efecto del excipiente con los efectos relacionados con el pH. Por ende, todos los efectos mencionados pueden tenerse en consideración para la evaluación de un excipiente, de modo que la calidad de la evaluación se pueda mejorar sin afectar sustancialmente la eficacia de la evaluación. Puede resultar ventajoso elegir la pluralidad de valores de pH del intervalo de alrededor de pH 5 a alrededor de pH 7,5, en particular la pluralidad de los valores de pH puede comprender, por ejemplo, los valores pH 5, pH 6,2 y pH 7,5.

**[0033]** Por consiguiente, medir la solubilidad del compuesto en la disolución donante de calibración y en la disolución donante preferiblemente comprende las etapas de: incubar dichas disoluciones durante un periodo de tiempo predefinido; filtrar dichas disoluciones; y medir la cantidad de compuesto en las disoluciones filtradas. Dicha medición se puede realizar de manera eficaz, rápida y precisa llevando a cabo diversos procesos conocidos en la técnica, en los que puede resultar particularmente ventajoso utilizar el procedimiento y el dispositivo descritos en la patente de Estados Unidos US 7.022.528 B2.

5 **[0034]** Preferiblemente, la medición de la permeabilidad de la disolución donante de calibración y de la disolución donante comprende las etapas de: preparar una disolución receptora a un valor de pH predefinido libre de compuesto y excipiente; proporcionar la disolución donante de calibración en una primera cámara donante separada de una primera cámara receptora mediante un filtro de membrana, proporcionar la disolución donante en una segunda cámara donante separada de una segunda cámara receptora mediante el filtro de membrana y proporcionar la disolución receptora en la primera y la segunda cámaras receptoras; incubar dichas disoluciones durante un periodo de tiempo predefinido; y medir la cantidad de compuesto en las disoluciones donantes de la primera y la segunda cámara receptora y en la disolución receptora de la primera y la segunda cámara receptora. De nuevo, dicha medición se puede realizar de manera eficaz, rápida y precisa llevando a cabo diversos procesos conocidos en la técnica, en los que puede resultar particularmente ventajoso utilizar el procedimiento y el dispositivo descritos en la patente de Estados Unidos US 7.022.528 B2.

15 **[0035]** Preferiblemente, evaluar el cambio de la función de flujo además comprende la etapa de determinar una relación entre la medición de la cantidad de compuesto en la disolución receptora de la primera cámara receptora y la medición de la cantidad de compuesto en la disolución receptora de la segunda cámara receptora. Dicha relación permite efectuar una representación simple de la función de flujo de modo que una pluralidad de relaciones basadas en una pluralidad de compuestos, una pluralidad de excipientes y una pluralidad de valores de pH se puedan mostrar y resumir de manera conveniente.

20 **[0036]** Preferiblemente, evaluar el cambio de la función de flujo se lleva a cabo para una pluralidad de compuestos y una pluralidad de excipientes mediante las siguientes acciones: preparar una pluralidad de disoluciones donantes al valor de pH predefinido de cada combinación de cada uno de la pluralidad de compuestos y cada uno de la pluralidad de excipientes; medir la solubilidad del compuesto en cada una de las disoluciones donantes; y medir la permeabilidad de cada una de las disoluciones donantes. Dicho procesamiento en paralelo permite efectuar una evaluación eficaz y rápida de la función de flujo para una pluralidad de compuestos, una pluralidad de excipientes y una pluralidad de valores de pH. Dicho procesamiento en paralelo puede, por ejemplo, llevarse a cabo utilizando el procedimiento y el dispositivo descritos en la patente de Estados Unidos US 7.022.528 B2.

25 **[0037]** En todas las realizaciones preferidas del procedimiento según la invención descrita más arriba la disolución receptora preferiblemente comprende al menos un aditivo. Dicho aditivo puede llevar a cabo la evaluación del cambio de la función de flujo en condiciones adecuadas. Por ejemplo, las condiciones se pueden adaptar para representar más detenidamente entornos intestinales *in vivo* mediante aditivos. Asimismo, las condiciones se pueden adaptar, por ejemplo, para permitir un procesamiento mejorado o más sencillo.

30 **[0038]** Preferiblemente, el aditivo tiene al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo de alta capacidad de unión para el compuesto, baja absorción de luz ultravioleta, alta solubilidad en agua y baja presión de vapor.

35 **[0039]** Preferiblemente, el procedimiento según la invención comprende la etapa de agitar la disolución donante de calibración y la disolución donante. Mediante dicha agitación se pueden optimizar las condiciones para evaluar el cambio de la función de flujo. Por ejemplo, se puede evitar que las microcondiciones cercanas a la barrera que no representan el entorno buscado se proporcionen durante la evaluación del cambio de la función de flujo. Esto resulta particularmente interesante si se ha de representar un entorno intestinal en el cual ambos lados de la barrera natural subyacen determinado flujo *in vivo*. Por consiguiente, dicha agitación puede ayudar a simular la función de la sangre como sumidero y, en consecuencia, se puede mantener el gradiente de difusión alrededor de la barrera.

40 **[0040]** En una realización preferida el procedimiento comprende las etapas de: ordenar las relaciones por excipiente, compuesto y valor de pH, y visualizar las relaciones ordenadas. Dicho orden y visualización permite resumir de manera eficaz y calificar de manera eficaz una pluralidad de compuestos combinados con una pluralidad de excipientes a una pluralidad de valores de pH.

45 **[0041]** Preferiblemente, el orden de las relaciones comprende las etapas de:  
 50 calcular sumas de relaciones para cada excipiente para todos los compuestos y todos los valores de pH; y ordenar las sumas de relaciones. Realizar dichas sumas para todos los excipientes y ordenar dichas sumas puede permitir obtener un resumen incluso más eficaz y una calificación incluso más eficaz de una pluralidad de compuestos combinados con una pluralidad de excipientes a una pluralidad de valores de pH.

55 **[0042]** Preferiblemente, el procedimiento además comprende las etapas de: calcular sumas de relaciones adicionales para cada compuesto para todos los excipientes y todos los valores de pH; y ordenar las sumas de relaciones adicionales. Realizar dichas sumas adicionales para todos los compuestos y ordenar dichas sumas puede permitir obtener un resumen incluso más eficaz y una calificación incluso más eficaz de una pluralidad de compuestos

combinados con una pluralidad de excipientes a una pluralidad de valores de pH.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 **[0043]** El procedimiento según la invención se describe con mayor detalle a continuación mediante realizaciones ejemplares y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que
- La Figura 1 muestra comparaciones de procedimientos de determinación de  $pK_a$  para un ejemplo de mediciones de permeabilidad de una primera realización del procedimiento según la invención;
- 10 la Figura 2 muestra una extrapolación lineal de  $pK_a$  aparente determinada en diversas mezclas de metanol-agua del procedimiento de la Figura 1;
- la Figura 3 muestra gráficas de permeabilidad logarítmica vs. pH de los ocho compuestos medidos en el ejemplo de mediciones de permeabilidad del procedimiento de la Figura 1;
- 15 la Figura 4 muestra gráficas de las diferencias entre permeabilidad intrínseca logarítmica en presencia de excipientes y permeabilidad intrínseca logarítmica en ausencia de excipientes, como una función de la cantidad de excipientes del ejemplo de mediciones de permeabilidad del procedimiento de la Figura 1;
- 20 la Figura 5 muestra un esquema de cartografía de ensayo PAMPA basado en permeabilidad intrínseca logarítmica para el ejemplo de mediciones de permeabilidad del procedimiento de la Figura 1;
- la Figura 6 muestra un esquema de cartografía de ensayo PAMPA basado en retención de membrana logarítmica para el ejemplo de mediciones de permeabilidad del procedimiento de la Figura 1;
- 25 la Figura 7 muestra un esquema de cartografía de ensayo PAMPA basado en capa límite acuosa logarítmica para el ejemplo de mediciones de permeabilidad del procedimiento de la Figura 1;
- 30 la Figura 8 muestra seis casos de reacciones de agregación para un ejemplo de mediciones de solubilidad del procedimiento de la Figura 1;
- la Figura 9 muestra  $\log S$  libre de excipiente vs. perfiles de pH para los compuestos considerados en el ejemplo de mediciones de solubilidad del procedimiento de la Figura 1;
- 35 la Figura 10 muestra un Mapa de Gradientes de Clasificación de Solubilidad - Excipientes ordenado para las combinaciones de compuestos y excipientes del ejemplo de mediciones de solubilidad del procedimiento de la Figura 1;
- 40 la Figura 11 muestra gráficas de  $\log P_o$ ,  $\log C_o$ , y  $\log P_o C_o$  (flujo) vs. pH para ácido mefenámico, a la dosis clínica de 250 mg, ilustrando la ley de Fick basada en concentraciones intrínsecas en el procedimiento de la Figura 1;
- la Figura 12 muestra: (A) Mapa de Gradientes de Clasificación PAMPA-Excipiente-pH del procedimiento de la Figura 1; (b) Mapa de Gradientes de Clasificación Solubilidad-Excipiente-pH en el procedimiento de la Figura 1; y (c) Mapa de Gradientes de Clasificación Biofarmacéutica Ordenado para las combinaciones de compuestos y excipientes del procedimiento de la Figura 1;
- 45 la Figura 13 muestra gráficas de permeabilidad (círculos), solubilidad (triángulos) y flujo (cuadrados) a pH 5,0, 6,2, y 7,4, libre de excipiente (símbolos huecos) y en presencia de HP- $\beta$ -CD al 1 % p/v (símbolos rellenos) para el procedimiento de la Figura 1;
- 50 la Figura 14 muestra curvas de permeabilidad (curva punteada), solubilidad (curva discontinua), y flujo (línea continua) efectivos simulados de ácido mefenámico vs. pH; y
- 55 la Figura 15 muestra un diagrama esquemático para la configuración experimental de una segunda realización del procedimiento según la invención.

#### Modo(s) de realización de la invención

- 60 **[0044]** Una primera realización del procedimiento según la invención comprende combinar resultados de medición de permeabilidad y resultados de medición de solubilidad en una función de flujo para la evaluación del efecto de excipientes, pH y combinaciones de estos en las propiedades de absorción predichas de compuestos de baja



solubilidad.

**[0045]** La medición de permeabilidad apropiada se puede realizar de diversas maneras. En descubrimiento de fármacos, a menudo se utilizan modelos de cultivo celulares monocapa, tales como Caco-2 o riñón canino Madin-Darby (Ho N.F.H. et al., «Quantitative approaches to delineate passive transport mechanisms in cell culture monolayers», 2000 en: Amidon G.L. et al., «Transport Processes in Pharmaceutical Systems», Marcel Dekker, Nueva York, pág. 219-316 y Avdeef A. et al., «Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKa flux method», Eur. J. Pharm. Sci., 2005, 24, 333-349A). En la industria farmacéutica, para cuando las moléculas candidatas seleccionadas se pasan a la fase de desarrollo, por lo general, dichos estudios celulares no se utilizan para seleccionar excipientes. Es común que en esa etapa se utilicen modelos animales farmacocinéticos. En el caso de moléculas poco solubles, pero de otro modo prometedoras, el cribado de excipientes temprano, posiblemente como una primera etapa en desarrollo preclínico temprano, es beneficioso para priorizar y tal vez minimizar la cantidad de mediciones animales, si existe un medio económico para medir el efecto de excipientes en la permeabilidad. Liu et al. (Liu, H. et al., «In vitro permeability of poorly aqueous soluble compounds using different solubilizers in the PAMPA assay with liquid chromatography/mass spectrometry detection», Pharm. Res., 2003, 20, 1820-1826) fueron los primeros en proponer hacer solo eso, utilizar el modelo de ensayo de permeabilidad de membranas artificiales en paralelo de bajo coste (PAMPA) específicamente para cribar los agentes solubilizantes Brij® 35, Cremophor EL, etanol, y Tween 80. Hasta ese momento, el ensayo PAMPA había sido un indicador útil, pero solo en cribado de descubrimiento temprano. A partir de ese momento, el valor de ensayo PAMPA como una herramienta mecánica útil para químicos medicinales ha sido demostrado en varios casos, pero además del trabajo mencionado de Liu et al., el impacto del ensayo PAMPA en desarrollo preclínico temprano no ha sido documentado.

**[0046]** En la medición de permeabilidad descrita a continuación como ejemplo de la primera realización del procedimiento según la invención, se propone extender el tema explorado por Liu et al. Se indican las mediciones del ensayo PAMPA de doble sumidero (Double-Sink PAMPA) de los siguientes ocho fármacos poco solubles: astemizol, butacaína, clotrimazol, dipiridamol, griseofulvina, progesterona, glibenclamida, y ácido mefenámico, medidos en quince combinaciones de seis excipientes y reguladores de fuerza iónica: taurocolato de sodio, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, cloruro de potasio, propilenglicol, 1-metil-2-pirrolidona, y polietilenglicol 400, para evaluar el efecto de excipientes en la permeabilidad.

**[0047]** El ejemplo de medición de permeabilidad se realiza utilizando el ensayo PAMPA de doble sumidero y un lípido apropiado para ensayo PAMPA de doble sumidero de la compañía pION (PN 1100669) como se indica a continuación: Los compuestos utilizados en este ejemplo de medición de permeabilidad son los compuestos incluidos en la Tabla 1. El lípido para ensayo PAMPA de doble sumidero se almacena a -20°C cuando no se utiliza. El pH de las disoluciones donantes analizadas se ajusta con tampones universales de la compañía pION (PN 100621, 1100151), y la disolución tampón a pH 7,4 que contiene un tampón eliminador de sustancias químicas de la compañía pION ASB-7,4 (PN 110139) para simular proteínas séricas se utiliza como disolución receptora. Los excipientes se añaden solamente a los pocillos donantes.

**Tabla 1**

COMPUESTO	pK <sub>a</sub> 25° C, KCl 0,15 M	p% CH <sub>3</sub> OH	pendiente	GOF	n
Astemizol	5,99 ± 0,06	40-61	-0,012	2,2	6
	8,60 ± 0,04	40-61	-0,013	1,6	6
Butacaína	2,20 ± 0,11	16-57	-0,008	1,4	6
	10,09 ± 0,10	16-57	-0,021	5,4	6
Clotrimazol	6,02 ± 0,05	11-49	-0,020	3,6	6
Dipiridamol	6,22 ± 0,15	5-43	-0,016	3,3	6
glibenclamida	5,75 ± 0,15	35-75	0,008	3,0	7
ácido mefenámico	4,39 ± 0,09	44-74	0,018	1,7	8

**[0048]** Con respecto a los excipientes y sus concentraciones, se seleccionan cantidades de seis excipientes para superponer las concentraciones esperadas en un fluido intestinal en condiciones clínicamente relevantes. Para KCl, se seleccionan dos niveles: 0,1 concentración molar (M) y 0,2 M, según su concentración en medios FASSIF/FESSIF (Dressman J.B., «Dissolution testing of immediate-release products and its application to forecasting in vivo performance», in Dressman J.B. et al., «Oral Drug Absorption», Marcel Dekker Inc., Nueva York, 2000, pág. 155-181). Las disoluciones de taurocolato de sodio (NaTC) se preparan a concentraciones milimolares de 3 mM y 15 mM,

correspondientes a estados del tracto gastrointestinal (TGI) de ayuno y de alimentación como se describe en Dressman J.B. Para los excipientes líquidos, se asume que el volumen de cápsula máximo es 0,6 mililitros (mL) para un volumen de TGI de 250 mL, la concentración de excipiente calculado es 0,24 % v/v. Por lo tanto, para 1-metil-2-pirrolidona (NMP), propilenglicol (PG) y polietilenglicol 400 (PEG400), se evalúan disoluciones de excipiente de 0,24 % , 1 % , 5 % v/v.

Las disoluciones de 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) se evalúan en una concentración similar de 0,24 % y 1 % p/v. En total, contando las disoluciones tampón libres de excipiente, se evalúan 15 disoluciones distintas con las moléculas de los ocho fármacos para el efecto en el ensayo PAMPA, lo cual da como resultado 120 combinaciones fármaco-excipiente.

**[0049]** Con respecto a la medición de  $pK_a$ , los instrumentos potenciómetro Gemini de la compañía *pION*, GL $pK_a$  de la compañía Sirius Analytical Instruments UK (Sirius), D-PAS UV-métrico de Sirius, y SGA de Sirius se utilizan para determinar las constantes de ionización de precisión. Con los compuestos poco solubles mencionados, se prueban varias estrategias para superar las dificultades experimentales, incluyendo el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) y metanol como codisolventes. En el instrumento Gemini, es posible determinar la  $pK_a$  incluso si hay precipitación durante una porción de la titulación, ya sea en disoluciones acuosas o de codisolvente. Esto sucede porque el instrumento puede determinar constantes de solubilidad e ionización simultáneamente en la misma titulación. Asimismo, la calibración del electrodo de pH se puede llevar a cabo *in situ* mediante el instrumento Gemini, conjuntamente con la determinación de  $pK_a$ . Este es un rasgo especialmente importante para determinaciones en disoluciones codisolventes cuando la  $pK_a$  está fuera del intervalo de 4 a 9. Esto puede constituir una mejora importante en comparación con el procedimiento tradicional de primero llevar a cabo una titulación «en blanco» para determinar los cuatro parámetros del electrodo de pH Avdeef-Bucher (Avdeef, A. et al., «Accurate measurements of the concentration of hydrogen ions with a glass electrode: calibrations using the Prideaux and other universal buffer solutions and a computer-controlled automatic titrator», *Anal. Chem.*, 1978, 50, 2137-2142).

**[0050]** En el ejemplo de medición de permeabilidad descrito en la presente se aplica el procedimiento del ensayo de permeabilidad de membranas artificiales (PAMPA). Con este propósito, se utiliza el instrumento PAMPA Evolution de la compañía *pION*, Inc. (Woburn, MA, EE.UU.), con datos recogidos a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ). El «sándwich» PAMPA de 96 pocillos se precarga con 96 agitadores magnéticos de la compañía *pION* (PN 110212). Las concentraciones de muestra típicas son de alrededor de 50  $\mu\text{M}$  en las disoluciones tampón que contienen excipiente. El DMSO residual en estas disoluciones es 0,5 % v/v. La permeabilidad efectiva,  $P_e$ , de cada compuesto se mide en el intervalo de pH3 a pH10. Las disoluciones donantes tienen pH variados (tampón universal tratado con NaOH), mientras que las disoluciones receptoras tienen el mismo pH 7,4. Se seleccionan condiciones pH-gradiente optimizadas utilizando el procedimiento pOD (Ruell J.A. et al., «PAMPA - a drug absorption in vitro model», 5, «Unstirred water layer in iso- pH mapping assays and pK<sub>a</sub>flux - optimized design (pOD-PAMPA)», *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2003, 20, 393-402), para asegurar que los valores de pH están por encima y por debajo del valor  $pK_a^{\text{flux}}$  (definido más abajo) de los compuestos. La variación de pH es necesaria para corregir los valores de permeabilidad efectiva para efectos de capa límite (ABL) de absorción e ionización (Avdeef A., «Absorption and Drug Development», Wiley-Interscience, 2003, pp. 116-246; Avdeef A. et al., «S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pK<sub>a</sub>flux method», *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2005, 24, 333-349; y Avdeef A. et al., «PAMPA - a drug absorption in vitro model», 11, «Matching the in vivo aqueous boundary layer by individual-well stirring in microtitre plates», *Eur J. Pharm. Chem.*, 2004, 22, 365-374). Las disoluciones receptoras contienen una mezcla de tensioactivos («sumidero lipofílico») para imitar algunas de las funciones de las proteínas de unión a fármacos (Avdeef A. et al., «High-throughput measurements of permeability profiles» en: van de Waterbeemd H. et al., «Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability», Wiley - VCH: Weinheim, 2002, pág. 46-71). En el ensayo se emplea agitación enérgica, configurando la velocidad de agitación para que produzca un grosor de capa límite acuosa (ABL) de alrededor de 40  $\mu\text{m}$ , para hacer coincidir la contribución de ABL de la permeabilidad medida con la esperada en el TGI (Avdeef A. et al., «PAMPA - a drug absorption in vitro model», 11, «Matching the in vivo aqueous boundary layer by individual-well stirring in microtitre plates», *Eur J. Pharm. Chem.*, 2004, 22, 365-374). Se forma el sándwich PAMPA y se deja incubar durante 30 minutos para las moléculas altamente permeables, en una cámara de ambiente controlado, por ejemplo, Gut-Box™ de la compañía *pION* (PN 110205) con un mecanismo de agitación magnética incorporado. A continuación, se separa el sándwich, y tanto los pocillos donantes como receptores se analizan para obtener la cantidad de material presente, comparando con el espectro UV (230 nm a 500 nm) obtenido de las disoluciones estándar de referencia. El balance de materia se utiliza para determinar la cantidad de material restante en el filtro de membrana (%R) y adherido a las paredes plásticas de la placa de microvaloración (Avdeef A., «Absorption and Drug Development», Wiley-Interscience, 2003, pág. 116-246).

**[0051]** La permeabilidad efectiva ( $P_e$ ) se calcula como se describió anteriormente, a menos que la superficie de filtro útil, 0,3  $\text{cm}^2$ , se multiplique por la porosidad aparente, 0,76. Esta última etapa asegura que el grosor de la ABL determinado por los ensayos PAMPA utilizando filtros con una porosidad distinta estará en una escala absoluta (Nielsen P.E. et al., «PAMPA - a drug absorption in vitro model», 8, «Apparent filter porosity and the aqueous boundary layer», *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2004, 22, 33-41).

**[0052]** En el entorno epitelial del TGI, se espera que el grosor de la ABL sea 30 - 100  $\mu\text{m}$ , mientras que en un ensayo PAMPA sin agitación, el grosor de la ABL puede llegar a 4.000  $\mu\text{m}$  (Avdeef A. et al., «S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux method», Eur. J. Pharm. Sci., 2005, 24, 333-349; Avdeef A. et al., «PAMPA - a drug absorption in vitro model», 11, «Matching the in vivo aqueous boundary layer by individual-well stirring in microtitre plates», Eur J. Pharm. Chem., 2004, 22, 365-374). Tomando los datos PAMPA (con o sin agitación) en un intervalo de pH, es posible hacer coincidir el efecto de la ABL con el esperado para el TGI, aplicando el procedimiento  $pK_a^{\text{flux}}$  (Avdeef A., «Absorption and Drug Development», Wiley-Interscience, 2003, pág. 116-246; y Avdeef A. et al., «S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux method», Eur. J. Pharm. Sci., 2005, 24, 333 -349), descrito brevemente a continuación.

**[0053]** El coeficiente de permeabilidad efectiva,  $P_e$ , está relacionado con los coeficientes de permeabilidad de ABL y membrana,  $P_m$  y  $P_{ABL}$ , respectivamente, como se indica a continuación:

$$1/P_e = 1/P_{ABL} + 1/P_m \quad (9)$$

**[0054]** Para moléculas ionizables, la permeabilidad de membrana,  $P_m$ , depende del pH de la disolución acuosa a granel. La  $P_m$  máxima posible se designa como  $P_o$ , la permeabilidad intrínseca de la especie sin carga. Para ácidos y bases débiles monopróticos, la relación entre  $P_m$  y  $P_o$  se puede indicar en términos de la fracción de la especie sin carga,  $f_o$ , como

$$\begin{aligned} P_m &= P_o f_o \\ &= P_o / (10^{\pm (pH - pK_a)} + 1) \end{aligned} \quad (10)$$

con '+' utilizado para ácidos y '-' para bases. Otros casos se describen en otros documentos. Combinar las ecuaciones (9) y (10) da como resultado

$$\frac{1}{P_e} = \frac{1}{P_{ABL}} + \frac{10^{\pm (pH - pK_a)} + 1}{P_o} \quad (11)$$

**[0055]** A menudo se observa transporte limitado por la ABL para moléculas altamente permeables, cuando  $P_o \geq P_{ABL}$ . Por lo general esto se observa con fármacos lipofílicos, donde se mide la misma  $P_e$  (alrededor de  $30 \times 10^{-6}$  cm/s), independientemente de las moléculas, indicando una propiedad del agua más que de la membrana. La ecuación (11) se reduce a la forma logarítmica (Avdeef A. et al., «S. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux method», Eur. J. Pharm. Sci., 2005, 24, 333-349)

$$\log P_e = \log P_e^{\text{max}} - \log (10^{\pm (pH - pK_a^{\text{flux}})} + 1) \quad (12)$$

**[0056]** La permeabilidad efectiva (medida) máxima posible,  $P_e^{\text{max}}$ , se define como

$$\log P_e^{\text{max}} = \log P_{ABL} - \log (1 + P_{ABL} / P_o) \quad (13)$$

**[0057]** Cuando  $P_o \gg P_{ABL}$  (moléculas altamente permeables),  $P_e^{\text{max}} \approx P_{ABL}$ , lo que indica difusión en agua más que en membrana. La constante de ionización de «flujo» (en inglés «flux»),  $pK_a^{\text{flux}}$ , se refiere al valor de pH donde la resistencia al transporte a través de una barrera de permeación es 50 % debido a la ABL y 50 % debido a la membrana.

**[0058]** Con respecto a los resultados de la medición de permeabilidad ejemplar descritos en la presente y a su interpretación, la Figura 1 muestra una comparación de las constantes de ionización determinadas por los diversos enfoques del «estado de la técnica» utilizados. Puesto que todos los compuestos son solo poco solubles en agua, se utilizan codisolventes, y los valores acuosos se extrapolan mediante el enfoque de Yasuda-Shedlovsky (Avdeef A. et al., «pH-metric logP», 3, «Glass electrode calibración in methanol-water, applied to  $pK_a$  determination of water-insoluble substance», Anal. Chem., 1993, 65, 42-49) en el caso de instrumentos GLpKa y D-PAS, y mediante extrapolación lineal a cero % en peso de codisolvente en el caso del instrumento Gemini. En la actualidad, el instrumento SGA configurado comercialmente no tiene capacidad codisolvente, por lo que solo se utilizan tampones universales acuosos. Puesto que los instrumentos D-PAS y SGA están basados en luz UV, es posible utilizar disoluciones de menor concentración en la determinación de  $pK_a$ , evitando algunos, pero no todos los problemas de

- la baja solubilidad acuosa. Dos de los codisolventes más utilizados normalmente se emplean en esta medición de permeabilidad ejemplar: DMSO y metanol. En casi todos los casos, los valores de  $pK_a$  extrapolados de DMSO son sistemáticamente inferiores a los extrapolados de mezclas metanol-agua, siguiendo la tendencia,  $pK_a^{DMSO} = 0,61 + 0,86 pK_a^{CH_3OH}$  ( $r^2 = 0,99$ ,  $s = 0,27$ ,  $n = 8$ ). Puesto que la butacaína y el astemizol son bases dipróticas, en realidad, es posible determinar la  $pK_a$  de pH bajo en ausencia de codisolvente. En ambos casos, los valores extrapolados de DMSO son más sesgados que los de metanol. La variación es particularmente evidente en el caso del valor de  $pK_a$  de pH bajo de butacaína. Los valores extrapolados de metanol parecen ser más precisos en general, y esta conclusión se basa en el hecho de que el metanol se considera el «menos problemático» de los codisolventes utilizados en determinaciones de  $pK_a$ . Excluyéndose los resultados de DMSO, en esta medición de permeabilidad ejemplar no se han de considerar los valores de SGA, puesto que el uso de codisolvente no fue una característica disponible y porque las desviaciones de la línea de identidad en la Figura 1 son importantes. La Figura 1 muestra que se observa mejor concordancia entre valores potenciométricos de GLpKa y Gemini, como se indica con los círculos rellenos en una posición muy cercana a la línea de identidad.
- [0059]** Los valores de GLpKa y Gemini simplemente se pueden promediar para el conjunto de trabajo. En esta medición de permeabilidad ejemplar, esto no se lleva a cabo por la siguiente razón: a pesar de que los ensayos están bien diseñados, y en ellos las relaciones codisolvente-agua se eligen para que sean lo suficientemente elevadas para evitar precipitación, es casi imposible estar seguro de que no se va a producir precipitación en las relaciones codisolvente-agua más bajas. Debido al diseño del cambiador de muestras en el GLpKa, no es conveniente visualizar las disoluciones durante la titulación. En cambio, el instrumento Gemini tiene el vial de cristal a la vista. Las observaciones visuales sugirieron que era altamente probable que en varios casos se hubiese producido precipitación en el GLpKa con estos compuestos de baja solubilidad. Asimismo, el procedimiento de calibración del electrodo Gemini hizo que los valores de  $pK_a$  inferiores a 3 sean más fiables en disoluciones de codisolvente.
- [0060]** La Figura 2 se refiere a los resultados del instrumento Gemini de mediciones de  $pK_a$ . Ilustra lo que posiblemente pueda fallar con los ensayos diseñados de manera convencional, y las consecuencias habituales en mediciones convencionales, que, en contraposición, son circuncalculadas con el instrumento Gemini. En la Figura 2 se ilustran seis determinaciones de la  $pK_a$  de clotrimazol en metanol de 11 - 49 % en peso. La  $pK_a$  extrapolada a 0 de codisolvente es  $6,02 \pm 0,05$ . Los recuadros de la Figura 2 son gráficas de Bjerrum (Avdeef A. «Absorption and Drug Development», Wiley-Interscience, 2003, pág. 116-246) para las titulaciones de 11, 28 y 39 % en peso. Las curvas discontinuas en los recuadros corresponden a las curvas esperadas en el límite de concentración infinitamente baja de muestra, donde no se produciría precipitación. Las curvas continuas, que unen los puntos medidos, indican un desplazamiento significativo respecto de las curvas discontinuas libres de precipitación. Este desplazamiento se produce porque el clotrimazol precipitó en titulaciones por debajo de 35 % en peso de metanol. Los programas de refinamiento convencionales, que no ponen en práctica dicha precipitación, infravalorarían sistemáticamente la  $pK_a$  con relaciones de codisolvente decrecientes, con un error que puede llegar a una unidad logarítmica en el caso de 11 % en peso (recuadro de la Figura 2). Si los valores sesgados son la base de la extrapolación, la  $pK_a$  estaría cerca de 5, una unidad logarítmica menos (los datos no se muestran).
- [0061]** El aspecto singular del programa de refinamiento en el instrumento Gemini es que puede determinar el valor  $pK_a$  no sesgado en presencia de cierta precipitación, puesto que los valores de  $pK_a$  y solubilidad se refinan simultáneamente. El ajuste de la Figura 2 se pondera mediante los errores obtenidos en los refinamientos de conjunto-individual, que pondera hacia abajo las contribuciones de los puntos de porcentaje en peso de codisolvente más bajos si «demasiada» precipitación impide una determinación precisa del valor  $pK_a$ .
- [0062]** La tecnología de  $pK_a$  novedosa es la más adecuada para determinar las constantes de ionización de los compuestos más insolubles. Las siguientes mejoras son evidentes: (a) es factible una mayor amplitud de relaciones de codisolvente, puesto que la precipitación en las relaciones inferiores se circuncalcula, (b) se pueden utilizar concentraciones mayores de muestra, para una determinación más sensible, (c) seleccionar las «mejores» relaciones de codisolvente es menos crítico para el proceso de extrapolación, lo cual hace que el procedimiento sea más tolerante a «fallos», y (d) la calibración del electrodo de pH *in situ* hace que sean posibles las determinaciones de  $pK_a$  en una ventana de pH más amplia en titulaciones de codisolvente.
- [0063]** En la Tabla 1 (Véase más arriba) se incluyen los valores de  $pK_a$  determinados mediante el instrumento Gemini a una fuerza iónica de 0,15 M (KCl). Estos valores se convierten a nivel de fuerza iónica de 0,01 M y se utilizan en todos los análisis PAMPA subsiguientes, puesto que el tampón de permeabilidad está en la fuerza iónica menor. En el caso de KCl a 0,1 y 0,2 M, se realizaron ajustes apropiados a la constante (Avdeef A., «Absorption and Drug Development», Wiley-Interscience, 2003, pág. 116 -246).
- [0064]** La Figura 3 se refiere a mediciones mediante ensayo PAMPA sin excipientes. Muestra los perfiles de permeabilidad libre de excipiente para las moléculas mencionadas. Las líneas continuas indican el mejor ajuste de los valores de permeabilidad efectiva,  $\log P_e$  (círculos rellenos), como una función de pH, según la ecuación (12). Los

valores de muestra de  $pK_a^{flux}$  se indican en la Figura 3 (a-c,g,h). Las curvas de permeabilidad de membranas de líneas discontinuas,  $\log P_m$  vs. pH, se generan cuando se excluyen los valores de permeabilidad de capa límite acuosa (ABL) calculados (líneas horizontales punteadas) de los valores de permeabilidad efectiva (ecuaciones (9) y (10)). Las curvas de línea continua de la Figura 3 (todas, excepto (d) y (e)) son ejemplos de transporte limitado por la ABL, puesto que, en su máxima medida, están por debajo de las curvas de línea discontinua. Con bases, para  $pH \gg pK_a^{flux}$ , la ecuación (12) es la de una línea horizontal, y para  $pH \ll pK_a^{flux}$ , la ecuación (12) es la de una línea diagonal, con una pendiente de +1. Con ácidos, para  $pH \ll pK_a^{flux}$ , la ecuación (12) es la de una línea horizontal, y para  $pH \gg pK_a^{flux}$ , la ecuación (12) es la de una línea diagonal, con una pendiente de -1.

**[0065]** Todos los datos de permeabilidad se miden con la lectura de Gut-Box con ABL de 40  $\mu m$ , excepto para progesterona, donde la lectura es de ABL de 25  $\mu m$ , puesto que el procedimiento de  $pK_a^{flux}$  directo no se puede utilizar con moléculas no ionizables. Para dichas moléculas, se conoce un procedimiento de calibración (Avdeef A. et al., «Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux method», Eur. J. Pharm. Sci., 2005, 24, 333 -349; y Avdeef A. et al., «PAMPA - a drug absorption in vitro model», 11, «Matching the in vivo aqueous boundary layer by individual-well stirring in microtitre plates», Eur J. Pharm. Chem., 2004, 22, 365-374). Los grosores de ABL refinados (ecuación (12)) se indican en la Figura 3, y varían entre 21 - 97  $\mu m$ . Los tres valores que exceden 75  $\mu m$  pueden indicar que la butacaína, el ácido mefenámico y la glibenclamida se agregan en la disolución. Puesto que la permeabilidad de la ABL depende del peso molecular de la especie que se difunde en disolución acuosa, el uso del peso molecular de monómero en los cálculos produce un mayor grosor de ABL aparente.

**[0066]** Con respecto a las mediciones de ensayo PAMPA con excipientes, se efectúan más de 1.200 mediciones de ensayo PAMPA de doble sumidero en el intervalo de pH 3 - 10. Se utilizan  $pK_a$  (Gemini) de alta precisión para el procedimiento  $pK_a^{flux}$  para calcular la permeabilidad intrínseca y de ABL. La Tabla 2 compila los 120 valores de  $P_o$  determinados en esta medición de permeabilidad ejemplar, junto con la retención de membrana máxima (%R), y grosores de ABL aparentes.

Tabla 2

COMPUESTO	PM	$P_{ABL}$ esperada (Ref. Xx)	$P_{ABL}$ NaTC 0 mM	$P_{ABL}$ NaTC 3 mM	$P_{ABL}$ NaTC 15 mM	PM*/PM
astemizol	458,6	1.135	1.080	561	9	1, 5, 56.000
butacaína	306,4	1.360	713	954	13	4,2,30.000
clotrimazol	344,8	1.290	2.400	604	--	<1, 5 --
dipiridamol	504,6	1.088	941	922	47	1, 1, 1.100
glibenclamida	494,0	1.098	451	--	12	7, --, 24.000
ácido mefenámico	241,3	1.514	782	909	795	4,3,4

**[0067]** La molécula más permeable es astemizol, con valores de  $P_o$  que oscilan entre 0,5 (PEG400 0,24 % v/v y NaTC 15 mM) a 32 cm/s (NaTC 3 mM). La molécula menos permeable es griseofulvina, con valores de  $P_o$  que oscilan entre  $1,8 \times 10^{-4}$  (PG 5 % v/v) a  $4,1 \times 10^{-4}$  cm/s (KCl 0,1 M).

**[0068]** La retención de membrana es considerable en la mayor parte de las moléculas, siendo astemizol la de máxima retención, con valores que oscilan normalmente entre 79 % - 90 % (pero bajando a 24 % en el caso de NaTC 15 mM). A pesar de dichos agotamientos de las fases acuosas, todavía es posible acceder a la permeabilidad de astemizol mediante software del instrumento PAMPA Evolution. Como se indica en la Tabla 2, las otras moléculas retenidas cambian de posición en la clasificación con los excipientes. Las retenciones de membrana bajas indican que el excipiente compite de manera eficaz con la membrana PAMPA al mantenerse unido a los compuestos, como por ejemplo en el caso de NaTC a 15 mM, en particular para clotrimazol, donde la retención baja a 4 %, en comparación con el valor libre de excipiente de 80 %.

**[0069]** Los grosores de ABL incluidos en la Tabla 2 también indican interacciones entre excipiente y fármaco. Idealmente, si los fármacos no formaron ni agregados en las disoluciones libres de excipiente ni complejos asociados con excipientes, entonces los grosores de ABL determinados,  $h_{ABL}$ , deberían haber sido de alrededor de 40  $\mu m$  (o 25  $\mu m$  en el caso de disoluciones de progesterona muy agitadas). En varios casos, tales como con astemizol y clotrimazol, se determinan los  $h_{ABL} < 50 \mu m$  esperados. No obstante, con un marcado contraste, los grosores de ABL calculados en disoluciones de NaTC a 15 mM están por encima de 1.000  $\mu m$  en varios casos. La Tabla 2 incluye la  $P_{ABL}$  teóricamente esperada y experimental. Los valores rebajados observados se pueden interpretar como producto

del efecto de complejos asociados que tienen pesos moleculares muy elevados. La relación entre  $P_{ABL}$  y  $PM$  es conocida en la técnica. Por ejemplo, si la ecuación 4 de Avdeef A., «The Rise of PAMPA», *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2005, 1, 325-342 se aplica a la  $P_{ABL}$  aparente, las disoluciones libres de excipiente (NaTC 0 %, Tabla 3) parecen indicar difusión acuosa de monómeros en el caso de astemizol, clotrimazol, y dipiridamol, puesto que la relación del peso molecular aparente,  $MW^*$  (basado en la suposición de ABL de 40  $\mu m$ ) respecto del peso molecular verdadero,  $PM^*/PM$ , es cercana a 1. En las mismas disoluciones tampón, parecen indicarse agregados del orden de 4 - 7 para algunos de los otros fármacos de baja solubilidad (Streng W.H. et al., «Determination of solution aggregation using solubility, conductivity, calorimetry, and pH measurements», *Int. J. Pharm.*, 1996, 135, 43-52). En disoluciones de taurocolato de sodio a 3 mM, solo dipiridamol parece comportarse como monómero, y las otras moléculas aparecen como agregados del orden de 3 - 5. Estos agregados pueden ser asociaciones entre fármaco y excipiente. En disoluciones de NaTC a 15 mM, la reducción de la permeabilidad de la ABL es extrema y según análisis simples se puede llegar a órdenes de agregación de 56.000, lo cual no parece razonable. Es difícil estar muy seguro de que la formación de complejo con el excipiente es la única explicación, puesto que cuesta trabajar con disoluciones de NaTC a 15 mM en el instrumento robotizado, debido a que se forman burbujas con facilidad en la placa de microvaloración. La posibilidad de que la disolución de NaTC a 15 mM disuelva parte de la membrana PAMPA es un motivo de preocupación, pero no se observan pruebas visuales del efecto (turbidez en la disolución).

**[0070]** La Figura 4 muestra las diferencias entre  $\log P_0$  en disoluciones que contienen excipientes y las de disoluciones libres de excipiente (nivel de base), como una función de la cantidad de excipiente. En muchos casos, es evidente que las bases se comportan de manera diferente de los ácidos y neutros. En disoluciones de KCl, NMP y PEG400, las bases parecen tener permeabilidades intrínsecas rebajadas en presencia de excipientes, mientras que los ácidos y neutros tienen permeabilidades elevadas. Para disoluciones que contienen NaTC y HP- $\beta$ -CD, en el nivel más alto de excipiente, todos los compuestos parecen tener una permeabilidad disminuida. Aparentemente, la unión de los fármacos a dichos excipientes es suficientemente resistente y la fracción libre restante de las concentraciones de fármaco sin unión cae de manera significativa, de modo que el gradiente de concentración entre los compartimentos donante y aceptor en la celda de permeación disminuye, lo cual produce una menor permeabilidad.

**[0071]** Con respecto a la visualización de los resultados de la medición de permeabilidad ejemplar descritos en la presente memoria, a pesar de que la Figura 4 describe el efecto de los excipientes, es visualmente difícil captarlo rápido y usarlo en decisiones prácticas referentes a los usos de los excipientes. Por lo tanto, en las Figuras 5, 6 y 7 se muestra un esquema de cartografía, denominado cartografía de ensayo PAMPA, que mejora los aspectos visuales de los efectos de los excipientes. Se muestran tres mapas de componentes de cartografía de ensayo PAMPA: permeabilidad (Figura 5), retención de membrana (Figura 6), y ABL (Figura 7). A lo largo de los ejes verticales están las composiciones de excipiente, ordenadas por su efecto de mejora sobre la permeabilidad intrínseca. A lo largo de los ejes horizontales están los fármacos, dispuestos en el orden de permeabilidad más mejorada a menos mejorada. En promedio para todos los excipientes, la permeabilidad intrínseca de ácidos y neutros se mejora, pero disminuye para las bases. Los colores cálidos, que son rojo, amarillo y similares indican un aumento en la propiedad representada como resultado de un excipiente, donde el nivel de base se define mediante resultados libres de excipiente. Los colores fríos, que son azul violeta y similares, indican lo contrario. Por ejemplo, si el objetivo de diseño es mejorar la permeabilidad, la esquina superior izquierda del mapa de permeabilidad identifica las combinaciones de moléculas y excipiente que son más prometedoras para aumentar la permeabilidad, y la esquina inferior derecha del mapa muestra regiones que pueden llegar a ser más problemáticas.

**[0072]** El mapa de retención de membrana de la Figura 6 es, en cierta medida, redundante respecto del mapa de permeabilidad de la Figura 5. Si las leyes de difusión de Fick simples fueran únicamente responsables del transporte, entonces, en principio, los dos mapas deberían ser iguales. Sin embargo, se puede observar que existen diferencias sutiles entre los dos mapas. Una consideración para explicar este efecto es que cuando la retención aumenta considerablemente, hay muy poco compuesto para detección analítica. En ninguno de los casos considerados en la presente memoria esto constituye un problema. La ausencia del eliminador de doble sumidero en los compartimentos receptores parece señalar que el mapa de retención de membrana indica problemas analíticos insalvables para el procedimiento de detección de UV utilizado en el instrumento PAMPA Evolution.

**[0073]** El mapa de ABL de la Figura 7 es aproximadamente una imagen espejada de los otros dos mapas de la Figura 5 y la Figura 6. Las relaciones  $h_{ABL}$  elevadas se pueden interpretar como alta interacción entre fármaco y excipiente, lo cual produce menor difusión en la capa acuosa y menor retención de membrana. Una interpretación inesperada del mapa de ABL puede ser que algunos fármacos forman agregados en disoluciones libres de excipiente (véase más arriba), pero en presencia de ciertos excipientes, la tendencia de los fármacos a auto asociarse se reduce. Esto sucede con glibenclamida, butacaina y dipiridamol en KCl, PG 0,24 % v/v, NMP 1 % v/v, y PEG 1 %, por ejemplo, como se indica en las regiones de azul oscuro del mapa.

**[0074]** Los mapas a color introducidos son nuevos y su uso evoluciona constantemente. Los mapas tienen una apariencia sistemática, en parte porque los excipientes y los compuestos se ordenaron de una manera óptima. Con

un gran número de moléculas, y tal vez más condiciones y tipos de excipientes, se podrían desarrollar algoritmos por ordenador, donde los mapas se «auto organizaran» según algún tipo de esquemas de similitudes.

5 [0075] Para la primera realización del procedimiento según la invención también se pueden llevar a cabo mediciones de solubilidad apropiadas de diversas maneras. Puesto que muchas moléculas pueden tener muy baja solubilidad, en particular las moléculas de los programas de descubrimiento de fármacos, la medición de solubilidad tiene que ser rápida y además ahorrar compuesto. El cribado para determinar los efectos de los excipientes en la solubilidad hace que la tarea sea todavía más desalentadora. Sin embargo, están surgiendo procedimientos rápidos de cribado sistemático para agentes solubilizantes. Chen et al. (Chen, H. et al., «A high-throughput combinatorial approach for the discovery of a Cremophor EL-free paclitaxel formulation», Pharm. Res., 2003, 20, 1302 -1308) utilizan un ensayo robotizado completamente factorial para cribar 10.000 combinaciones de doce excipientes (incluyendo PEG400, polisorbato 80 y etanol) en varias combinaciones para descubrir una formulación libre de Cremophor EL mejorada para paclitaxel, un fármaco muy consolidado en el mercado. Claramente existen oportunidades para mejorar tanto la eficacia como la precisión de dichos procedimientos rápidos, utilizando diseño experimental (DOE, por su sigla en inglés) parcialmente factorial. En la técnica existen softwares comerciales que relacionan los enfoques de diseño experimental directamente con el control robotizado. Asimismo, se presentan oportunidades de automatizar procedimientos de cálculo para procesar los datos de solubilidad de manera adecuada para posibles efectos de agregación.

20 [0076] En la medición de solubilidad-excipiente ejemplar descrita en la presente memoria, el tema explorado en un excipiente de ensayo PAMPA de doble sumidero, donde se introduce el procedimiento de cartografía de ensayo PAMPA, se basa en ocho fármacos poco solubles (astemizol, butacaína, clotrimazol, dipiridamol, griseofulvina, progesterona, glibenclamida, y ácido mefenámico), medidos en quince combinaciones de seis excipientes (taurocolato de sodio, 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina, cloruro de potasio, propilenglicol, 1-metil-2-pirrolidona, y polietilenglicol 400).

30 [0077] El ejemplo mencionado de medición de solubilidad se lleva a cabo utilizando los compuestos astemizol, butacaína, clotrimazol, dipiridamol, griseofulvina, progesterona, glibenclamida y ácido mefenámico. El pH de las disoluciones donantes analizadas se ajusta con tampones universales de la compañía pION (PN 100621, 1100151).

35 [0078] Los excipientes utilizados en este ejemplo de medición de solubilidad comprenden cantidades de seis excipientes que se seleccionan para superponer las concentraciones esperadas en un fluido intestinal en condiciones clínicamente relevantes. Brevemente, se seleccionó KCl a 0,1 y 0,2 M; se prepararon disoluciones de taurocolato de sodio (NaTC) a 3 y 15 mM, correspondientes a estados de TGI de ayuno y de alimentación (35). Para los excipientes líquidos, se asume que el volumen de cápsula máximo es 0,6 mL: para un volumen de TGI de 250 mL (35), la concentración de excipiente calculado es 0,24 % v/v. Por lo tanto, para N-metilpirrolidona (NMP), propilenglicol (PG) y polietilenglicol 400 (PEG400), se analizan disoluciones de excipientes de 0,24, 1, y 5 % v/v. Con excipientes sólidos encapsulados, tales como hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), con PM 1.396 y solubilidad de 450 mg/mL, sería posible envasar 270 mg en una cápsula de 0,6 mL, lo cual es equivalente a una disolución de 0,1 % p/v en el volumen del TGI. Valores ligeramente superiores de 0,24 y 1 % p/v se utilizan en este ejemplo de medición de solubilidad. En total, contando las disoluciones tampón libres de excipiente, se evalúan 15 disoluciones distintas con las moléculas de los ocho fármacos para determinar el efecto en la solubilidad, lo cual da como resultado 120 combinaciones fármaco-excipiente.

45 [0079] Con respecto a la medición de  $pK_a$ , los datos de  $pK_a$  de alta precisión determinados mediante el procedimiento potenciométrico utilizando el instrumento Gemini de la compañía pION se determinan por extrapolación en disoluciones de metanol-agua, aprovechando la capacidad del instrumento Gemini para determinar valores de  $pK_a$  incluso si hay precipitación durante una porción de la titulación, tanto en disoluciones acuosas como de codisolvente. La calibración del electrodo de pH se llevó a cabo *in situ* mediante el instrumento, simultáneamente con la determinación de  $pK_a$ , especialmente una característica importante para  $pK_a < 3$  o  $pK_a > 10$  en disoluciones de codisolvente.

55 [0080] El procedimiento de solubilidad en equilibrio con placa de microvaloración de 96 pocillos con luz UV directa altamente automatizado implementado en el instrumento  $\mu$ SOL Evolution de la compañía pION, Inc. (Woburn, MA, EE.UU.) se utiliza en este ejemplo de medición de solubilidad, con datos recogidos a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C). Las muestras normalmente se introducen como disoluciones de DMSO a 10 - 30 mM. El sistema de manejo de líquidos robotizado (p. ej. Beckman Coulter Biomek-FX ADME-TOX Workstation) extrae una alícuota de 3 - 10  $\mu$ L de la disolución de partida de DMSO y la mezcla en una disolución tampón universal acuosa, de forma que la concentración de muestra (máxima) final sea 50 - 250  $\mu$ M en las disoluciones tampón que contienen excipiente. La concentración de DMSO residual se mantiene a 1,0 % (v/v) en las disoluciones tampón finales. Las disoluciones tienen pH variados (tampón universal tratado con NaOH). Esto es necesario para determinar las constantes de agregación y solubilidad intrínseca (Avdeef A. et al., «Dissolution - Solubility: pH, Buffer, Salt, Dual-Solid, and

Aggregation Effects» en: Testa B. et al., «Comprehensive Medicinal Chemistry II, Vol. 5», ADME-TOX Approaches, Elsevier: Oxford, Reino Unido, 2006). Cada medición de solubilidad - pH se lleva a cabo por duplicado y los resultados se promedian mediante el software del instrumento. Los tampones utilizados en el ensayo se preparan automáticamente mediante el sistema robotizado. Los controles de calidad de los tampones y del electrodo de pH se llevan a cabo mediante titulación alcalimétrica, incorporando el procedimiento de Avdeef-Bucher (Avdeef, A. et al., «Accurate measurements of the concentration of hydrogen ions with a glass electrode: calibrations using the Prideaux and other universal buffer solutions and a computer-controlled automatic titrator», Anal. Chem., 1978, 50, 2137-2142). Al cabo de  $18 \pm 1$  h se filtran las disoluciones tampón que contienen suspensiones del fármaco sólido (microfiltro con tamaño de poro de  $0,2 \mu\text{m}$ ), y las disoluciones sobrenadantes se analizan para determinar la cantidad de material presente, en comparación con el espectro UV (230 a 500 nm) obtenido de un estándar de referencia, utilizando un procedimiento espectroscópico patentado que viene con el instrumento Evolution.

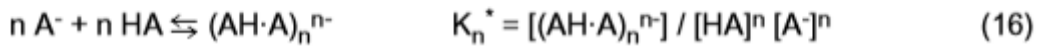
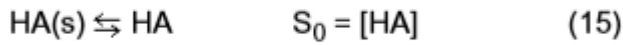
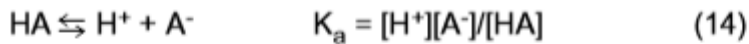
**[0081]** Con respecto a los casos 1a, 1b, 2a, y 2b de la Figura 8, se ha de indicar que cuando un compuesto forma un dímero o un oligómero de orden superior en una disolución acuosa, el perfil de solubilidad-pH característico adopta una forma no predicha por la ecuación de Henderson-Hasselbalch (cf. curvas continuas de la Figura 8) y a menudo indica una  $\text{pK}_a$  aparente que es distinta de la  $\text{pK}_a$  verdadera (p. ej. casos 1a y 1b de la Figura 8), como se determina de manera potenciométrica en disoluciones acuosas diluidas o de codisolvente (29). La Figura 8 muestra seis casos diferentes de distorsiones inducidas por agregación de curvas de  $\log S - \text{pH}$ . Las derivaciones de los casos 1a, 1b, 2a y 2b se describen en la bibliografía, y los procedimientos para extraer valores de solubilidad intrínseca subyacentes se conocen en la técnica. Los casos de tratamientos 3a y 3ax son nuevos y sus derivaciones se describen brevemente a continuación. Según dicho desplazamiento de  $\text{pK}_a$  en análisis de solubilidad, se proponen constantes de dimerización que oscilan entre  $1,7 \times 10^{+3}$  y  $1,8 \times 10^{+5} \text{ M}^{-1}$  (Avdeef A. et al., «Dissolution - Solubility: pH, Buffer, Salt, Dual-Solid, and Aggregation Effects» en: Testa B. et al., «Comprehensive Medicinal Chemistry II, Vol. 5 ADME-TOX Approaches», Elsevier: Oxford, Reino Unido, 2006) para fenazopiridina (caso 2b de la Figura 8), indometacina (caso 2a de la Figura 8), ácido 2-naftoico (caso 2a de la Figura 8), y piroxicam (caso 1a de la Figura 8).

**[0082]** Las ecuaciones que subyacen y resumen este ejemplo de medición de solubilidad describen matemáticamente relaciones de pH-solubilidad, y se pueden utilizar para el fin práctico de interpolación, extrapolación, redondeo y compresión de datos. Asimismo, el procedimiento de desplazamiento de  $\text{pK}_a$  se puede utilizar como una herramienta de alerta rápida. Como se implica, la molécula debe tener un grupo de ionización dentro del intervalo de pH accesible para que el procedimiento funcione. Cuando se analiza una gráfica de  $\log S$  vs. pH, y se conoce la  $\text{pK}_a$  verdadera de manera independiente, se puede deducir rápidamente si hay presencia de agregados, y si estos efectos de «anomalía» se deben a la forma neutra o a la forma cargada del fármaco. Además, la solubilidad intrínseca se puede calcular a partir de la magnitud o dirección del desplazamiento de  $\text{pK}_a$ . Estos son los mejores usos del procedimiento de desplazamiento. Sin embargo, se ha de tener cuidado para no sobreinterpretar mecánicamente los datos de medición. Si una molécula sin carga experimenta alguna anomalía de especiación (agregación, unión de DMSO, retención en filtro, etc.) los ácidos débiles indicarán una  $\text{pK}_a$  aparente más elevada que la  $\text{pK}_a$  verdadera (caso 1a de la Figura 8), y las bases débiles indicarán una  $\text{pK}_a$  aparente más baja que la  $\text{pK}_a$  verdadera (caso 1b de la Figura 8). Si los desplazamientos observados son opuestos a lo que se indica más arriba, entonces la especie cargada (más que la neutra) está implicada en la anomalía (casos 2a y 2b de la Figura 8). Si bien el mecanismo preciso de la anomalía puede no ser aparente en todos los casos, el desplazamiento combinado con la solubilidad aparente a menudo revelará la solubilidad (sin desplazamiento) intrínseca,  $S_0$ . Existe una consecuencia práctica adicional a esto en cuanto a los excipientes: en muchos casos es posible medir la solubilidad en presencia de excipientes y al mismo tiempo evaluar la solubilidad que habría sido evidente en ausencia de excipientes añadidos, como si fueran la fuente de la anomalía.

**[0083]** Se consideraron seis tipos de agregados,  $(\text{HA})_n$ ,  $\text{B}_n$ ,  $\text{A}_n^{n-}$ ,  $(\text{BH}^+)_n$ ,  $(\text{AH}\cdot\text{A})_n^{n-}$ , y  $(\text{AH}\cdot\text{A})_n^{n-}$ , en presencia de excipientes. Sus derivaciones siguen la línea de lo indicado en la bibliografía. Esto se resume brevemente a continuación para las dos situaciones nuevas:

**[0084]** En la primera situación, se consideran agregados de ácido débil de carga mixta  $(\text{AH}\cdot\text{A})_n^{n-}$  (caso 3a de la Figura 8). En los casos 2a y 2b, el orden de agregación se revela mediante pendientes mayores de uno en las gráficas de  $\log S - \text{pH}$  (Avdeef A. et al., «Dissolution - Solubility: pH, Buffer, Salt, Dual-Solid, and Aggregation Effects» en: Testa B. et al. «Comprehensive Medicinal Chemistry II, Vol. 5», ADME-TOX Approaches, Elsevier: Oxford, Reino Unido, 2006). En este ejemplo de medición de solubilidad, se determinan varios casos de pendientes cercanas a uno, aunque aparentemente se produce cierta agregación. Existe un modelo plausible para describir este caso. Se puede hipotetizar que se forma la especie de ácido débil de carga mixta oligomérica,  $(\text{AH}\cdot\text{A})_n^{n-}$ , que contiene una relación 1:1 de HA y A-. Las ecuaciones de equilibrio y los cocientes de concentración asociados requeridos para definir completamente el problema de balance de materia son





[0085] La solubilidad se define mediante

$$S = [A^-] + [HA] + 2n [(AH \cdot A)_n^{n-}] \quad (17)$$

[0086] Los componentes  $[A^-]$  and  $[(AH \cdot A)_n^{n-}]$  en la ecuación (17) se pueden expandir en términos de  $[HA]$ , pH, y las diversas constantes de equilibrio:

$$\begin{aligned} S &= [HA] K_a / [H^+] + [HA] + 2n K_n^* [A^-]^n [HA]^n \\ &= [HA] \left\{ K_a/[H^+] + 1 + 2n K_n^* K_a^n [HA]^{2n-1} / [H^+]^n \right\} \end{aligned} \quad (18)$$

En forma logarítmica general,

$$\log S = \log S_0 + \log \left( 1 + K_a/[H^+] + 2n K_n^* K_a^n S_0^{2n-1} / [H^+]^n \right) \quad (19)$$

[0087] Dos formas limitantes de la ecuación (19) se pueden presentar como sigue:

$$\log S = \log S_0 \quad @ \text{ pH} \ll \text{p}K_a^{\text{APP}} \quad (20)$$

$$\log S = \log 2n + \log K_n^* + 2n \cdot \log S_0 - n \text{p}K_a + n \text{pH} \quad @ \text{ pH} \gg \text{p}K_a \quad (21)$$

[0088] La ecuación (20) indica que la formación de agregados de carga mixta no oculta el valor de la solubilidad intrínseca en disoluciones de pH bajo (caso 3a de la Figura 8). Si para un ácido débil, cuya  $\text{p}K_a$  aparente en una disolución saturada es menor que la  $\text{p}K_a$  verdadera, una pendiente de +1 para  $\text{pH} \gg \text{p}K_a$  en una gráfica de  $\log S$  vs. pH es coherente con la formación de las especies diméricas  $AH \cdot A^-$ . No obstante, una pendiente de +2 podría indicar un dímero del caso 2a o un tetrámero del caso 3a, que podrían ser difíciles de discernir.

[0089] En la segunda situación, se consideran agregados de carga mixta  $(AH \cdot A)_n^{n-}$  en presencia de un excipiente (caso 3ax de la Figura 8). En el caso 3a, la pendiente de la gráfica  $\log S$  - pH no puede ser inferior a uno. Los casos observados donde la pendiente es inferior a uno requirieron más modificaciones en los modelos de cálculo. Se podría hipotetizar que la especie de ácido débil de carga mixta oligomérica,  $(AH \cdot A)_n^{n-}$ , se forma, in presencia de un excipiente, X, que une solo la forma neutra del ácido débil HA. Además de las ecuaciones 1 y 2, se necesita



[0090] La constante de equilibrio K inserta el producto de la constante de equilibrio para reacción en la ecuación (22) y la concentración del excipiente, X, que se asume como prácticamente constante (es decir,  $[HA]_{\text{total}} \ll [X]_{\text{total}}$ ).

[0091] La solubilidad se define mediante

$$S = [A^-] + [HA] + 2n [(AH \cdot A)_n^{n-}] + [AH \cdot X] \quad (23)$$

[0092] Como antes, los componentes no  $[HA]$  de la ecuación (23) se pueden expandir en términos de  $[HA]$  y de las diversas constantes de equilibrio, dando como resultado la ecuación de forma general (ecuación (19)):

$$\log S = \log S_0 + \log \left( 1 + K_a/[H^+] + 2n K_n^* K_a^n S_0^{2n-1} / [H^+]^n + K^{\boxtimes} \right) \quad (24)$$

5 **[0093]** El ejemplo del caso 3ax de la Figura 8 se basa en constantes de equilibrio indicadas en la figura. En general no es posible extraer formas limitantes de la ecuación, para otro fin que no sea sugerir que la pendiente en el pH extremo siga siendo  $n \geq 1$ , debido a la dependencia de  $n$  del pH en la ecuación (24). Como ilustra el ejemplo del caso 3ax de la Figura 8, si los datos medidos solo se toman de la flexión de la curva a un pH elevado, la pendiente puede parecer inferior a uno, pero si existen datos de pH más elevados, el modelo predeciría una pendiente de +1.

10 **[0094]** Con respecto al refinamiento de los parámetros de agregación descritos, los datos de solubilidad - pH medidos por el instrumento  $\mu$ SOL Evolution se procesan con el software incorporado y almacenado en el administrador de datos ELM™ de la compañía pION. Los datos de distintos ensayos, agrupados en ELM, se vuelven a analizar mediante el software para determinar la presencia de agregados. Una de las ecuaciones se selecciona automáticamente con el software Evolution y los datos de  $\log S$  - pH se ajustan a ella mediante un procedimiento de regresión no lineal ponderado, donde se minimiza la siguiente función residual,

$$r = \sum_i^N \frac{(\log S_i^{obs} - \log S_i^{calc})^2}{\sigma_i^2 (\log S)} \quad (25)$$

15 donde  $N$  es la cantidad medida de valores de solubilidad en el modelo, y  $\log S_i^{calc}$  es la solubilidad logarítmica calculada, que es una función de los parámetros refinados:  $pK_a^{APP}$  (constante de ionización aparente),  $\log S_o^{APP}$  (solubilidad intrínseca aparente),  $\log S_o$  (solubilidad intrínseca verdadera - casos 1a y 1b de la Figura 8 únicamente),  $\log K_n$  (constante de agregación), y  $n$  (orden de agregación). La desviación estándar estimada en el  $\log S$  observado,  $\sigma_i$ , se estimó en 0,05 (unidades logarítmicas). La calidad general del refinamiento se evaluó mediante la prueba de bondad de ajuste (GOF, por sus siglas en inglés),

20

$$GOF = \sqrt{\frac{r}{N - N_p}} \quad (26)$$

25 donde  $N_p$  es la cantidad de parámetros refinados.

**[0095]** En la Tabla 3 se resumen todos los resultados refinados de este ejemplo de medición de solubilidad. Detrás de los valores refinados hay alrededor de 1.200 mediciones de solubilidad individuales-pH, recogidas rápidamente mediante el instrumento robotizado.

30

Tabla 3

COMPUESTO	pK <sub>a</sub>	EXCIPIENTE	S <sub>0</sub> <sup>APP</sup> ± DE	S <sub>0</sub> ± DE	Log K <sub>n</sub> ± DE	tipo	n ± DE	pK <sub>a</sub> <sup>APP</sup> ± DE	GOF	N	
astemizol	8,60  5,84	ninguno	0,29 ± 0,08		5,07 ± 0,44	⊕	1,8	8,9 ± 0,3	3,0	11	
		KCl 0,1M	0,19 ± 0,03		5,00 ± 0,21	⊕	2,4	9,2 ± 0,6	1,2	6	
		KCl 0,2M	0,27 ± 0,04		4,39 ± 0,27	⊕	2,4	8,8 ± 0,4	1,4	6	
		PG 0,24 %	0,22 ± 0,05		3,17 ± 0,53	⊕	3,5	8,7 ± 0,2	2,3	6	
		PG 1 %	0,22 ± 0,04		3,27 ± 0,41	⊕	3,6	8,7 ± 0,4	1,8	6	
		PG 5 %	0,31 ± 0,07		4,66 ± 0,33	⊕	2,2	9,0 ± 0,5	1,8	6	
		NMP 0,24 %	0,38 ± 0,06		4,89 ± 0,24	⊕	2,2	9,1 ± 0,5	1,4	6	
		NMP 1%	0,38 ± 0,08		5,67 ± 0,23	⊕	1,6	9,3 ± 0,4	1,4	6	
		PEG400 0,24 %	0,48 ± 0,01		7,50 ± 0,01	⊕	1,2	10,6 ± 0,2	0,1	5	
		PEG400 1 %	0,29		7,11 ± 0,07	⊕	1,5	10,0 ± 0,2	1,1	4	
		PEG400 5 %	0,29		7,87 ± 0,02	⊕	1,1	10,8	0,4	4	
		NaTC 3 mM	0,63 ± 0,07	0,2 ± 0,1			⊙		8,1 ± 0,1	0,9	6
		NaTC 15 mM	3,0 ± 0,7	1,4 ± 0,7			⊙		8,3 ± 0,2	1,6	6
		HP-β-CD 0,24 %	0,63 ± 0,06		4,79 ± 0,37		⊕	1,8	8,7 ± 0,1	0,8	6
		HP-β-CD 1 %	12 ± 2	4,0 ± 2,9			⊙		8,1 ± 0,3	1,6	6
		ninguno	40 ± 6	1,9 ± 0,7		⊙		8,8 ± 0,2	1,2	10	
		KCl 0,1M	83 ± 17	1,3 ± 0,8		⊙		8,3 ± 0,3	1,4	5	
		KCl 0,2M	78 ± 2	2,5 ± 0,2		⊙		8,6 ± 0,1	0,1	4	
		PG 0,24 %	51 ± 4	2,3 ± 0,5		⊙		8,8 ± 0,1	0,4	4	

ES 2 671 871 T3

COMPUESTO	pK <sub>a</sub>	EXCIPIENTE	S <sub>0</sub> <sup>APP</sup> ± DE	S <sub>0</sub> ± DE	Log K <sub>n</sub> ± DE	tipo	n ± DE	pK <sub>a</sub> <sup>APP</sup> ± DE	GOF	N
butacaína	10,09  2,05	PG 1 %	69 ± 5	0,9 ± 0,2		⊙		8,2 ± 0,1	0,5	5
		PG 5 %	66 ± 9	1,5 ± 0,5		⊙		8,5 ± 0,2	0,9	5
		NMP 0,24 %	47 ± 3	2,1 ± 0,5		⊙		8,8 ± 0,1	0,6	6
		NMP 1 %	71 ± 5	1,9 ± 0,5		⊙		8,5 ± 0,1	0,5	6
		PEG400 0,24 %	151	3,6		⊙		8,5	- b	2
		PEG400 1 %	107 ± 2	2,8 ± 0,4		⊙		8,5 ± 0,1	-0,1	3
		PEG400 5 %	107	2,8		⊙		8,5	- b	1
		NaTC 3 mM	50 ± 10	3,1 ± 1,6		⊙		8,9 ± 0,2	1,1	4
		NaTC 15 mM	96 ± 4	2,3 ± 0,4		⊙		8,5 ± 0,1	0,2	4
		HP-B-CD 0,24 %	79 ± 4	2,0 ± 0,3		⊙		8,5 ± 0,1	0,3	6
		HP-B-CD 1 %	141 ± 7	1,5 ± 0,4		⊙		8,1 ± 0,1	0,3	6
clotrimazol	6,02	ninguno	0,39 ± 0,18		5,93 ± 0,39	⊕	1,4	7,4 ± 1,1	2,8	11
		KCl 0,1M	0,39		6,20 ± 0,06	⊕	1,6	7,4	0,9	4
		KCl 0,2M	4,8 ± 1,3	3,3 ± 1,2		⊙		5,9 ± 0,2	1,2	6
		PG 0,24 %	1,1 ± 0,2		4,50 ± 0,22	⊕	1,6	6,5 ± 0,4	0,9	5
		PG 1 %	2,0 ± 0,5		2,56 ± 0,73	⊕	2,3	6,1 ± 0,1	1,9	5
		PG 5 %	2,6 ± 1,0		4,65 ± 0,53	⊕	1,4	6,3 ± 0,5	1,9	5
		NMP 0,24 %	1,3 ± 0,2		4,59 ± 0,25	⊕	2,0	6,4 ± 0,3	1,3	6
		NMP 1 %	1,7 ± 0,02		4,77 ± 0,16	⊕	1,8	6,5 ± 0,2	0,8	6
		PEG400 0,24 %	0,39		7,54 ± 0,03	⊕	1,3	7,9	0,6	6
		PEG400 1 %	0,39		7,15	⊕	1,9	7,4	- b	2

ES 2 671 871 T3

COMPUESTO	pK <sub>a</sub>	EXCIPIENTE	S <sub>0</sub> <sup>APP</sup> ± DE	S <sub>0</sub> ± DE	Log K <sub>n</sub> ± DE	tipo	n ± DE	pK <sub>a</sub> <sup>APP</sup> ± DE	GOF	N	
		PEG400 5 %	1,9 ± 0,6		6,86 ± 0,12	⊕	0,8	6,4 ± 0,1	0,1	4	
		NaTC 3 mM	1,1 ± 0,1		5,23 ± 0,18	⊕	1,5	6,4 ± 0,2	0,9	5	
		NaTC 15 mM	20 ± 2	6,8 ± 1,4			⊙		5,5 ± 0,1	0,6	6
		HP-β-CD 0,24 %	17 ± 0,4	6,6 ± 0,4			⊙		5,6 ± 0,1	0,2	6
		HP-β-CD 1 %	85 ± 4	11,3 ± 2,0			⊙		5,1	0,4	6
dipiridamol	6,22	ninguno	6,2 ± 1,1	2,3 ± 0,7		⊙		5,8 ± 0,1	2,1	6	
		KCl 0,1M	5,2 ± 0,8	3,3 ± 0,8		⊙		6,0 ± 0,1	0,8	6	
		KCl 0,2M	5,8 ± 0,9	3,1 ± 0,7		⊙		5,9 ± 0,1	0,8	6	
		PG 0,24 %	5,8 ± 0,5	2,1 ± 0,3		⊙		5,8 ± 0,1	0,5	6	
		PG 1 %	6,5 ± 0,3	2,7 ± 0,2		⊙		5,8 ± 0,1	0,3	6	
		PG 5 %	9,8 ± 1,3	3,9 ± 0,8		⊙		5,8 ± 0,1	0,8	6	
		NMP 0,24 %	5,9 ± 1,1	2,2 ± 0,6		⊙		5,8 ± 0,1	1,0	6	
		NMP 1 %	8,1 ± 1,5	2,4 ± 0,7		⊙		5,7 ± 0,1	1,1	6	
		PEG400 0,24 %	4,6 ± 1,2		6,95 ± 0,13	⊕	0,6	6,8 ± 0,1	0,4	4	
		PEG400 1 %	11 ± 3	5,0 ± 1,9			⊙		5,9 ± 0,2	1,3	6
		PEG400 5 %	14 ± 1	13,7 ± 2,4			⊙		6,2 ± 0,1	0,4	4
		NaTC 3 mM	24 ± 2	5,3 ± 0,9			⊙		5,6 ± 0,1	0,5	6
		NaTC 15 mM	110 ± 5	9,9 ± 1,7			⊙		5,2 ± 0,1	0,4	6
		HP-β-CD 0,24 %	7,1 ± 0,8	2,8 ± 0,7			⊙		5,8 ± 0,1	0,8	6
HP-β-CD 1 %	15 ± 1	3,2 ± 0,7			⊙		5,6 ± 0,1	0,6	6		
griseofulvina		ninguno	14 ± 0,4							3	
		KCl 0,1M	21 ± 1							3	
		KCl 0,2M	19 ± 2							3	
		PG 0,24 %	18 ± 2							3	
		PG 1 %	24 ± 1							3	
		PG 5 %	25 ± 2							3	

ES 2 671 871 T3

COMPUESTO	pK <sub>a</sub>	EXCIPIENTE	S <sub>0</sub> <sup>APP</sup> ± DE	S <sub>0</sub> ± DE	Log K <sub>n</sub> ± DE	tipo	n ± DE	pK <sub>a</sub> <sup>APP</sup> ± DE	GOF	N
		NMP 0,24 %	19 ± 1							3
		NMP 1 %	25 ± 1							3
		PEG400 0,24 %	20 ± 2							3
		PEG400 1 %	20 ± 1							3
		PEG400 5 %	27 ± 2							3
		NaTC 3 mM	39 ± 2							3
		NaTC 15 mM	54 ± 2							3
		HP-β-CD 0,24 %	23 ± 2							3
		HP-β-CD 1 %	24 ± 1							3
progesterona		ninguno	17 ± 1							3
		KCl 0,1M	23 ± 1							3
		KCl 0,2M	20 ± 1							3
		PG 0,24 %	18 ± 3							3
		PG 1 %	19 ± 2							3
		PG 5 %	24 ± 14							3
		NMP 0,24 %	14 ± 2							3
		NMP 1 %	20 ± 1							3
		PEG400 0,24 %	18 ± 1							3
		PEG400 1 %	15 ± 2							3
		PEG400 5 %	30 ± 6							3
		NaTC 3 mM	22 ± 1							3
		NaTC 15 mM	48 ± 3							3
		HP-β-CD 0,24 %	162 ± 9							3
		HP-β-CD 1 %	187 ± 6							3
glibenclamida	5,90	ninguno	0,35 ± 0,10		7,23 ± 0,16	θ	1,1 ± 0,1	4,3 ± 0,1	1,4	11
		KCl 0,1M	0,35		6,97 ± 0,15	θ	1,1 ± 0,2	4,3	2,7	6
		KCl 0,2M	0,35		6,99 ± 0,06	θ	1,2 ± 0,1	4,3	1,1	5
		PG 0,24 %	0,35		7,36 ± 0,12	θ	1,1 ± 0,2	4,3	2,4	5
		PG 1 %	0,35		7,34 ± 0,08	θ	1,1 ± 0,1	4,3	1,7	5
		PG 5 %	0,71		7,37 ± 0,02	θ	1,0 ± 0,04	4,2 ± 0,2	0,5	6
		NMP 0,24 %	0,45 ± 0,11		6,95 ± 0,15	θ	1,0	4,6 ± 0,1	1,2	6
		NMP 1 %	0,65 ± 0,10		6,92 ± 0,08	θ	0,8 ± 0,1	4,7 ± 0,1	0,5	6

ES 2 671 871 T3

COMPUESTO	pK <sub>a</sub>	EXCIPIENTE	S <sub>0</sub> <sup>APP</sup> ± DE	S <sub>0</sub> ± DE	Log K <sub>n</sub> ± DE	tipo	n ± DE	pK <sub>a</sub> <sup>APP</sup> ± DE	GOF	N
		PEG400 0,24 %	0,36		5,96 ± 0,09	θ	0,9 ± 0,2	5,4 ± 0,1	0,6	5
		PEG400 1 %	0,26		6,88 ± 0,09	θ	0,9 ± 0,1	4,7 ± 0,2	1,0	6
		PEG400 5 %	2,69		5,95 ± 0,36	θ	0,8 ± 0,5	5,6 ± 0,2	1,0	6
		NaTC 3 mM	0,32		7,42 ± 0,03	θ	1,2 ± 0,04	4,3 ± 0,01	0,4	6
		NaTC 15 mM	2,5 ± 1,6		6,69 ± 0,52	θ	0,5 ± 0,2	5,5 ± 0,1	0,5	6
		HP-β-CD 0,24 %	4,4 ± 1,7		6,67 ± 0,39	θ	0,9 ± 0,2	5,5 ± 0,1	0,6	6
		HP-β-CD 1 %	24 ± 5		6,79 ± 0,32	θ	0,7 ± 0,1	5,4 ± 0,1	0,2	6
ácido mefenámico	4,54	ninguno	0.021 ± 0.005		6,02 ± 0,80	θ	2,6 ± 2,1	4,3 ± 0,3	3,6	18
		KCl 0,1M	0.023 ± 0.005		6,61 ± 0,60	θ	3,5	4,4 ± 0,4	2,0	5
		KCl 0,2M	0,021		5,72 ± 0,38	θ	2,1 ± 1,1	4,3	3,7	3
		PG 0,24 %	0,021		6,88 ± 0,54	θ	3,3 ± 1,2	4,1 ± 0,3	1,4	3
		PG 1 %	0,021		6,46 ± 0,72	θ	2,0 ± 1,2	4,0 ± 0,3	4,2	3
		PG 5 %	0,056		5,87 ± 0,09	θ	0,9 ± 0,1	4,0	1,0	4
		NMP 0,24 %	0,019 ± 0,009		6,22 ± 0,58	θ	2,0	4,1 ± 0,6	3,4	6
		NMP 1 %	0,062 ± 0,010		5,01 ± 0,55	θ	2,5 ± 1,8	4,4 ± 0,2	1,3	6
		PEG400 0,24 %	0,004 ± 0,002		5,15 ± 1,08	θ	2,5	4,5 ± 0,2	4,4	6
		PEG400 1 %	0,021			θ		4,5	1,1	4
		PEG400 5 %	0,028		4,98 ± 0,58	θ	0,6	4,5 ± 1,1	1,7	6
		NaTC 3 mM	1,9 ± 0,4	0,11 ± 0,03			⊙		5,8 ± 0,1	0,4

COMPUESTO	pK <sub>a</sub>	EXCIPIENTE	S <sub>0</sub> <sup>APP</sup> ± DE	S <sub>0</sub> ± DE	Log K <sub>n</sub> ± DE	tipo	n ± DE	pK <sub>a</sub> <sup>APP</sup> ± DE	GOF	N
		NaTC 15 mM	1,4 ± 0,3	0,10 ± 0,03		●		5,7 ± 0,1	1,0	6
		HP-β-CD 0,24 %	0,34 ± 0,02	0,28 ± 0,02		●		4,6 ± 0,1	0,2	6
		HP-β-CD 1 %	2,9 ± 0,5	0,61 ±		●		5,2 ± 0,1	1,1	6

**[0096]** En la Figura 9, las gráficas de solubilidad en función de log S - pH se muestran en condiciones libres de excipiente. Las curvas discontinuas corresponden a las predicciones efectuadas mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch (utilizando la pK<sub>a</sub> verdadera), y se presentan como una comparación con las curvas representando de manera más precisa la dependencia de solubilidad-pH. La línea horizontal punteada indica la solubilidad intrínseca aparente. La curva continua corresponde al mejor ajuste de los datos reales (círculos rellenos). Las bases estudiadas en la presente memoria tendieron a formar agregados catiónicos (caso 2b), a excepción de butacaína y dipiridamol, que aparentemente formaron agregados neutros (caso 1b de la Figura 8). Los dos ácidos estudiados mayormente forman agregados aniónicos (caso 2a o caso 3a de la Figura 8). No fue posible aplicar el procedimiento de «desplazamiento de pK<sub>a</sub>» a los compuestos no ionizables, por lo que el grado hasta el cual se pueden formar los agregados no se conoce a partir de este estudio.

**[0097]** La glibenclamida de la Figura 9e es un ejemplo del caso 3a en los resultados de no excipiente, puesto que se sugieren agregados mediante el desplazamiento negativo de 1,6 unidades logarítmicas en la pK<sub>a</sub> aparente, y la pendiente unitaria en los datos de pH elevado. Es decir, los datos son coherentes con la formación de dímeros con carga negativa, AH.A-. El clotrimazol (Figura 9c) parece estar compuesto por una combinación de especies B.BH<sup>+</sup> y (BH<sup>+</sup>)<sub>2</sub>, como sugiere el valor de pendiente de n = 1,4. El astemizol (Figura 9a) parece estar compuesto por especies diméricas (n=1,8) (BH<sup>+</sup>)<sub>2</sub>, mientras que el ácido mefenámico (Figura 9f) tiene tanto dímeros como trímeros de este tipo (n=2,6). El dipiridamol y la butacaína representan el comportamiento del caso 1b, donde se forman hipotéticamente agregados sin carga, que elevan la solubilidad aparente por encima del valor esperado si no se formaran agregados, como la que se esperaría de la ecuación HH (curvas discontinuas). Estas dos moléculas son también las más solubles de las moléculas ionizables consideradas. Como se indica en otras fuentes (p. ej. Avdeef A. et al., «Dissolution - Solubility: pH, Buffer, Salt, Dual- Solid, and Aggregation Effects», en: Testa, B. et al., «Comprehensive Medicinal Chemistry II», Vol. 5, ADME-TOX Approaches, Elsevier: Oxford, Reino Unido, 2006), no es posible evaluar el grado de agregación (n) a partir de los datos log S - pH, cuando se indica dependencia de caso 1a o caso 1b.

**[0098]** Es evidente que todos los compuestos mencionados en la presente memoria son poco solubles en tampón libre de excipiente (fila «ninguno» de la Tabla 3), el ácido mefenámico siendo el menos soluble a 21 ± 5 ng/mL. Puede resultar bastante sorprendente que se pueda obtener un valor tan bajo mediante un procedimiento de microvaloración de alto rendimiento. Incluso se podría sugerir que el tiempo de incubación utilizado de 18 horas no implica «alto rendimiento» en absoluto. Pero cabe señalar que, durante un ciclo de trabajo del instrumento de 24 horas, se pueden procesar de cuatro a diez placas de 96 pocillos. Esta característica de funcionamiento en paralelo de la medición robotizada es la que hace que el procedimiento general sea muy rápido. El tiempo de incubación de 18 horas aumenta la probabilidad de que los resultados medidos representen los valores de solubilidad en equilibrio verdaderos del polimorfo más estable del fármaco, y no los valores cinéticos de otros procedimientos rápidos, aquellos basados en el uso de detección de turbidez.

**[0099]** La solubilidad intrínseca de astemizol, clotrimazol y glibenclamida se mide como 0,3 - 0,4 µg/mL (Tabla 3). La solubilidad intrínseca de dipiridamol fue 6,2 ± 1,1 µg/mL. Los compuestos no ionizables, griseofulvina y progesterona, son moderadamente solubles en comparación con los otros compuestos, con valores de 14 - 17 µg/mL. El compuesto estudiado más soluble es la butacaína, con solubilidad intrínseca de 40 ± 6 µg/mL. Es evidente a partir de estas y otras mediciones (más abajo) que la sensibilidad del procedimiento µSOL Evolution llega a la región de nanogramos baja, en parte gracias al software de procesamiento de datos espectroscópicos altamente desarrollado del instrumento Evolution.

**[0100]** También se pueden proporcionar las figuras correspondientes a la Figura 9 y que muestran algunas de las curvas de log S - pH para las moléculas ionizables estudiadas, en una de las concentraciones de excipiente (1 %, 15 mM, o 0,2 M). Los resultados de las otras concentraciones de excipiente consideradas se resumen en la Tabla 2. Además de las curvas de las gráficas libres de excipiente (Figura 9), dichas figuras tienen curvas «discontinua-



punteada-punteada» adicionales que representan las curvas continuas del caso libre de excipiente. Esta curva de referencia permite una evaluación visual rápida del impacto del excipiente en un compuesto en particular.

5 [0101] Con respecto al cloruro de potasio, los patrones generales son similares a los de los casos libres de excipiente (Figura 9). La solubilidad intrínseca aparente de únicamente butacaína y clotrimazol se eleva de manera significativa con KCl a 0,2 M. El astemizol parece mostrar una dependencia del pH más marcada en disoluciones de pH neutro, supuestamente provocada por la formación de agregados de orden superior. El clotrimazol parece mostrar el efecto opuesto: la presencia de concentración de sal elevada parece romper los agregados observados en la disolución libre de excipiente. Su comportamiento en KCl a 0,2 M se predice bien con la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Asimismo, su solubilidad intrínseca aumenta de 0,39 a 3,3 µg/mL. El efecto de KCl a 0,2 M en dipiridamol, glibenclamida y ácido mefenámico parece mínimo. La desviación de puntos de la curva para pH > 6,5 para ácido mefenámico podría deberse a formación de sal.

15 [0102] Con respecto a propilenglicol, los efectos son similares a los producidos por KCl a 0,2 M (Figura 3). El astemizol parece mostrar incluso agregados de orden superior (n=3,6), junto con un leve descenso de solubilidad intrínseca. La solubilidad parece aumentar únicamente en disoluciones de pH bajo para astemizol. La solubilidad intrínseca de clotrimazol aumenta de 0,39 a 2,0 µg/mL.

20 [0103] Con respecto a 1-metil-2-pirrolidona, el orden de agregación disminuye en astemizol y glibenclamida, en comparación con los dos excipientes anteriores mencionados. Los otros efectos son comparativamente inferiores en intensidad. El clotrimazol parece tener una solubilidad mejorada con NMP, como con KCl y PG. El ácido mefenámico responde a NMP con un leve incremento de solubilidad intrínseca.

25 [0104] Con respecto a propilenglicol 400, mientras los tres primeros excipientes mencionados están asociados a efectos débiles, PEG400 tiene un impacto moderado. La constante de unión de agregación en astemizol y clotrimazol (pero no el orden de agregación) aumenta enormemente, como se indica con los cambios pronunciados de las curvas continuas a valores de pH superiores. La agregación en ácido mefenámico parece desaparecer, y la curva presenta un comportamiento HH clásico. La solubilidad intrínseca aparente de los fármacos más solubles, dipiridamol y butacaína, casi duplican los valores mostrados en los tres excipientes anteriores de acción más débil.

30 [0105] Con respecto al taurocolato de sodio, los patrones de efecto para cada uno de los fármacos considerados son notables, con una elevación generalizada de solubilidad, en particular en el caso del ácido mefenámico (Tabla 2). El astemizol se comporta como una molécula clásica que responde a HH, como lo hacen todas las otras moléculas, a excepción de la glibenclamida. La última molécula muestra una dependencia del pH de +0,5, lo cual se puede describir mejor mediante el comportamiento del caso 3ax. Desafortunadamente, no se recogieron datos suficientes en pH alcalino para analizar con mayor profundidad el modelo de agregación. La mayor parte de las moléculas proclives a agregación están fuertemente unidas a micelas de NaTC, aparentemente como monómeros sin carga, cuya dependencia del pH se puede describir mediante la ecuación HH. El análisis de la intensidad de unión aparente se puede describir mediante las ecuaciones del caso 1a o 1b.

35 [0106] Con respecto a la 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, como con la sal biliar, la HP-β-CD al 1 % tiene tendencia a romper los agregados. Si bien las reacciones de solubilidad se representan mediante un modelo de agregación, la asociación es la de formación de complejos. El modelo de agregación sigue siendo conveniente para categorizar los efectos de la solubilidad, con el fin de comparar este con la acción de los otros excipientes con un modelo similar. Tanto la sal biliar como la ciclodextrina tienen un efecto significativo en el aumento de la solubilidad de los fármacos estudiados. Ambos excipientes parecen disminuir la formación de agregados. La glibenclamida todavía tiene la media pendiente de pH singular en la gráfica de solubilidad - pH.

40 [0107] Con respecto al astemizol, la Tabla 2 es una referencia conveniente para comparar los efectos de todos los excipientes en un fármaco en particular. En el caso del astemizol, la solubilidad mejora enormemente con HP-β-CD al 1 % (valor libre de excipiente de 0,29 mg/mL elevado a 12 mg/mL) y también con NaTC a 15 mM. La intensidad de agregación (log  $K_n/n$ ) aumenta más significativamente con PEG400 al 0,24 % y 5 %, sobre valores en disoluciones libres de excipiente. Se observan aumentos menores con PEG400 al 1 % y NMP al 1 %.

45 [0108] Con respecto a la butacaína, se ha de señalar que la butacaína no parece formar agregados cargados. La solubilidad de la molécula más soluble de las consideradas en la presente memoria, aumenta más fácilmente no solo con las dos concentraciones de HP-β-CD, sino también con KCl a 0,1 M, todas las concentraciones de PEG400 (valor libre de excipiente de 40 µg/mL elevado a 152 µg/mL), y con NaTC a 15 mM.

50 [0109] Con respecto al clotrimazol, como con astemizol, los agregados con clotrimazol son ampliamente afectados por los diversos excipientes. La intensidad de la agregación (log  $K_n/n$ ) aumenta significativamente con PEG400 al 0,24 % y 5 %. Las mayores ganancias en solubilidad provienen del uso de NaTC a 15 mM y HP-β-CD al 1 % (valor

55

libre de excipiente de 0,39 µg/mL elevado a 85 µg/mL).

**[0110]** Con respecto al dipiridamol, el efecto reforzador de la agregación de PEG400 se observa con dipiridamol en la concentración baja de excipiente. La solubilidad se eleva a 110 µg/mL desde el valor libre de excipiente 6,2 µg/mL mediante NaTC a 15 mM. Otros excipientes producen efectos significativos en la solubilidad (Tabla 2).

**[0111]** Con respecto a la griseofulvina, los fenómenos de agregación no se pueden indicar mediante el procedimiento de «desplazamiento de  $pK_a$ », puesto que tanto la griseofulvina como la progesterona son no ionizables. El aumento de solubilidad se produce con los excipientes «fuertes»: valor libre de excipiente de 14 mg/mL elevado a 54 mg/mL mediante NaTC a 15 mM. El impacto de los excipientes en la solubilidad de la griseofulvina es relativamente menos drástico que en otros fármacos menos solubles estudiados.

**[0112]** Con respecto a la progesterona, a diferencia de la griseofulvina, la progesterona es afectada en gran medida por la ciclodextrina. Como sucede con la griseofulvina, el aumento de solubilidad se produce con los excipientes «fuertes»: pero el valor libre de excipiente de 17 mg/mL se eleva a 187 mg/mL mediante HP-β-CD al 1 % con progesterona.

**[0113]** Con respecto a la glibenclamida, la intensidad de la agregación con glibenclamida solo se incrementa mediante los excipientes, en especial NaTC a 15 mM. Esto puede constituir un fenómeno de «precipitación salina», que se produce más a menudo con PEG400. Se trata de una observación nueva e inesperada, y requerirá investigación adicional.

**[0114]** Con respecto al ácido mefenámico, que es, con diferencia, el fármaco menos soluble del grupo medido, la mayor mejora en solubilidad se produce con NaTC y HP-β-CD, pero la mayor solubilidad intrínseca conseguida es todavía relativamente baja, inferior a 3 mg/mL. NMP y PEG parecen aumentar la intensidad de agregación ( $\log K_n/n$ ).

**[0115]** Resumiendo, los resultados antes descritos de este ejemplo de medición de solubilidad, no sería sorprendente que los excipientes aumenten la solubilidad de moléculas poco solubles, como se ilustra. Tal vez lo que no se conoce bien es que la medida y naturaleza de dichos efectos se pueden evaluar de manera muy rápida y fiable mediante el instrumento robotizado utilizado. Comparando los resultados a los derivados de procedimientos de matraz de agitación libre de DMSO, los valores parecen ser aceptablemente precisos, a pesar de la presencia de DMSO al 1 % en todas las disoluciones de este estudio. Considerando los efectos de excipientes específicos, tal vez la novedad es que el PEG400 (y en menor medida, el NMP) parecen aumentar la intensidad de la agregación ( $\log K_n/n$ ) de varios fármacos. La naturaleza de las interacciones no se comprende totalmente, pero tal vez es útil considerar el siguiente posible efecto. La intensidad moderada del PEG400 puede no proporcionar un entorno hidrofóbico suficientemente competitivo al cual atraer los fármacos, en comparación con el de la ciclodextrina y el del taurocolato de sodio. No obstante, las moléculas de PEG400 pueden atraer el DMSO al 1 % presente en todas las disoluciones y un poco de agua de solvatación, haciendo que la porción con escaso excipiente de la disolución tampón sea más concentrada en los agregados de fármaco, lo cual produce que sus auto-asociaciones sean más potentes. Desde luego, se utiliza la analogía del efecto de «precipitación salina».

**[0116]** Como se muestra en consecuencia para los resultados de las mediciones de permeabilidad ejemplares anteriores, en la Figura 10 se muestra un esquema de cartografía, denominado cartografía S, que mejora los aspectos visuales de los efectos de los excipientes en la solubilidad, permitiendo una evaluación sistemática precisa. El mapa se puede generar automáticamente mediante software asociado al instrumento de solubilidad utilizado en esta medición de solubilidad. En la Figura 10 se dibujaron relaciones de solubilidad logarítmica intrínseca aparente, con la solubilidad de excipiente dividida por el valor de base libre de excipiente. Dicho mapa de «gradientes» normaliza la solubilidad a patrones de desplazamiento con referencia a la línea de base libre de excipiente. Puesto que el DMSO al 1 % está presente en todas las disoluciones, es de esperar que un mapa de gradientes elimine parte del impacto del DMSO. En la Figura 10, los valores en verde representan los valores de base (no afectados). Los colores cálidos (amarillo a naranja oscuro) representan solubilidad mejorada, y los colores fríos (azul oscuro) se refieren a valores reducidos. A lo largo de los ejes verticales están las composiciones de excipiente, ordenadas por mejora de solubilidad intrínseca promedio decreciente. A lo largo de los ejes horizontales están los fármacos, dispuestos en orden de beneficio decreciente debido a excipientes. La esquina superior izquierda representa la «mejor» combinación de excipientes y compuestos. La esquina inferior derecha representa la «peor» combinación. Con este mapa de Gradientes de Clasificación de Solubilidad-Excipiente, o en su forma abreviada, cartografía S, resultaría muy eficaz reconocer y, por ende, priorizar las combinaciones molécula-excipientes más prometedoras, y estos esquemas de cartografía S se pueden desarrollar rápidamente para grandes cantidades de moléculas, como las que se observan en programas de optimización de descubrimiento de fármacos en compañías farmacéuticas.

**[0117]** Los tres excipientes más útiles en este ejemplo de medición de solubilidad parecen ser HP-β-CD al 1 %, NaTC a 15 mM, y HP-β-CD al 0,24 %. Los excipientes menos eficaces son PEG400 al 0,24 %, KCl a 0,1M, y PG al

0,24 %. A partir de la Figura 10 es posible observar que el clotrimazol, con su traza vertical con un color relativamente «cálido», en general ocupa un lugar alto en la clasificación. La solubilidad no solo mejora con los excipientes fuertes, tales como HP-β-CD al 1 %, también aumenta con excipientes moderados y relativamente débiles, tal como KCl a 0,2 M. Como indica visualmente la cartografía S, la mejora de solubilidad de la progesterona y la griseofulvina es débil y comparable, y estas dos moléculas están clasificadas en la parte derecha del mapa. Únicamente en la parte superior del mapa la progesterona muestra algunos efectos de color cálido, diferenciándose levemente de la griseofulvina.

**[0118]** En la etapa de combinar los resultados de medición de permeabilidad y los resultados de medición de solubilidad en la función de flujo de la primera realización del procedimiento según la invención, se propone combinar de manera lógica las mediciones PAMPA-excipiente como se describe más arriba y las mediciones de solubilidad-excipiente como se describe más arriba en una función de flujo dependiente del pH, representada gráficamente por el novedoso Mapa de Gradientes de Clasificación Biofarmacéutica ordenado. En él, se utilizan ocho fármacos poco solubles (astemizol, butacaína, clotrimazol, dipiridamol, griseofulvina, progesterona, glibenclamida, y ácido mefenámico), medidos en quince combinaciones de seis excipientes (taurocolato de sodio, 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina, cloruro de potasio, propilenglicol, 1-metil-2-pirrolidona, y polietilenglicol 400) como base para ilustrar la metodología de cribado según la invención. Tres moléculas adicionales (albendazol, amiodarona y naproxeno) se caracterizan de manera similar con 2-hidroxiopropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD). Algunos de los resultados de HP-β-CD se comparan con datos *in vivo* disponibles.

**[0119]** Asimismo, se muestra que la Hipótesis de Partición del pH de Brodie clásica, en la actualidad ampliamente aceptada en la investigación farmacéutica, se puede descomponer cuando se consideran fármacos de baja solubilidad y alta permeabilidad, donde el efecto del pH está, en realidad, invertido (es decir, el pH donde el fármaco está más cargado muestra un flujo de absorción mayor que el pH donde el fármaco es más neutro). Este fenómeno se denomina efecto de Antítesis de Partición del pH.

**[0120]** Como base de dicha etapa de combinar los resultados de medición de permeabilidad y los resultados de medición de solubilidad en la función de flujo, con respecto a solubilidad y permeabilidad en la primera ley de Fick, cabe señalar que en condiciones de sumidero (es decir, concentración de la sustancia penetrante nula en el lado aceptor de la barrera de membrana) de estado estacionario (es decir, gradiente de concentración espacial lineal de la sustancia penetrante en la membrana), la primera ley de Fick aplicada a membranas homogéneas se puede formular como

$$J = D_m PC^{APP} C_D / h$$

$$= P_e C_D \quad (27)$$

donde J es el flujo ( $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) de la molécula penetrante,  $D_m$  es la difusividad de la sustancia penetrante ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) en la fase de membrana,  $PC^{APP}$  es el coeficiente de partición (dependiente del pH) aparente de la sustancia penetrante entre la disolución acuosa y la membrana,  $C_D$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) es la concentración de la molécula penetrante en el lado donante de la membrana, h (cm) es el grosor de la membrana, y  $P_e$  ( $\text{cm s}^{-1}$ ) es la permeabilidad «efectiva», un producto de tres parámetros de transporte en la ecuación (3).  $C_D$  equivale a la dosis del fármaco, a menos que la dosis exceda el límite de solubilidad, en cuyo caso equivale a la solubilidad (una disolución «saturada»). Si los efectos tales como la resistencia de la capa límite acuosa (ABL), la formación de agregados y otras complicaciones similares se descuidan, se produce la ecuación HH aplicada a una disolución saturada,

$$\log J_{\text{satd}} = \log P_e + \log S$$

$$= \log [P_o / (10^{\pm(\text{pH} - \text{pKa})} + 1)] + \log [S_o (10^{\pm(\text{pH} - \text{pKa})} + 1)]$$

$$= \log P_o + \log S_o \quad (28)$$

con '+' utilizado para ácidos y '-' para bases.  $P_o$  y  $S_o$  son la permeabilidad y solubilidad intrínsecas independientes del pH. La concentración del fármaco,  $C_D$ , es inferior o igual a la solubilidad, S. Asimismo, la concentración de la especie sin carga,  $C_o$ , es siempre igual o inferior a la solubilidad intrínseca de la especie,  $S_o$ . Según la ecuación (28), el flujo en una disolución saturada es independiente del pH. Por consiguiente, es obvio que la Hipótesis de Partición del pH no es válida en una disolución saturada. No obstante, como se muestra más adelante, el flujo en una disolución saturada puede tener dependencia del pH, pero no necesariamente la predicha por la Hipótesis de la Partición del pH.

**[0121]** La Figura 11 ilustra esta relación de flujo para ácido mefenámico, un fármaco poco soluble, utilizando valores de la bibliografía para permeabilidad y solubilidad intrínsecas, asumiendo que la ecuación de Henderson-Hasselbalch

ideal es válida (es decir, no se forman dímeros o trímeros del soluto, no se produce resistencia de ABL, no hay retención de membrana, etc.). La permeabilidad intrínseca no depende del pH (línea punteada de la Figura 11), pero su cofactor en la ecuación de flujo,  $C_0$ , sí (línea discontinua). En disoluciones parcialmente saturadas ( $\text{pH} < 9$  a dosis clínica de 250 mg), la gráfica de  $\log C_0$  vs.  $\text{pH}$  para una molécula ionizable es simplemente una combinación de segmentos rectos, unidos en un punto de discontinuidad que indica el límite entre el estado saturado y el estado de disolución completa. El  $\text{pH}$  de este punto de unión depende del nivel de dosis utilizado en el cálculo, y el valor máximo de  $\log C_0$  es igual a  $S_0$  en una disolución saturada (ecuación (28)).

**[0122]** La Figura 11 muestra que el  $\log C_0$  (línea discontinua) es una línea horizontal en la disolución saturada ( $\log C_0 = \log S_0$ ), y disminuye con una pendiente de -1 en el dominio de  $\text{pH}$  donde el soluto está completamente disuelto. Al nivel de la dosis clínica, la inflexión calculada es a  $\text{pH}$  9, y a dosis inferiores, el punto está a un  $\text{pH}$  inferior (p. ej., para una dosis de 1 mg, el  $\text{pH}$  crítico cae a 6,5). Solo para dosis inferiores a  $5,3 \mu\text{g} / 250 \text{ mL}$  para ácido mefenámico, la curva de  $\log C_0$  está completamente por debajo del límite de dosis-solubilidad, adoptando una forma hiperbólica. La curva logarítmica de flujo- $\text{pH}$  se indica con la línea continua en la Figura 11, y es la suma de las curvas  $\log P_0$  y  $\log C_0$ . Cabe señalar que la Hipótesis de Partición del  $\text{pH}$  es válida en todo el intervalo de  $\text{pH}$  solo en el caso en donde la dosis es  $< 5,3 \mu\text{g}$ , puesto que no se forma ningún sólido. La Hipótesis de Partición del  $\text{pH}$  es válida en niveles de dosis más altos, pero solo por encima del  $\text{pH}$  donde el sólido se disuelve por completo, en las regiones definidas por las líneas continuas diagonales ( $\text{pH} > 9$  para dosis de 250 mg).

**[0123]** Con respecto a la conversión de datos intrínsecos a condiciones de  $\text{pH}$  5,0,  $\text{pH}$  6,2 y  $\text{pH}$  7,4 intestinales, se utilizaron constantes para convertir los resultados de medición de permeabilidad antes descritos y los resultados de medición de solubilidad antes descritos a las condiciones relevantes para el intestino de utilizar ecuaciones más complejas que la de Henderson-Hasselbalch. Con referencia a la solubilidad, más arriba se describen seis casos diferentes de distorsiones inducidas por agregación de curvas logarítmicas de  $S$ - $\text{pH}$ . Se derivan dos ecuaciones más, y todas las ecuaciones de solubilidad se resumen en la Tabla 1. Estas ecuaciones se utilizan para calcular  $S$  a  $\text{pH}$  5,0, 6,2 y 7,4.

Tabla 4

CASO	REACCIONES DE AGREGACIÓN	ECUACIONES DE SOLUBILIDAD
1A	$n \text{ HA} \rightleftharpoons (\text{HA})_n$	$\log S = \log S_0 + \log (1 + K_a/[\text{H}^+] + n K_n \bullet S_0^{n-1})$
1B	$n \text{ B} \rightleftharpoons (\text{B})_n$	$\log S = \log S_0 + \log (1 + [\text{H}^+]/K_a + n K_n \bullet S_0^{n-1})$
2A	$n \text{ A}^- \rightleftharpoons (\text{A}^-)_n$	$\log S = \log S_0 + \log (1 + K_a/[\text{H}^+] + n K_n^\ominus K_a^n S_0^{n-1}/[\text{H}^+]^n)$
2B	$n \text{ BH}^+ \rightleftharpoons (\text{BH}^+)_n$	$\log S = \log S_0 + \log (1 + [\text{H}^+]/K_a + n K_n^{\oplus} [\text{H}^+]^n S_0^{n-1}/K_a^n)$
3A	$n \text{ A}^- + n \text{ HA} \rightleftharpoons (\text{AH}\cdot\text{A}^-)_n$	$\log S = \log S_0 + \log (1 + K_a/[\text{H}^+] + 2n K_n^* K_a^n S_0^{2n-1}/[\text{H}^+]^n)$
3B	$n \text{ BH}^+ + n \text{ B} \rightleftharpoons (\text{BH}^+\cdot\text{B})_n$	$\log S = \log S_0 + \log (1 + [\text{H}^+]/K_a + 2n K_n^* [\text{H}^+]^n S_0^{2n-1}/K_a^n)$
3AX	$n \text{ A}^- + n \text{ HA} \rightleftharpoons (\text{AH}\cdot\text{A}^-)_n$ & $\text{HA} + \text{X} \rightleftharpoons \text{HA}\cdot\text{X}$	$\log S = \log S_0 + \log (1 + K_a/[\text{H}^+] + 2n K_n^* K_a^n S_0^{2n-1}/([\text{H}^+]^n + K))$
3BX	$n \text{ BH}^+ + n \text{ B} \rightleftharpoons (\text{BH}^+\cdot\text{B})_n$ & $\text{B} + \text{X} \rightleftharpoons \text{B}\cdot\text{X}$	$\log S = \log S_0 + \log (1 + [\text{H}^+]/K_a + 2n K_n^* [\text{H}^+]^n S_0^{2n-1}/(K_a^n + K))$

**[0124]** Con referencia a la permeabilidad, la dependencia del  $\text{pH}$  de la permeabilidad efectiva se describe mediante

$$\frac{1}{P_e} = \frac{1}{P_{ABL}} + \frac{10^{\pm(\text{pH} - \text{p}K_a)} + 1}{P_o} \quad (29)$$

(con '+' utilizado para ácidos, y '-' para bases), donde  $P_{ABL}$  es la permeabilidad de la capa límite acuosa. Para un grosor de AB de  $h$ , (aproximadamente 40 mm en el intestino), la permeabilidad de ABL se puede estimar a partir de

$$P_{ABL} = D_{aq} / h \quad (30)$$

donde  $D_{aq}$  es la difusividad del fármaco en disolución ( $cm^2 s^{-1}$ ), que puede ser aproximada a 25 °C mediante la fórmula basada en peso molecular,  $\log D_{aq} = -4,15 - 0,448 \log PM$  (Avdeef A. et al. «Permeability of Weakly Basic Drugs Predicted with the Double-Sink PAMPA pKaflux Method. Layer», Eur. J. Pharm. Sci., 2005, 24, 333-349). La ecuación (29) y la ecuación (30) se utilizan para convertir la permeabilidad intrínseca en valores efectivos a pH 5,0, 6,2 y 7,4, asumiendo que  $h = 40 \mu m$ .

[0125] En la Tabla 2 se resumen los resultados refinados de este ejemplo de combinar los resultados de medición de permeabilidad y los resultados de medición de solubilidad en la función de flujo, con y sin HP- $\beta$ -CD al 1 %. El resto de los datos utilizados se obtienen del ejemplo de mediciones de permeabilidad descrito más arriba y del ejemplo de mediciones de solubilidad descrito más arriba. Detrás de los valores intrínsecos refinados hay más de 2.400 mediciones de solubilidad y permeabilidad individuales-pH. Los ejemplos de la Tabla 5 muestran que la ciclodextrina reduce la permeabilidad y aumenta la solubilidad, pero los dos efectos no son iguales en magnitud.

Tabla 5

COMPUESTO	pKa	$P_e$ (pH 5,0) ( $cm s^{-1}$ )	$P_e$ (pH 6,2) ( $cm s^{-1}$ )	$P_e$ (pH 7,4) ( $cm s^{-1}$ )	$P_o$ ( $cm s^{-1}$ )	GOF	N
albendazol (tampón)	4,21, 10,43	292	328	330	$4,28 \pm 1,59$ E-04	3,9	6
(tampón + HP- $\beta$ -CD 1 % p/v)		30	31	31	$3,12 \pm 0,30$ E-05	0,7	6
amiodarona (tampón) <sup>b</sup>	9,06	581	1.110	1.180	$13 \pm 3$	2,1	9
(tampón + HP- $\beta$ -CD 1 % p/v)		120	153	156	$5,9 \pm 1,7$	2,8	6
naproxeno (tampón) <sup>c</sup>	4,32	525	58	4	$4,59 \pm 0,58$ E-03	1,8	24
(tampón + HP- $\beta$ -CD 1 % p/v)		68	26	2	$3,02 \pm 0,35$ E-03	1,1	5
		$S$ (pH 5,0) ( $\mu g mL^{-1}$ )	$S$ (pH6,2)( $\mu g mL^{-1}$ )	$S$ (pH 7,4) ( $\mu g mL^{-1}$ )	$S_o^{APP}$ ( $\mu g mL^{-1}$ )		
albendazol (tampón)		1,0	0,89	0,88	$0,88 \pm 0,07$	0,7	5
(tampón + HP- $\beta$ -CD 1 % p/v)		34	34	34	$34 \pm 1$	0,3	12
amiodarona (tampón)		27	1,7	0,11	$0,002 \pm 0,002$	3,1	4
(tampón + HP- $\beta$ -CD 1 % p/v)		4.188*	245*	14,7	$0,186 \pm 0,08$	3,8	23
naproxeno (tampón)		101	1.337	20.893*	$18 \pm 1$	0,8	4
(tampón + HP- $\beta$ -CD 1 % p/v)		182	206	585	$180 \pm 3$	0,5	19

[0126] Con respecto a gradientes de excipiente en mediciones de permeabilidad a pH 5,0, pH 6,2 y pH 7,4, para todas las combinaciones de fármacos y excipientes se calculan a partir de los valores intrínsecos descritos, utilizando la ecuación (29), incluyendo una permeabilidad de ABL correspondiente a una capa de aproximadamente 40 mm de grosor, utilizando la ecuación (30). Se definió un valor de permeabilidad de base a pH 6,2, con un grosor de ABL de 40 mm, y una condición libre de excipiente ( $X=0$ ):  $P_{e,6,2,40}^{X=0}$ . Todos los valores de permeabilidad restantes se dividieron por el valor de base, para obtener las relaciones ( $P_{epH,40}^X/P_{e,6,2,40}^{X=0}$ ). Cuando un excipiente o pH en particular mejora la permeabilidad, la relación calculada es mayor que uno. Cuando la combinación excipiente/pH disminuye la permeabilidad, entonces el factor calculado es inferior a uno.

[0127] El Mapa de Gradientes de Clasificación PAMPA-Excipiente-pH, mostrado en la Figura 12a, es una gráfica

de formas ordenada de valores logarítmicos ( $P_{e,pH,40^X}/P_{e,6,2,40^{X=0}}$ ). Hay 360 gradientes representados en la Figura 2a. Los gradientes por encima de cero indican mejora de la permeabilidad, y se representan mediante colores cálidos (naranja, rojo). Los gradientes por debajo de cero en el mapa indican permeabilidad disminuida por excipiente/pH, y se representan mediante colores fríos (verde oscuro, azul oscuro). En este mapa, el amarillo indica el nivel de línea de base, donde los gradientes son nulos. La gráfica está ordenada según gradientes de flujo, descritos más adelante.

**[0128]** A partir del Mapa de Gradientes de Clasificación PAMPA-Excipiente-pH de la Figura 12a, se pueden reconocer ciertas tendencias muy rápidamente. Las regiones «frías» de color azul oscuro (permeabilidad disminuida) son mayormente asociadas a butacaína y dipiridamol con NaTC a 15 mM, pH 5, para la mayor parte de los excipientes. Las zonas «calientes» (permeabilidad mejorada) son con disoluciones de pH bajo para los dos ácidos, glibenclamida y ácido mefenámico, y para butacaína de pH 7,4. Asimismo, progesterona, griseofulvina y astemizol de pH 7,4 son «cálidos» con varios excipientes.

**[0129]** En cuanto a los gradientes en micro-mediciones de solubilidad a pH 5,0, pH 6,2 y pH 7,4, todas las combinaciones de fármacos y excipientes se calculan a partir de las constantes de agregación y solubilidad intrínseca, utilizando las ecuaciones de la Tabla 4. Se definió un valor de solubilidad de base a pH 6,2, en condición libre de excipiente ( $X=0$ ):  $S_{6,2}^{X=0}$ . Todos los valores de solubilidad restantes se dividen por el valor de base, para obtener las relaciones ( $S_{pH^X}/S_{6,2}^{X=0}$ ). Cuando un excipiente o pH en particular que no sea 6,2 mejora la solubilidad, la relación calculada es mayor que uno. Cuando la combinación excipiente/pH disminuye la solubilidad, entonces el factor calculado es inferior a uno.

**[0130]** El Mapa de Gradientes de Clasificación de Solubilidad-Excipiente-pH, mostrado en la Figura 12a, es una gráfica de formas ordenada de valores logarítmicos  $g$  ( $S_{pH^X}/S_{6,2}^{X=0}$ ). Hay 360 gradientes representados en la Figura 12b. Los gradientes por encima de cero indican mejora de la solubilidad, y se representan mediante colores cálidos (naranja, rojo). Los gradientes por debajo de cero en el mapa indican solubilidad disminuida por excipiente/pH, y se representan mediante colores fríos (verde oscuro, azul oscuro). En este mapa, el verde claro indica el nivel de línea de base, donde los gradientes son casi nulos. La gráfica está ordenada según gradientes de flujo, descritos más adelante.

**[0131]** A partir del Mapa de Gradientes de Clasificación de Solubilidad-Excipiente-pH de la Figura 12b, se pueden reconocer ciertas tendencias muy rápidamente. Las bandas «frías» de color azul oscuro (solubilidad disminuida) están mayormente asociadas a glibenclamida y ácido mefenámico de pH bajo, y con butacaína y astemizol de pH 7,4. Las zonas «calientes» (solubilidad mejorada) son con clotrimazol y dipiridamol de pH bajo, y disoluciones de glibenclamida de pH 7,4. Griseofulvina, progesterona, ácido mefenámico de pH 7,4, butacaína de pH 5 y astemizol muestran valores de solubilidad inalterados por el excipiente. Puesto que el DMSO al 1 % está presente en todas las disoluciones, es de esperar que un mapa de gradiente elimine parte del impacto del DMSO.

**[0132]** Además, se consideran los efectos de las sales en los que los fármacos seleccionados tienen valores de solubilidad intrínseca muy bajos, teniendo el ácido mefenámico un valor intrínseco de 21 ng/mL. Sin embargo, si la  $pK_a$  de una molécula dista del intervalo fisiológico de 5 - 7,4, la dependencia del pH descrita por las ecuaciones de la Tabla 4 puede elevar la solubilidad a valores altos en la región de pH neutro (p. ej., amiodarona y naproxeno, Tabla 5). La formación de agregados cargados hace que la dependencia del pH sea más marcada. Con la aparición de especies cargadas, la solubilidad aumenta, pero no indefinidamente. Con algún valor de solubilidad aparente elevado, se excederá el producto de solubilidad de una sal formada entre el fármaco cargado y uno de los contraiones presentes en la disolución, y una forma salina del fármaco cargado precipitará. Las concentraciones más elevadas utilizadas (100-200  $\mu$ M) están, por lo general, por debajo del nivel de precipitación salina, a excepción del ácido mefenámico con  $pH > 7$ , como se indica más arriba. La suposición razonable es que el comienzo de la precipitación salina está tres órdenes de magnitud por encima del valor de solubilidad intrínseca hallado en el caso libre de excipiente. Esto se denominaba aproximación «sdiff 3-4» (Avdeef A., «Absorption and Drug Development - Permeability, Solubility, Charge State», Wiley-Interscience, 2003, pág. 116-246). La premisa de trabajo es que, aunque esta sea una aproximación incierta, es mejor aprovecharla que ignorar la formación de sal por completo, lo cual atenuaría la solubilidad.

**[0133]** Por ejemplo, la solubilidad intrínseca de naproxeno fue de 18  $\mu$ g/mL en este estudio. Según la aproximación «sdiff 3-4», sería esperable ver la formación de precipitación salina en disoluciones de pH elevado, si la solubilidad calculada (ecuaciones de la Tabla 1) fuera a exceder 18 mg/mL. Utilizando la ecuación HH, el valor calculado de solubilidad libre de excipiente a pH 7,4 es 20,9 mg/mL. En la Tabla 2, el valor de pH 7,4 del naproxeno se marca con un asterisco, para indicar que se excede el límite de sal de 18 mg/mL anticipado.

**[0134]** Utilizando esta aproximación «sdiff 3-4», los límites de sal para los fármacos ionizables en este estudio son 288  $\mu$ g/mL para astemizol, 39,8 mg/mL para butacaína, 389  $\mu$ g/mL para clotrimazol, 347  $\mu$ g/mL para glibenclamida, y 21  $\mu$ g/mL para ácido mefenámico. Con estos límites, se predijo que el astemizol mostraría precipitación salina a pH

5 y 6,2, para todos los excipientes, y a pH 7,4 para PEG400. Se esperó que la butacaína a pH 5 mostrara precipitación salina. Se esperó que el clotrimazol a pH 5 con PEG400 al 0,24 y 1,0 % produjera precipitación salina. Se esperó que la glibenclamida y el ácido mefenámico a pH 7,4 produjeran precipitación salina para varios de los excipientes. Asimismo, se esperó que el ácido mefenámico a pH 6,2 en KCl a 0,1 M y HP- $\beta$ -CD al 1 % precipitara como las sales.

5 **[0135]** Los límites de sal se incorporaron en el Mapa de Gradientes de Clasificación de Solubilidad-Excipiente-pH de la Figura 12b.

10 **[0136]** Como se observa en las Figuras 12a y 12b, los dos mapas de clasificación precedentes son, en gran medida, opuestos entre sí. Las regiones de colores cálidos en uno se corresponden con regiones de colores fríos en el otro. En general, esto es de esperar, puesto que la dependencia del pH de la permeabilidad y de la solubilidad son inversamente proporcionales, según la ecuación HH simple (ecuación (28)). En las porciones de disolución saturada de la Figura 11 (pH < 9), utilizando la ecuación HH simple, el flujo es independiente del pH, puesto que las ganancias de una propiedad son completamente compensadas por las pérdidas de la otra. No es suficiente utilizar una u otra propiedad a optimizar la absorción de fármaco, que es una propiedad relacionada con el flujo. La permeabilidad y la solubilidad, cuando se las combina, pueden satisfacer las necesidades de optimización, aunque esto rara vez se lleva a cabo en la práctica diaria de la industria farmacéutica. Los biólogos son los que a menudo llevan a cabo la medición de permeabilidad (celular). Los químicos físicos son los que a menudo llevan a cabo la medición de solubilidad. Por lo general, los dos grupos están ubicados en edificios distintos, y las dos mediciones a veces se realizan en momentos muy distintos. La integración coherente de los dos grupos de mediciones es, a veces, una tarea desalentadora. Los esfuerzos tempranos de centrar la atención en la unión lógica de las dos propiedades dieron como resultado las funciones AP (Dressman J.B. et al., «Absorption potential: estimating the fraction absorbed for orally administered compounds», J. Pharm. Sci., 1985, 74, 588-589) y MAD (Johnson K. et al., «Guidance in the setting of drug particle size specifications to minimize variability in absorption», Pharm. Res. 1996, 13, 1795-1798; Curatolo W., «Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings», Pharm. Sci. Tech. Today, 1998, 1, 387-393; y Avdeef A. et al., «HT Solubility and Permeability: MAD-PAMPA Analysis» en: Kramer S.D. et al., «Physicochemical and Biological Profiling in Drug Research», Wiley-VCH: Weinheim, 2006), y la BCS (Amidon G.L. et al., «A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability», Pharm. Res., 1995, 12, 413-420; y «Guidance for Industry, Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System», FDA, Washington, D.C., Estados Unidos, agosto, 2000). En la presente memoria se propone una función de unión, para tener en cuenta en la optimización de la absorción, denominada Cartografía BCG. Como se hace en nuestras mediciones de permeabilidad-excipiente y las mediciones de solubilidad-excipiente, se propone el esquema de cartografía de la Figura 12c, utilizando los Mapas de Gradientes de Clasificación Biofarmacéutica, como el que se ilustra en la Figura 12c. Estos se diseñan para mejorar el aspecto visual del excipiente y todos los demás efectos (resistencia de ABL, retención de membrana, agregación, formación de complejo, pH, y una multitud de otros efectos atenuantes de HH) en la función de flujo, permitiendo una evaluación sistemática precisa. El mapa se puede generar de forma automática mediante el software ELM de la compañía pION asociado con los instrumentos de solubilidad y PAMPA utilizados más arriba. En la Figura 12c se representan las sumas de los dos mapas precedentes (ecuación (29) así como las Figuras 12a y 12b):  $\log(P_{e,pH,40}/P_{e,6,2,40}^{X=0}) + \log(S_{pH^X}/S_{6,2}^{X=0})$ . Dicho mapa de «gradientes» normaliza los valores de flujo a patrones de desplazamiento con referencia a la línea de base de pH 6,2 libre de excipiente. En la Figura 12c, los valores en verde representan los residuos de base (cero). Los colores cálidos (amarillo a naranja oscuro) representan flujo mejorado, y los colores fríos (azul oscuro) se refieren a valores reducidos. A lo largo de los ejes verticales están las composiciones de excipiente, ordenadas por mejora de flujo promedio decreciente, teniendo en cuenta todos los fármacos en los tres valores de pH de interés. A lo largo de los ejes horizontales están los fármacos, dispuestos en orden de beneficio decreciente debido a excipientes al promedio de las tres condiciones de pH. La esquina superior izquierda representa la combinación de excipientes y compuestos de «mayor beneficio». La esquina inferior derecha representa la combinación de «menor beneficio». Esta Cartografía BCG resulta muy eficaz para reconocer y, por ende, priorizar las combinaciones molécula-excipiente más prometedoras, y estos esquemas de cartografía se pueden adquirir rápidamente para grandes cantidades de moléculas, para usar en programas de optimización de descubrimiento de fármacos en compañías farmacéuticas. El orden basado en el mapa de flujo se aplica a los otros dos mapas, para poder realizar comparaciones directas más fácilmente.

55 **[0137]** Los tres excipientes más útiles en esta primera realización del procedimiento según la invención parecen ser HP- $\beta$ -CD al 0,24 % y 1 %, y NaTC a 3 mM. De manera sorprendente, NaTC a 15 mM se sitúa en la posición más baja, debido a su tendencia general y potente a atenuar la permeabilidad (Figura 12a), no compensada por completo por las ganancias en solubilidad (Figura 12b). Otros excipientes menos eficaces son PEG400 al 0,24 % y 1 %, KCl a 0,1 M y PG al 1 %. Estos excipientes caen por debajo de la posición libre de excipiente «ninguno» de la Figura 12c.

60 **[0138]** A partir de la Figura 12c, es posible observar que el clotrimazol, con su traza vertical con un color relativamente «cálido» en el mapa en disoluciones ligeramente ácidas, ocupa el puesto más alto en la clasificación.

La solubilidad no solo mejora con los excipientes potentes, tales como HP- $\beta$ -CD al 1 %, también aumenta con excipientes moderados y relativamente débiles, tal como KCl a 0,2 M. Asimismo, varios de los excipientes elevan los valores de permeabilidad (Figura 12a). Como es posible observar en la Cartografía BCG, la mejora de flujo de la glibenclamida, ácido mefenámico, butacaína y astemizol es débil en diversas condiciones de pH, lo cual indica que la

5 baja solubilidad (azul oscuro en la Figura 12b) es compensada, en parte, pero no por completo, por la permeabilidad mejorada (naranja en la Figura 12a). Pero hay una serie de «islas cálidas», p. ej. glibenclamida a pH 7,4 para varios excipientes, ácido mefenámico a pH 7,4 con PEG400 al 0,24 %, ácido mefenámico a pH 6,2 con KCl a 0,1 M, etc.

**[0139]** Con respecto a los efectos de HP- $\beta$ -CD, la ciclodextrina ofreció el mayor beneficio general a los fármacos poco solubles de este grupo. Se generan datos de HP- $\beta$ -CD en tres compuestos adicionales en la primera realización del procedimiento según la invención. La Figura 13 muestra los efectos de flujo neto debido a HP- $\beta$ -CD al 1 % para once compuestos. En general, la permeabilidad disminuye con los excipientes, y la solubilidad aumenta con los excipientes. No obstante, el equilibrio de los dos efectos es sutil y podría inclinar el efecto neto en cualquier dirección. La Figura 13 muestra diversos ejemplos de ganancia neta y pérdida neta. El albendazol (Figura 13a) gana, de manera

10 uniforme en los tres valores de pH de interés, como resultado del excipiente, principalmente porque la ganancia en solubilidad no fue compensada por completo por la pérdida en permeabilidad. La butacaína (Figura 13d) pierde en todos los valores de pH, porque la pérdida en permeabilidad no se recuperó, puesto que la HP- $\beta$ -CD al 1 % no mejora la solubilidad en pH fisiológico en ninguna medida significativa. Ocurre algo similar con naproxeno (Figura 13j). El ácido mefenámico es un ejemplo de un efecto cruzado en pH. En disoluciones ácidas, HP- $\beta$ -CD al 1 % contribuye en el flujo, pero en disoluciones neutras, hay una pérdida neta debido a la presencia de excipiente. El dipiridamol (Figura

15 13f) muestra ganancias y pérdidas que se cancelan precisamente, y el flujo permanece no afectado por el excipiente. Si la predicción de absorción oral se basara únicamente en solubilidad, se habría llevado a cabo la clasificación falso-positivo inapropiada. O la clasificación habría sido falso negativo, si solo la permeabilidad se hubiera utilizado en la decisión.

**[0140]** El caso de la amiodarona es difícil de determinar con seguridad en el presente estudio. La solubilidad intrínseca es tan baja, que la aproximación «sdiff 3-4» impone un «techo» de sal relativamente bajo en las curvas de solubilidad, el mismo para todas las condiciones, a excepción de libre de excipiente a pH 7,4 (Figura 13b). Las pérdidas en permeabilidad esperadas debidas al excipiente no se recuperan bien en el flujo neto, que tiene un patrón

20 cruzado como función de pH.

**[0141]** Con respecto a la antítesis de partición del pH, la Hipótesis de Partición del pH (Shore P.A. et al., «The gastric secretion of drugs: a pH Partition Hypothesis», J. Pcol. Exp. Therap. 1957, 119, 361-369) sugiere que el ácido mefenámico y la glibenclamida deberían ser mejor absorbidos en pH ácido, puesto que ese es el pH en el cual las moléculas están menos cargadas. Por el contrario, clotrimazol, dipiridamol, butacaína y astemizol deberían ser mejor absorbidos en disoluciones ligeramente alcalinas, puesto que, en esas condiciones, las bases débiles están menos cargadas. No obstante, un análisis rápido de la Figura 12c muestra tendencias precisamente opuestas para estas moléculas. Esto es especialmente evidente para clotrimazol, el «vencedor del juego de los excipientes». La secuencia de cuadros de la Figura 14, basados en ácido mefenámico y por debajo de la dosis clínica, intentará aclarar este resultado sorprendente y desafiante de nuestro estudio.

35

**[0142]** La Figura 14a representa la situación ideal, donde se supone que dichas «anomalías» como la resistencia de ABL a permeabilidad, la retención de compuesto por la membrana, la formación de agregados o complejos, la formación de estructuras de tipo micela, la precipitación de sales, etc. están ausentes, pudiéndose entonces aplicar la ecuación respetable de Henderson-Hasselbalch. En la Figura 14a se muestra una dosis clínica de ácido mefenámico de 250 mg. La dependencia del pH de la permeabilidad es un reflejo de la dependencia del pH de la solubilidad, de modo que una cancela la otra en el flujo, un producto de los dos componentes. De este modo, la observación más simple es que la absorción no debería depender del pH, lo que conduce a la noción trivial pero tentadora de que conocer la  $pK_a$  no es muy importante en la predicción de la absorción. Obsérvese que se incumple la Hipótesis del pH, puesto que no hay dependencia del pH en el flujo.

45

**[0143]** La Figura 14b muestra el mismo cálculo sumamente idealizado, pero en un nivel de dosis subclínico de 1 mg. La diferencia respecto del caso anterior es que por encima de pH 6,5, el compuesto se disuelve por completo, y la concentración de fármaco en la disolución se vuelve constante, a 1 mg / 250 mL (17  $\mu$ M). Sin el precipitado, la función de flujo adquiere una dependencia del pH (Figura 14b). En la región de pH > 6,5, la Hipótesis de Partición del pH clásica es válida.

50

**[0144]** Las Figuras 14c y 14d muestran los dos casos anteriores en paralelo, con solo una «anomalía»: la resistencia de la capa límite acuosa añadida al modelo de permeabilidad. Como se puede observar en las Figuras 14c,d, la parte superior de la curva de permeabilidad desciende por el grado de resistencia impuesto por la ABL, cuyo grosor aproximado es 40  $\mu$ m, imitando el esperado en el tracto gastrointestinal (Avdeef A. , «Absorption and Drug Development - Permeability, Solubility, Charge State», Wiley-Interscience, 2003, pág. 116-246). El efecto de ABL

60



añadido hace que la función de flujo se vuelva puramente sigmoideal en la Figura 14c. Es notable que la dependencia del pH es contraria a la esperada de la hipótesis de Brodie. En una dosis subclínica (Figura 14d), para pH > 6,5, la Hipótesis de Partición del pH es válida, pero por debajo de dicho pH, la hipótesis se invierte, y este efecto se denomina Antítesis de Partición del pH en la presente memoria.

[0145] Las Figuras 14e y 14f introducen una «anomalía» adicional, la de la agregación, que se observó para ácido mefenámico, donde se proponen dímeros y trímeros aniónicos para explicar la curva de solubilidad-pH (véase más arriba). El efecto de agregados cargados invierte sustancialmente la hipótesis de Brodie clásica. Puesto que la solubilidad aumenta en la región donde el ácido mefenámico está cargado (debido a la formación de agregados aniónicos), la región de pH > 7 muestra cumplimiento de la Hipótesis de Partición del pH, incluso por debajo del nivel de dosis clínica de 250 mg. Una dosis subclínica (Figura 14f) solo desplaza el patrón de Brodie al pH inferior 6.

[0146] Las Figuras 14g y 14h añaden el efecto del excipiente (HP-β-CD al 1 %) al caso de la Figuras 14e y 14f. Al parecer, el efecto anti-Brodie se vuelve nulo, puesto que la ciclodextrina parece romper los agregados (Figuras 14e y 14g). Por debajo de la dosis subclínica, la Hipótesis de Partición del pH surge perfectamente por primera vez en los ejemplos.

[0147] Las bases para comparar los resultados de la primera realización del procedimiento según la invención con datos de biodisponibilidad *in vivo*, la biodisponibilidad de glibenclamida analizada en perros y que se descubrió es significativamente aumentada por la formación de complejos de ciclodextrina debajo de la media, así como la biodisponibilidad de albendazol en ratones, con y sin HP-β-CD, demostraron que C<sub>max</sub> y AUC<sub>0-∞</sub> son significativamente mayores con ciclodextrina que con una suspensión de fármaco libre de excipiente. La Tabla 3 resume los parámetros de los dos estudios farmacocinéticos (PK).

**Tabla 3**

COMPUESTO	C <sub>max</sub> (µg/mL)			T <sub>max</sub> (mín)			AUC (µg/mín/mL)			Ref.
	no excip.	+ HP-β-CD	Relación	no excip.	+ HP-β-CD	Relación	no excip.	+ HP-β-CD	Relación	
albendazol (20 % p/v)	0,09	0,39	4,3	45	19,8	0,4	0,0122	0,0165	1,4	33
glibenclamida (cápsulas de gel, 200 mg/kg)	0,0839	0,61	7,3	270	150	0,6				32

[0148] La Figura 13a y la Figura 13g muestran la función de flujo a pH 5 - 7,4 para albendazol y glibenclamida. Estas cifras muestran que HP-β-CD al 1 % en efecto aumenta los valores de flujo logarítmicos, pero el patrón de pH de los efectos es diferente, mostrando la glibenclamida un patrón sustancialmente más complicado. El flujo aumenta en valores de 3,0, 3,1, y 3,1 para pH 5,0, 6,2, y 7,4, respectivamente, para albendazol, indicando una ganancia promedio en un factor de 3,1. Para glibenclamida, el flujo correspondiente aumenta en factores de 20,1 a pH 5,0, 4,3 y 6,2, pero disminuye en un factor de 3 a pH 7,4, produciendo una ganancia general promedio de 3,1. La Tabla 4 muestra que las relaciones de ganancia C<sub>max</sub> para albendazol y glibenclamida son 4,3 y 7,3 respectivamente. Parece que los gradientes de flujo indicados y los hallados en los estudios PK se pueden comparar de manera favorable.

[0149] Una segunda realización del procedimiento según la invención combina cambios tanto en permeabilidad como en solubilidad para monitorizar el efecto de excipientes en el potencial de absorción de compuestos sin determinar explícitamente la permeabilidad y solubilidad como entidades separadas. Esto hace que la segunda realización del procedimiento según la invención sea particularmente rápida. Comprende monitorizar el cambio en concentración de los compuestos estudiados que aparecen en una cámara receptora de un sistema de permeación de dos cámaras, estando las dos cámaras divididas por una barrera lipofílica, a la vez que se varían los componentes de excipientes (tipo y/o concentración) en una cámara donante. La barrera puede constituir una membrana artificial (p. ej., un filtro impregnado con una disolución lipofílica, es decir, el modelo del ensayo PAMPA), células endoteliales cultivadas (p. ej., RBE4), u otros modelos de cultivos celulares (p. ej., Caco-2, MDCK, etc.). La consideración del grosor de la capa límite acuosa relevante desde el punto de vista biológico y el pH también se tienen en cuenta.

[0150] En la Figura 1 se muestra un diagrama de la segunda realización del procedimiento según la invención. Los compuestos se presentan como disoluciones de DMSO con una concentración de alrededor de 10 mM. Se diluyen adicionalmente en un tampón acuoso universal y se ajustan a pH 5,0, 6,2, y 7,4 con NaOH a 0,5 M. La cantidad

original de DMSO en la disolución acuosa es 0,5 % v/v. La mayor parte de los compuestos son insolubles en agua, donde forman disoluciones saturadas con presencia de precipitación. La concentración calculada de los compuestos en el tampón es de alrededor de 50  $\mu\text{M}$ , pero debido a la precipitación, las concentraciones reales en los medios acuosos deben ser inferiores, y se desconocen. Las disoluciones saturadas (no filtradas) se transfieren al compartimento donante del sándwich PAMPA precargadas con agitadores magnéticos. El filtro de la placa de filtro PAMPA (el compartimento aceptor del sándwich PAMPA) está cubierto de lípido de TGI y relleno con tampón de sumidero aceptor (ASB, por su sigla en inglés). El ASB constituye una disolución acuosa tamponada a pH 7,4 con una mezcla de tensioactivos añadida (sumidero químico) imitando las propiedades de unión de proteínas en el flujo sanguíneo (Double-Sink™ PAMPA). En el ensayo se utiliza agitación enérgica, y la velocidad de agitación se programa para producir un grosor de capa límite acuosa (ABL) de alrededor de 40  $\mu\text{m}$ , y así coincidir con las condiciones de ABL en el TGI. El sándwich PAMPA se monta y se deja incubar durante 30 minutos en una cámara de ambiente controlado con un mecanismo de agitación magnética incorporado. A continuación, el sándwich se separa, y los pocillos receptores se analizan y sus espectros UV se recogen en el espectrofotómetro UV (230 a 500 nm) Este proceso se muestra de manera esquemática a la izquierda de la Figura 15.

**[0151]** Luego, la configuración se repite con la única diferencia de que la disolución donante contenía excipiente además del compuesto. Esto se muestra de manera esquemática en la parte derecha de la Figura 15.

**[0152]** Cabe señalar que la agitación desempeña un papel vital en la configuración de la segunda realización del procedimiento según la invención. De lo contrario cualquier cambio en la permeabilidad de compuestos de baja solubilidad será sobrepasado por la resistencia de la ABL y, por ende, no se podrá detectar.

**[0153]** Al final del ensayo, la zona debajo de la curva (AUC, por sus siglas en inglés) del espectro UV del compartimento receptor del sándwich PAMPA que contiene excipiente en los pocillos donantes se divide por la AUC correspondiente del sándwich PAMPA sin excipiente. La relación resultante (Efecto de Excipiente) indica si el excipiente añadido al compartimento donante ayudó a mejorar las propiedades de absorción.

**[0154]** Si bien el procedimiento se lleva a cabo utilizando el ensayo PAMPA como el sistema de permeabilidad, se puede adoptar fácilmente para modelos de permeabilidad celular (p. ej., Caco-2, MDCK, etc.) En realidad, este ensayo se puede considerar como la primera aproximación a estudios de pre-formulación PK de alto rendimiento *in vitro*. De hecho, en estudios PK *in vivo*, cambiando la formulación del fármaco y monitorizando una concentración contra perfil de tiempo en el flujo sanguíneo, un investigador no sabe directamente la influencia de solubilidad o permeabilidad por separado en el efecto final, sino que lo que importa es el aumento o disminución en la concentración del ingrediente activo en el flujo sanguíneo.

**[0155]** En cuanto a los fármacos y sustancias químicas utilizados, los compuestos empleados son astemizol, butacaína, clotrimazol, dipiridamol, progesterona, glibenclamida y ácido mefenámico. El lípido de Double-Sink™ PAMPA de la compañía pION (PN 1100669), se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  cuando no se utiliza. El pH de las disoluciones donantes analizadas se ajusta con tampones universales de la compañía pION (PN 100621, 1100151), y la disolución tampón a pH 7,4 que contiene un eliminador de sustancias químicas para simular proteínas séricas se utiliza como la disolución receptora. Los excipientes se añaden solamente a los pocillos donantes.

**[0156]** Con respecto a las concentraciones de excipiente, con fines demostrativos, se identifica un subgrupo de excipientes de la primera realización del procedimiento según la invención descritos más arriba. Las cantidades de los cuatro excipientes se seleccionan para superponer las concentraciones esperadas en el fluido gastrointestinal en condiciones clínicamente relevantes. Para KCl, se selecciona la concentración de 0,2 M, según su concentración en medios FASSIF/FESSIF. Para propilenglicol (PG), 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD), y polietilenglicol 400 (PEG400), se eligen disoluciones de excipiente con concentración 1 % v/v para demostrar el procedimiento.

**[0157]** Hay tres casos distintos que evolucionan como un resultado de la segunda realización presentada del procedimiento según la invención:

Caso 1 - efecto de excipiente  $\sim 1$  o  $\log(\text{efecto de excipiente}) \sim 0$ : Este resultado significa que la concentración receptora es la misma independientemente de si el excipiente X está presente en el compartimento donante o no. Para compuestos poco solubles esto significa que o bien el excipiente no mejora la solubilidad o que una disminución en la permeabilidad del compuesto compensa el aumento en solubilidad.

Caso 2 - efecto de excipiente  $< 1$  o  $\log(\text{efecto de excipiente}) < 0$ : Esta situación podría significar que o bien la ganancia en solubilidad es menor que la pérdida de permeabilidad debido a la presencia de excipiente X o que el compuesto es completamente soluble con o sin excipiente X y que una disminución de permeabilidad es el efecto dominante. El resultado para butacaína a pH 5,0 demuestra esta situación. Se sabe de la primera realización del procedimiento según la invención que la solubilidad de la butacaína en tampón acuoso a pH 5,0 es mucho mayor que 50  $\mu\text{M}$ . Por

5 consiguiente, no es de sorprender que el comportamiento de absorción para este compuesto a pH 5,0 se rija por la permeabilidad y que la presencia del excipiente en el compartimento donante disminuya la permeabilidad de la butacaína. La segunda realización del procedimiento de la invención permite la detección de este comportamiento sin mediciones separadas de las constantes de solubilidad y permeabilidad, pero mediante comparación simple de las concentraciones de compuesto (absorbancia de UV) en los compartimentos receptores.

10 Caso 3 - efecto de excipiente  $> 1$  o  $\log(\text{efecto de excipiente}) > 0$ : Este resultado indica el resultado de la combinación fármaco-excipiente más prometedora. Cuanto mayor es esta relación, más eficaz es el excipiente X al mejorar las propiedades de absorción del compuesto estudiado.

[0158] A pesar de que la segunda realización del procedimiento según la invención se basa en un punto de tiempo, un experto en la técnica puede ajustarlo fácilmente de modo que el efecto de excipiente se calcule para distintos puntos de tiempo imitando un estudio farmacocinético *in vivo*.

15 [0159] Si bien el procedimiento según la invención se describe con las realizaciones ejemplares mencionadas más arriba, también son concebibles otras realizaciones alternativas del procedimiento según la invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para la evaluación del efecto de excipientes, pH y combinaciones de estos en las propiedades de absorción predichas de compuestos de baja solubilidad, comprendiendo el procedimiento la etapa de evaluar un cambio en una función de flujo para una combinación de un compuesto de baja solubilidad y un excipiente, correspondiendo la función de flujo a partículas o materia que pasan una barrera por unidad de superficie y unidad de tiempo, en el que la barrera se selecciona del grupo compuesto por tejidos humanos, tejidos animales, tejidos vegetales, modelos de cultivos celulares, y membranas artificiales, y en el que evaluar el cambio de la función de flujo comprende la etapas de:
- 10 a. preparar una disolución donante de calibración a un valor de pH predefinido que comprende el compuesto;  
 b. preparar una disolución donante a un valor de pH predefinido que comprende el compuesto y el excipiente;  
 c. preparar una disolución receptora al valor de pH predefinido libre del compuesto y el excipiente;  
 15 d. proporcionar la disolución donante de calibración en una primera cámara donante separada de una primera cámara receptora mediante la barrera, proporcionar la disolución donante en una segunda cámara donante separada de una segunda cámara receptora mediante la barrera, y proporcionar la disolución receptora en la primera y segunda cámara receptora;  
 e. incubar dichas disoluciones durante un periodo de tiempo predefinido; y  
 20 f. medir la respuesta del compuesto en la disolución receptora de la primera y la segunda cámara receptora, en la que medir la respuesta del compuesto en la disolución receptora de la primera y la segunda cámara receptora comprende la medición de propiedades espectroscópicas de la disolución receptora, llevando a cabo de manera reiterada las etapas (a) a (f) a una pluralidad de valores de pH predefinidos, y determinando una relación entre la medición respectiva de la respuesta del compuesto en la disolución receptora de la primera cámara receptora y la medición correspondiente de la respuesta del compuesto en la disolución receptora de la segunda cámara receptora.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que evaluar el cambio de la función de flujo se lleva a cabo para una pluralidad de compuestos de baja solubilidad y una pluralidad de excipientes mediante las siguientes acciones:
- 30 preparar una pluralidad de disoluciones donantes al valor de pH predefinido que comprende cada combinación de cada uno de la pluralidad de compuestos y cada uno de la pluralidad de excipientes;  
 proporcionar la pluralidad de disoluciones donantes en una pluralidad de segundas cámaras donantes separadas de una pluralidad de segundas cámaras receptoras mediante la barrera y proporcionar la disolución receptora en la pluralidad de segundas cámaras receptoras; y medir la respuesta del compuesto en la disolución receptora de la pluralidad de segundas cámaras receptoras.
- 35 3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la disolución receptora comprende al menos un aditivo.
- 40 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el aditivo tiene al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo de alta capacidad de unión para el compuesto, baja absorción de luz ultravioleta, alta solubilidad en agua y baja presión de vapor.
- 45 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la etapa de agitar la disolución donante de calibración y la disolución donante.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende las etapas de:
- ordenar las relaciones por excipiente, compuesto y valor de pH; y  
 50 visualizar las relaciones ordenadas.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el orden de las relaciones comprende las etapas de:
- calcular sumas de relaciones para cada excipiente para todos los compuestos y todos los valores de pH; y ordenar las sumas de relaciones.
- 55 8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además las etapas de:
- calcular sumas de relaciones adicionales para cada compuesto para todos los excipientes y todos los valores de pH; y ordenar las sumas de relaciones adicionales.
- 60

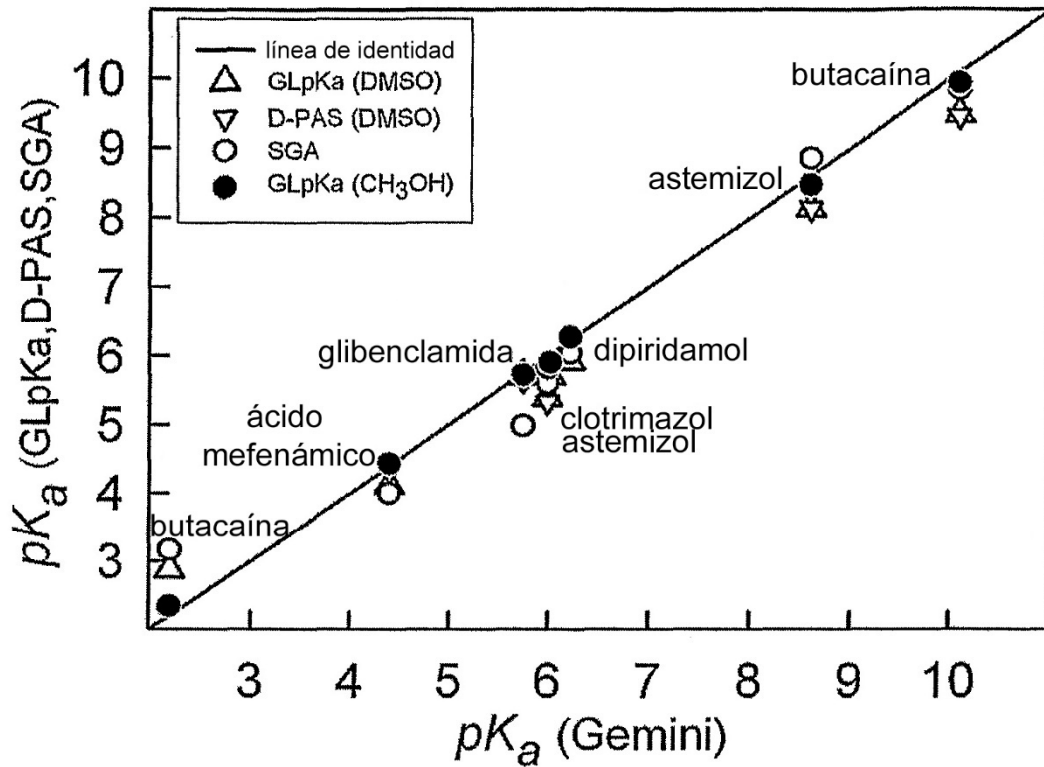


Fig. 1

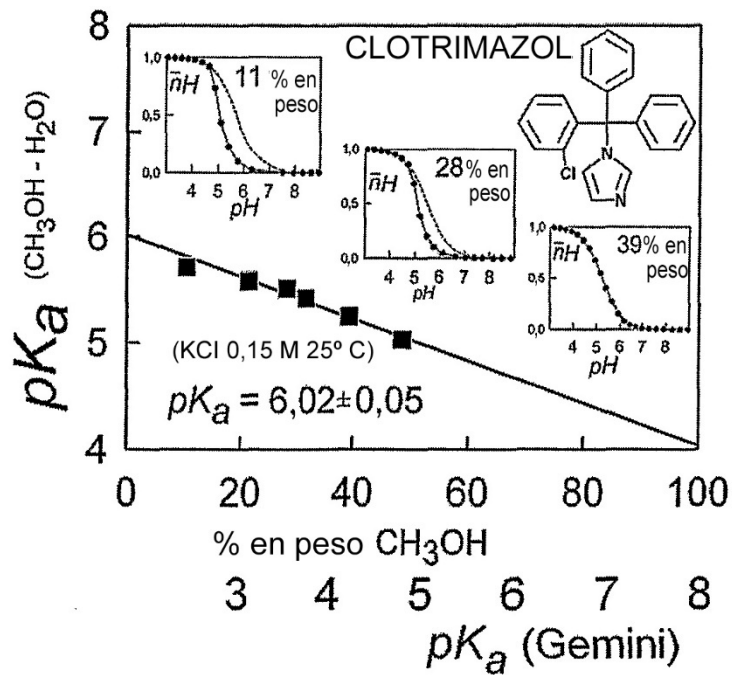


Fig. 2

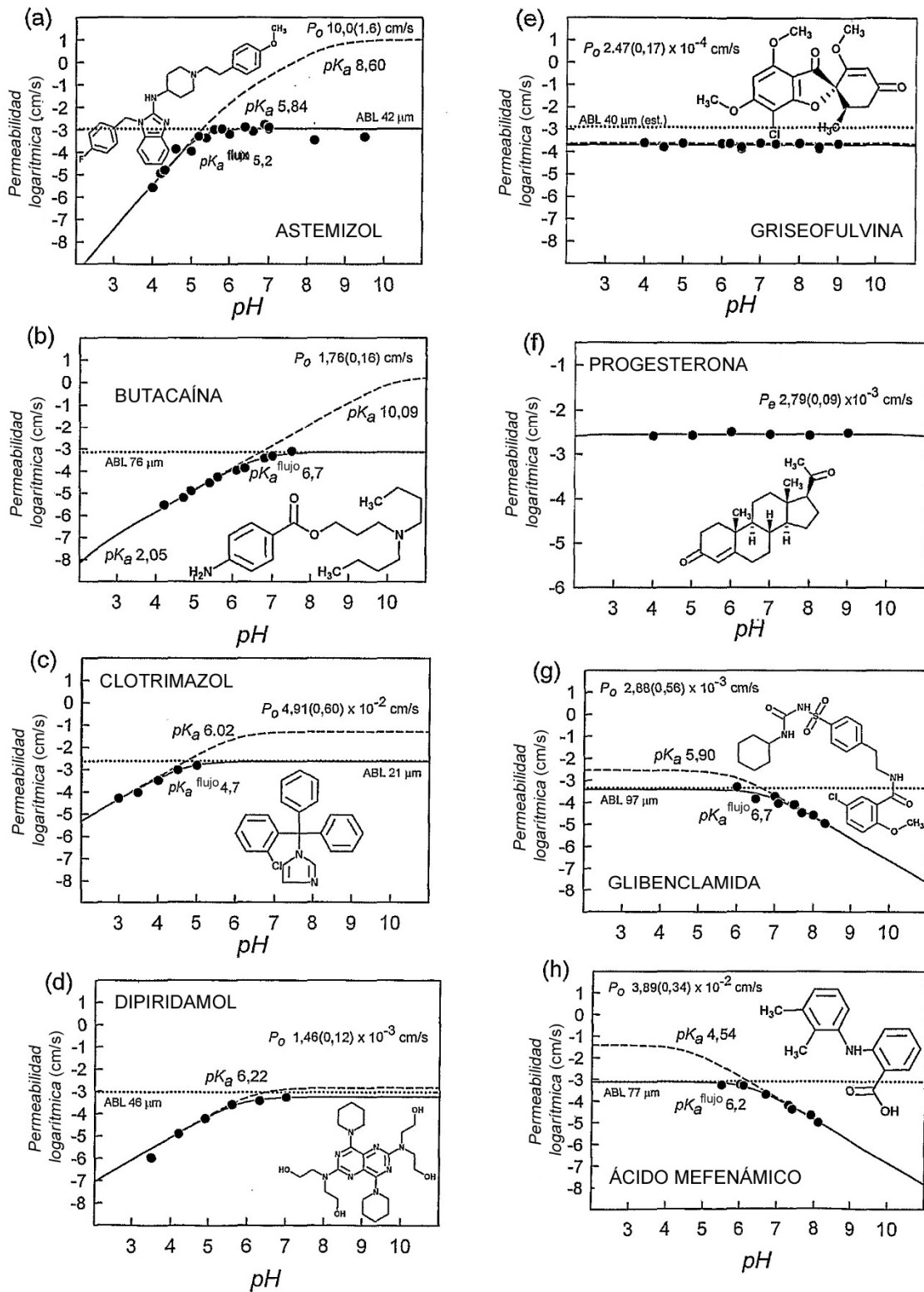


Fig. 3

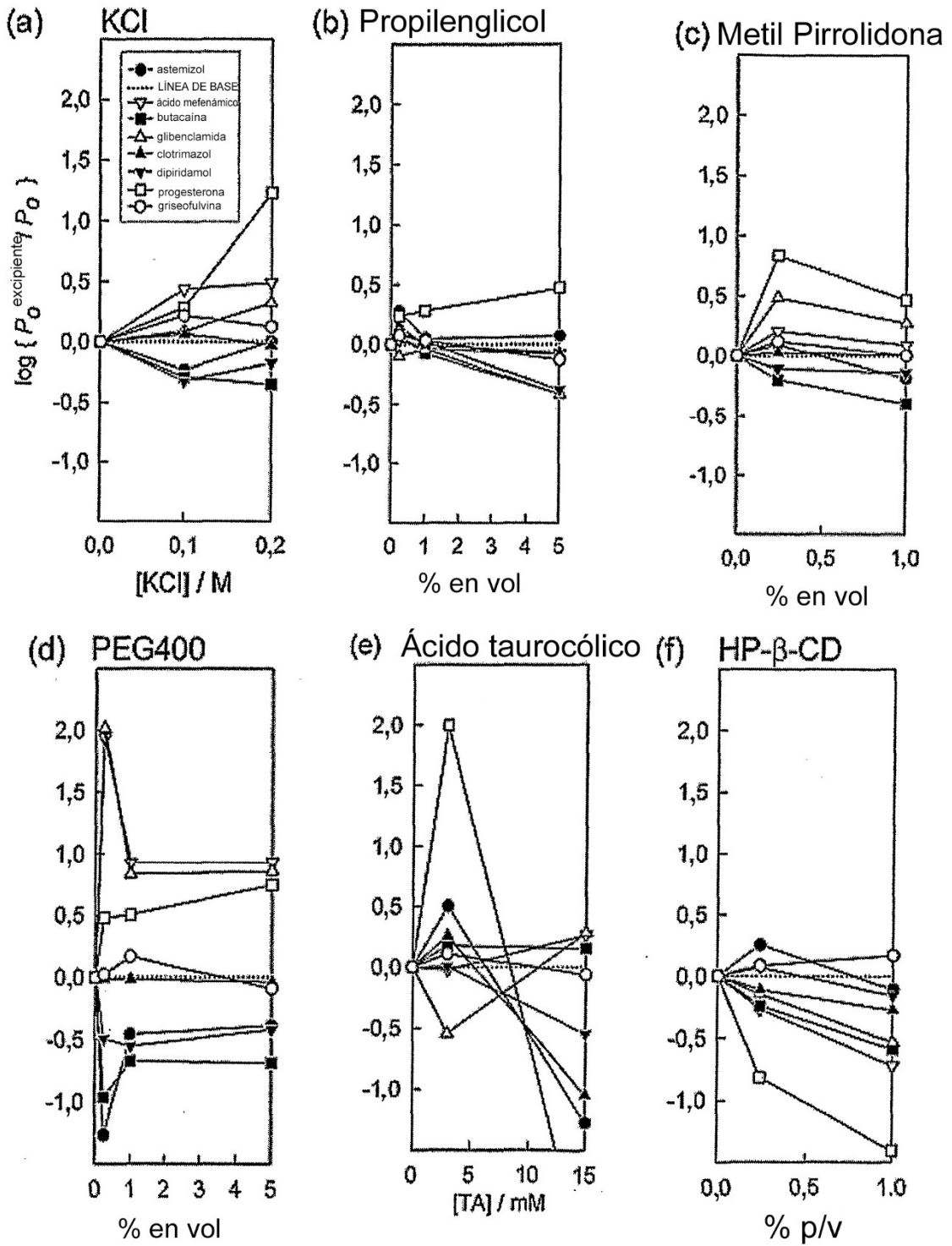


Fig. 4



Fig. 5

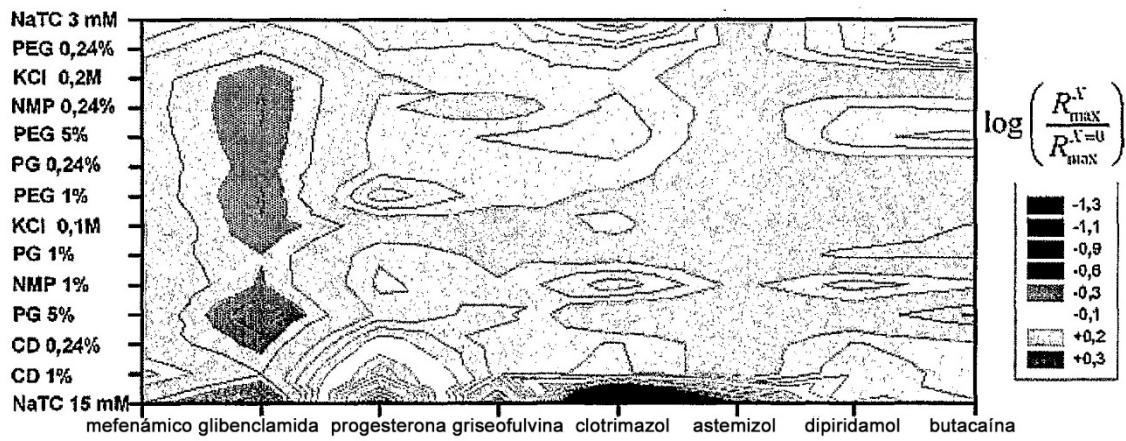


Fig. 6

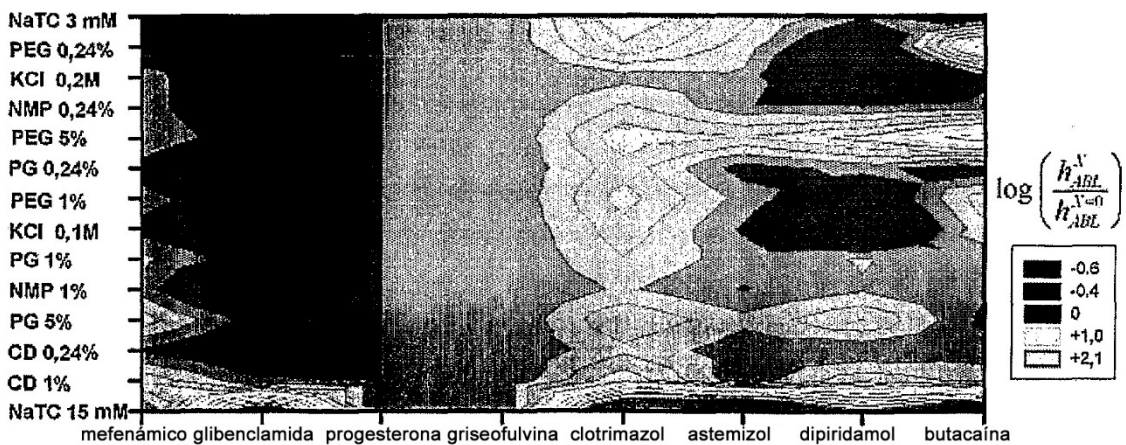


Fig. 7



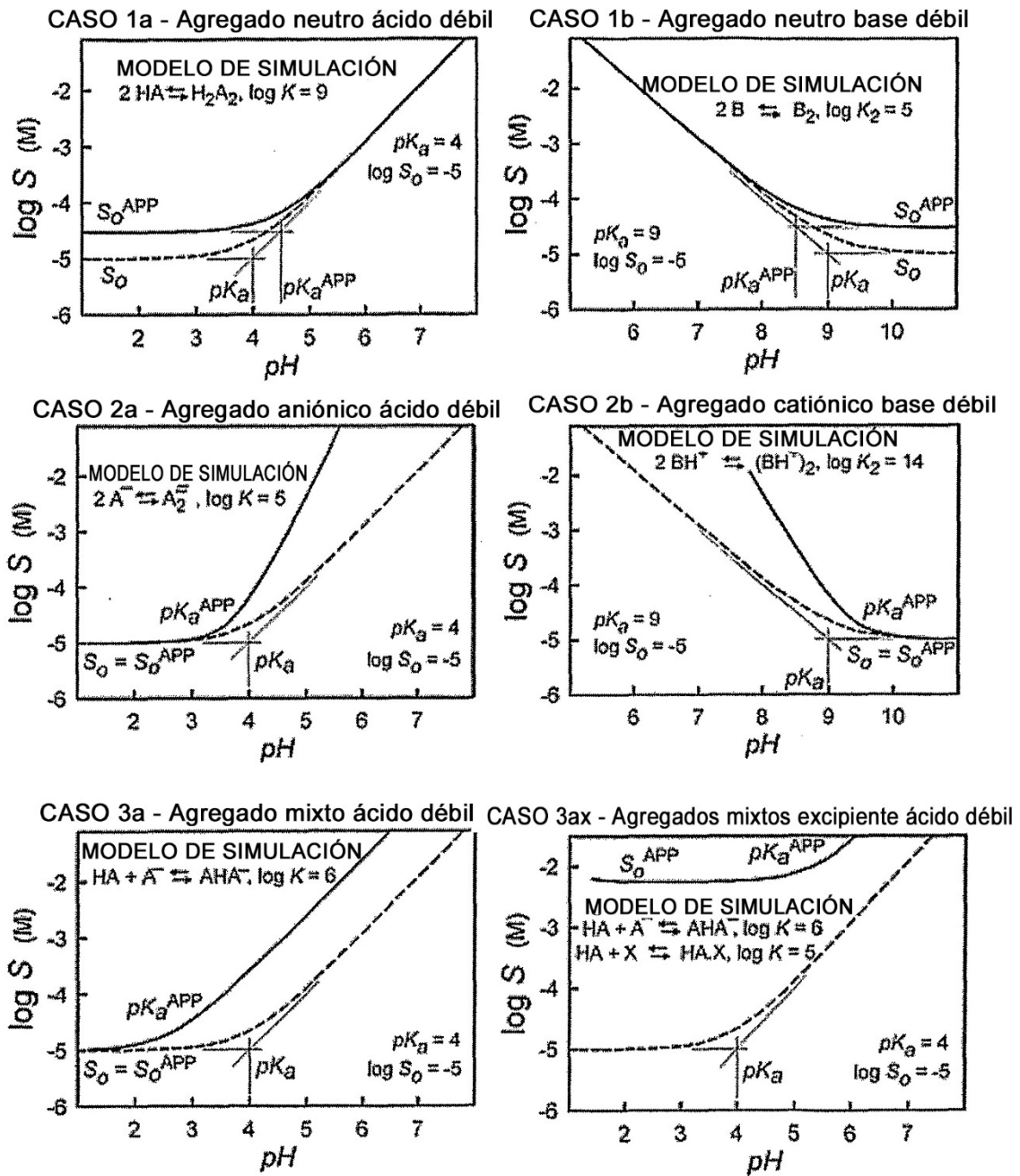


Fig. 8

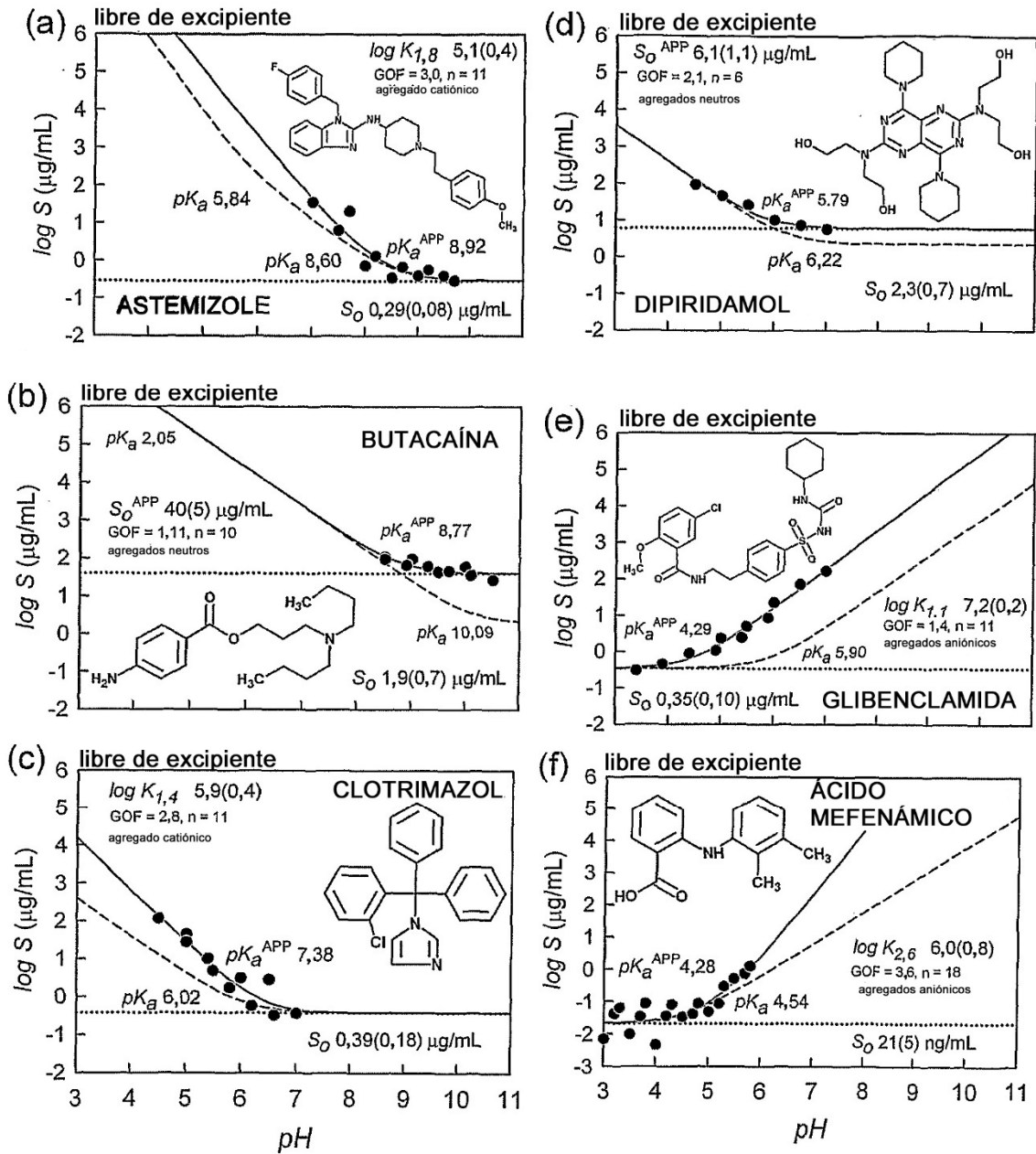


Fig. 9

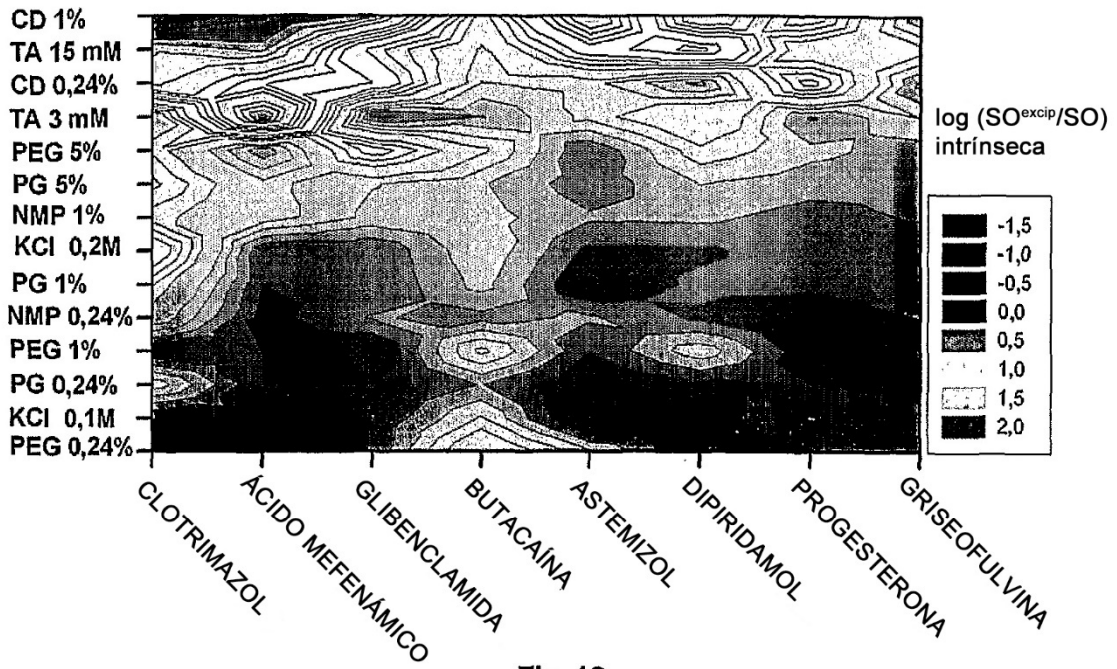


Fig. 10

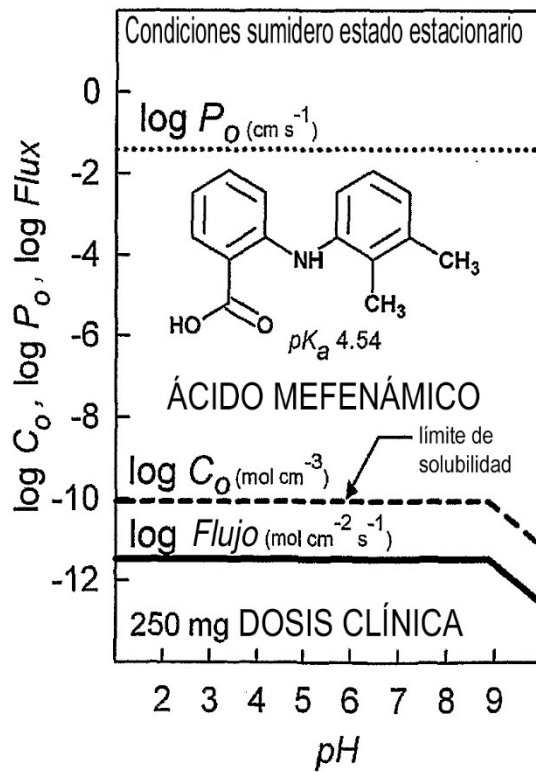


Fig. 11

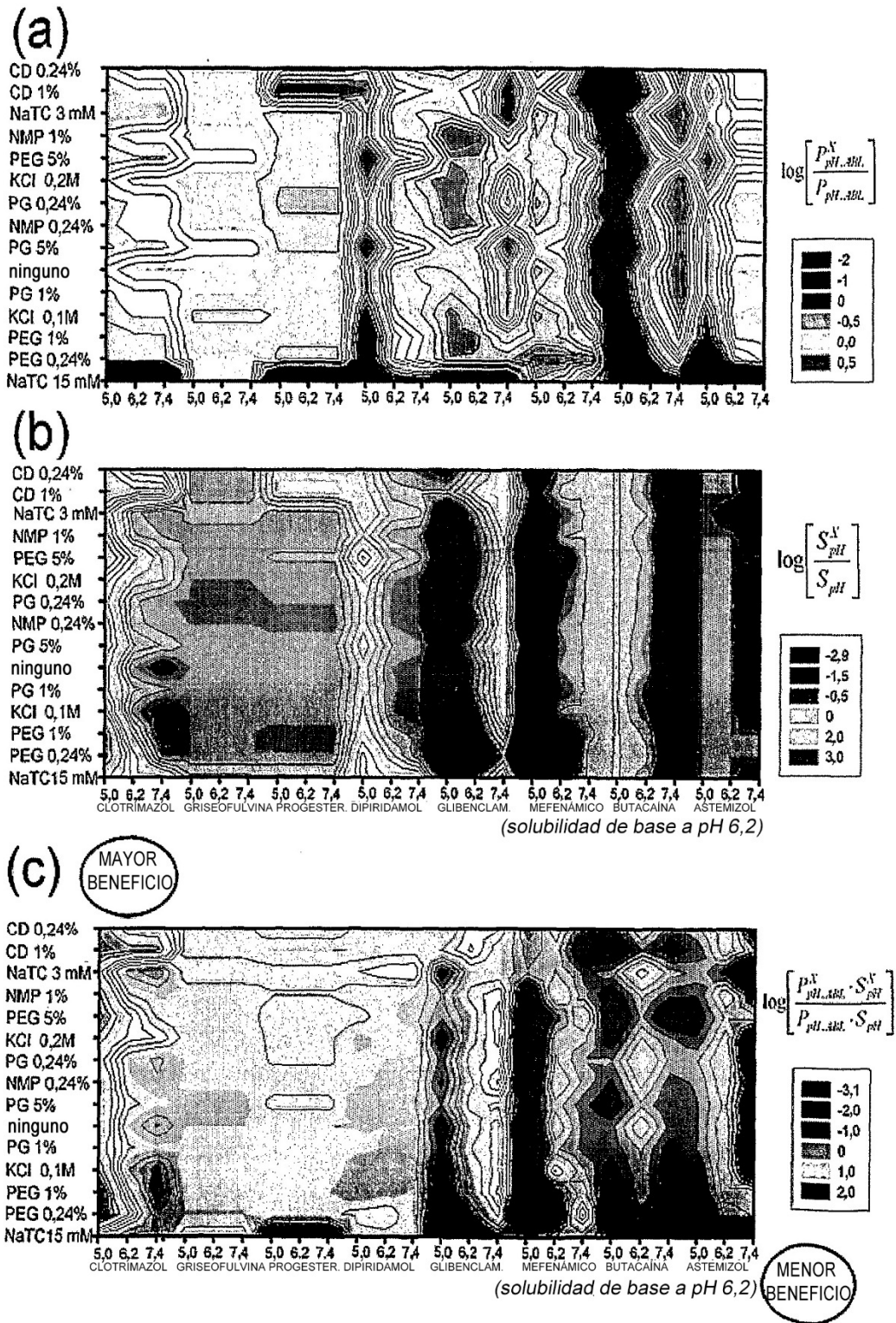


Fig. 12

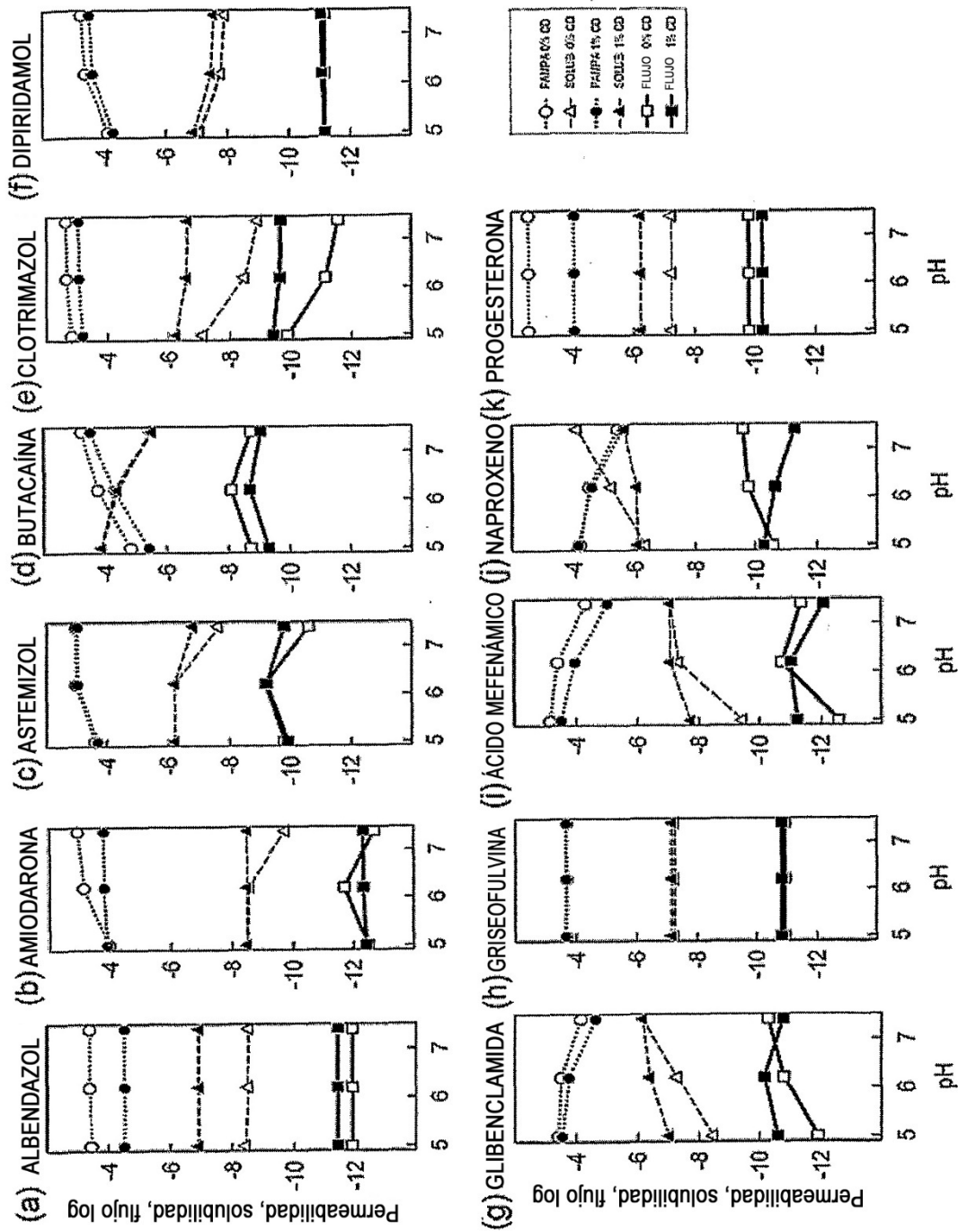


Fig. 13

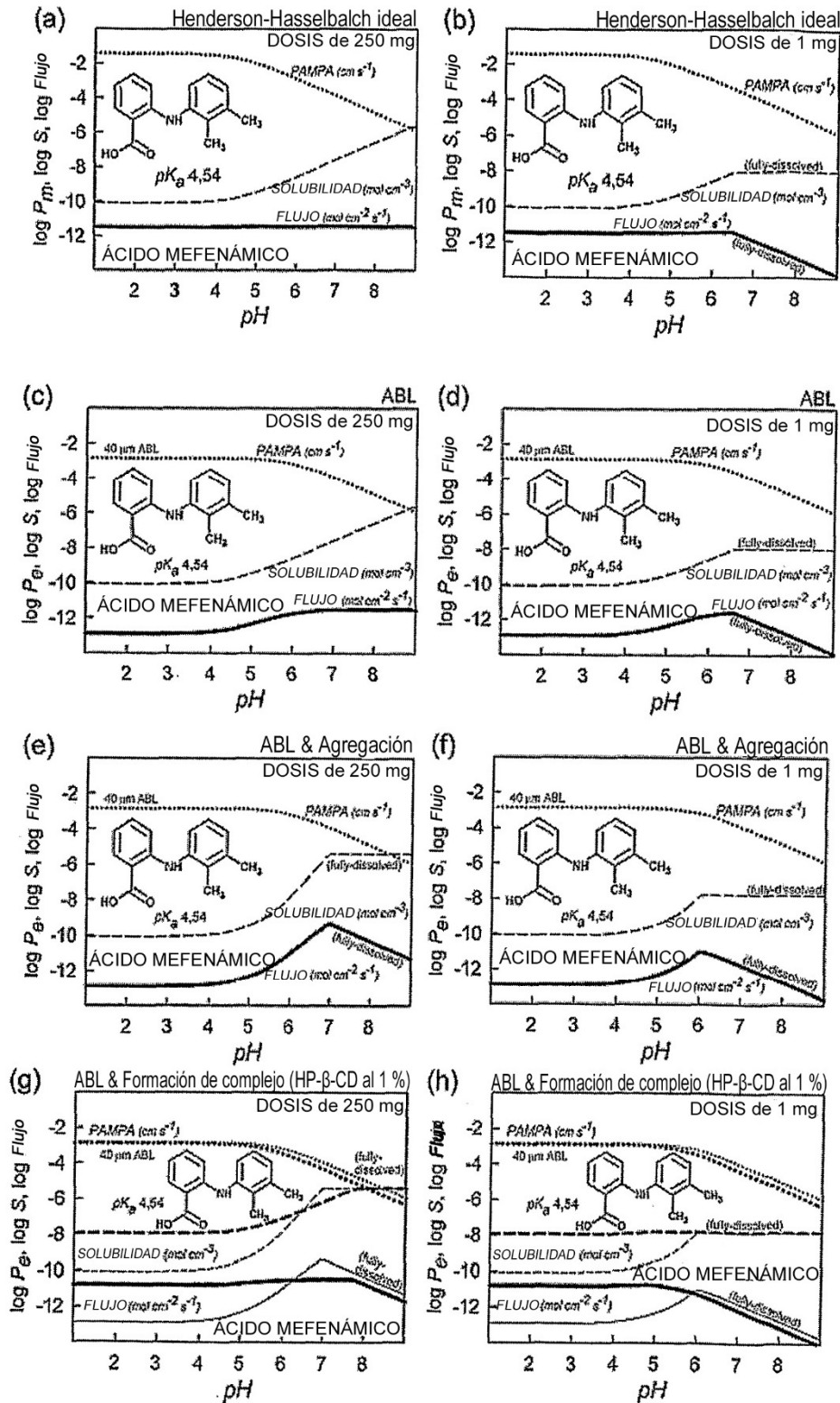


Fig. 14

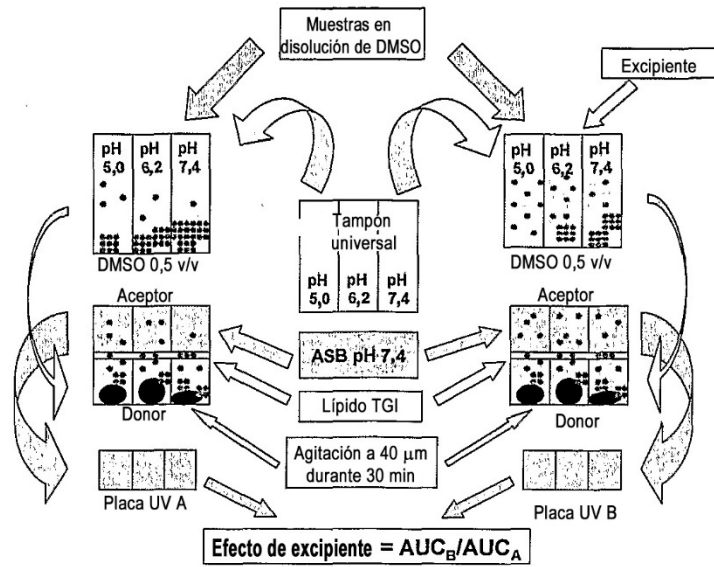


Fig. 15