

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 299**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/714 (2006.01)

A61K 47/10 (2007.01)

A61K 47/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2011** **PCT/IB2011/002546**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012** **WO12056299**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011** **E 11797111 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018** **EP 2632430**

54 Título: **Composiciones nasales de vitamina B12**

30 Prioridad:

29.10.2010 IN 2169MU2010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2018

73 Titular/es:

TROIKAA PHARMACEUTICALS LTD (100.0%)
1 Commerce House Satya Marg, Bodakdev
Ahmedabad 380 054 GUJ, IN

72 Inventor/es:

PATEL, KETAN, R.;
PATEL, MILAN, R. y
SHAH, PRAKASHCHANDRA, J.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 686 299 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

Composiciones nasales de vitamina B12

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones intranasales de los derivados de la vitamina B12 metilcobalamina y cianocobalamina.

Antecedentes de la invención

La deficiencia de vitamina B12 es muy común entre la población. Grandes encuestas en los Estados Unidos y el Reino Unido revelaron que alrededor del 6% de las personas mayores de 60 años o más son deficientes en vitamina B12. Además, en países en desarrollo como la India, esta deficiencia es mucho más común, comienza en los primeros años de vida y persiste a lo largo de la vida. Un estudio de 441 hombres de mediana edad en Pune (India) reveló que el 67% de los hombres tenían una baja concentración de vitamina B12 (<150 pmol/L). De la clase media urbana, el 81% tenía una concentración baja de vitamina B12 y los vegetarianos tenían un riesgo 4,4 veces mayor de concentraciones bajas de vitamina B12.

Las causas principales de la deficiencia de B12 incluyen la falta de factores intrínsecos y otros factores intestinales (por ejemplo, mala absorción), trastornos genéticos raros e ingesta inadecuada. Por lo tanto, es necesario superar la deficiencia de B12 complementando con cianocobalamina, hidroxocobalamina o metilcobalamina a través de diversas vías, como parenteral, oral, etc.

La terapia oral no es adecuada para todos los pacientes, p. ej. pacientes con falta de factores intrínsecos, condiciones asociadas con atrofia gástrica, infestación con gusanos de cinta de pescado, etc. Para tales pacientes, la administración nasal sería más apropiada. La administración de medicamentos a través de la ruta intranasal también ofrece la entrega efectiva de un medicamento a la circulación sistémica, lo que resulta en una mejor efectividad terapéutica. También se sabe que para una administración sistémica mejorada de un fármaco a través de una ruta intranasal es esencial que el fármaco se solubilice. En general, un fármaco altamente soluble se considera un buen candidato para tales terapias.

La metilcobalamina se basa en un anillo de corrina y tiene la fórmula molecular $C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$. Los compuestos que pertenecen a la clase de variantes de vitamina B12 también incluyen cianocobalamina e hidroxocobalamina. La metilcobalamina tiene una solubilidad mucho menor en agua en comparación con la cianocobalamina o la hidroxocobalamina. En agua, la hidroxocobalamina tiene la solubilidad más alta mientras que, la metilcobalamina exhibe la solubilidad más baja.

También se sabe que la metilcobalamina es altamente susceptible a la degradación y, por lo tanto, la menos estable entre todos los derivados de la vitamina B12. En vista de la rápida degradación de la metilcobalamina, es una práctica habitual añadir altos excedentes que varían de 50% a 100% en formulaciones líquidas de metilcobalamina (por ejemplo, inyecciones), para compensar la pérdida debida a la degradación durante el almacenamiento. Los excesos en una concentración tan alta no son deseables ya que resultan en cantidades bastante altas de producto de degradación a medida que la vida del producto aumenta.

Se conoce el uso de cianocobalamina en la dosis de al menos 500 mcg / 0,1 ml por semana por administración intranasal. También se conoce el uso de metilcobalamina para el tratamiento de la deficiencia de vitamina B12 y para las enfermedades como el TDAH. Sin embargo, es menos preferido que otros derivados de cobalamina y no se usa en formulaciones intranasales comercialmente disponibles debido a sus problemas inherentes de baja solubilidad y alta inestabilidad.

La Patente de Estados Unidos Nº 4.724.231 describe una preparación intranasal de cianocobalamina disuelta en agua presentada en una concentración de 500 mcg / 0,1 ml. Además, las composiciones descritas en dicha patente están en forma de geles, cremas, ungüentos, que tienen altas viscosidades en el intervalo de 2.500-10.000 CPS (mPas)

Los inventores han elegido el intervalo de alta viscosidad para aumentar el tiempo de residencia de la composición con la mucosa nasal. Dichos geles altamente viscosos son difíciles de administrar con dosificación precisa y causan incomodidad al paciente durante todo el período de tratamiento.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos 20090012039 describe un método de uso de una preparación de metilcobalamina intranasal para el tratamiento del trastorno por déficit de atención. Dicha solicitud de patente describe composiciones de administración nasal, que pueden prepararse disolviendo, dispersando, mezclando o incorporando metilcobalamina (con o sin ácido fólico) y excipientes farmacéuticos opcionales, tales como agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución o suspensión. Se menciona que la composición a administrar por vía nasal también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH y similares, por ejemplo, acetato sódico, mono-laurato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, sorbato de potasio, glicerina, lecitina, etc. si es necesario.

La Patente de Estados Unidos 7229636 describe formulaciones acuosas de baja viscosidad de cianocobalamina para administración intranasal que tiene un pH en el intervalo de 4 a 6, siendo 4.5 y 5.5 el intervalo más preferido y ejemplificado. La patente aborda los problemas de la consistencia desagradable de las formulaciones de gel intranasal comercializadas (NASCOBAL) para proporcionar formulaciones de cianocobalamina en spray intranasal de baja viscosidad aceptables. La cianocobalamina se ha preferido a la metilcobalamina debido a su mayor estabilidad y facilidad de formulación.

Aunque la técnica anterior describe formulaciones intranasales de cianocobalamina y algunos enfoques para el uso de metilcobalamina, no se abordan cuestiones con respecto a la baja solubilidad, inestabilidad de la metilcobalamina, y por lo tanto su impacto sobre la biodisponibilidad para una eficacia terapéutica optimizada. Además, la viscosidad optimizada y el pH de las formulaciones para la administración intranasal efectiva sigue siendo un desafío y, por lo tanto, las formulaciones comerciales terapéuticamente eficaces de metilcobalamina no están disponibles en el mercado. Además, sería deseable proporcionar formulaciones para mejorar la biodisponibilidad de formulaciones de la familia de derivados de vitamina B12 para lograr una eficacia terapéutica mejorada.

La presente invención proporciona formulaciones intranasales nuevas y estables de metilcobalamina con concentraciones optimizadas del fármaco en su forma solubilizada y la viscosidad de la formulación para lograr la biodisponibilidad deseada para la eficacia terapéutica. También proporciona nuevas formulaciones de otros derivados de la vitamina B12, a saber, cianocobalamina, con una biodisponibilidad significativamente superior en comparación con las preparaciones de la técnica anterior.

Objetos de la invención

El objeto principal de la invención es proporcionar composiciones intranasales de la clase de derivados de vitamina B12 tales como metilcobalamina, cianocobalamina e hidroxocobalamina y un proceso para su preparación

Otro objeto de la invención es proporcionar formulaciones estables de alta concentración para aplicaciones intranasales con biodisponibilidad mejorada de metilcobalamina para lograr una eficacia terapéutica mejorada mediante el uso de potenciadores de la penetración dirigidos.

Otro objeto de la invención es proporcionar formulaciones de alta concentración de otros derivados de vitamina B12, p. cianocobalamina, que tiene una biodisponibilidad significativamente superior en comparación con las preparaciones de la técnica anterior.

Otro objeto de la invención es proporcionar soluciones estables, de alta concentración, transparentes y transparentes de metilcobalamina en agua mediante el uso de codisolventes / solubilizantes adecuados o mezclas de los mismos, con o sin potenciadores de penetración para maximizar la biodisponibilidad del fármaco tras la administración intravenosa. administración nasal.

Otro objeto de la invención es proporcionar soluciones transparentes, transparentes, de alta concentración de metilcobalamina en agua mediante el uso de codisolventes / solubilizantes adecuados o mezclas de los mismos con o sin potenciadores de la penetración, seleccionándose el cuanto de los codisolventes / solubilizantes o mezclas de los mismos. de una manera tal que la formulación da como resultado una solubilidad mejorada sin aumentar significativamente la viscosidad de la formulación intranasal.

Otro objeto de la invención es proporcionar dichas soluciones estables, de alta concentración, transparentes y transparentes de metilcobalamina en concentraciones de metilcobalamina de aproximadamente 500 mcg / 0,1 ml a aproximadamente 1.500 mcg / 0,1 ml.

Otro objeto de la invención es proporcionar dichas soluciones estables transparentes, transparentes, de alta concentración de metilcobalamina en agua, que tienen un pH adecuado para la administración intranasal sistémica de metilcobalamina que oscila entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0.

Otro objeto de la invención es proporcionar dichas soluciones transparentes claras de alta concentración estables de derivados de Vitamina B12 en agua, que tienen una viscosidad que varía de aproximadamente 1 a 200 CPS (mPas) adecuada para administración sistémica de fármacos intranasales.

Otro objeto de la invención es proporcionar dichas soluciones transparentes claras estables de alta concentración de metilcobalamina en agua, que tienen opcionalmente una cantidad adecuada de un agente mucoadhesivo o mezclas de los mismos que son adecuados para la administración sistémica intranasal de fármacos.

Otro objeto de la invención es proporcionar dicha alta concentración, soluciones transparentes claras de metilcobalamina en agua, con o sin potenciadores de la penetración tales como sales biliares, vitamina E TPGS, alquil maltosidas o mezclas de los mismos, que son adecuados para la administración sistémica intranasal de fármacos.

Otro objeto de la invención es proporcionar dichas soluciones transparentes claras y de alta concentración de metilcobalamina en agua, en combinación con una cantidad adecuada de agentes quelantes tales como EDTA disódico, que son adecuados para la administración sistémica intranasal de fármacos.

Otro objeto de la invención es proporcionar dichas soluciones transparentes claras de alta concentración estables de metilcobalamina en agua, en combinación con conservantes y antioxidantes adecuados.

Descripción detallada del invento

La presente invención proporciona una composición acuosa intranasal estable que comprende metilcobalamina en una concentración de 500 mcg / 0,1 ml a 1.500 mcg / 0,1 ml, codisolventes / solubilizantes o mezclas de los mismos en agua, en donde el codisolvente / solubilizante se selecciona de glicofurol, propilenglicol, polietilenglicoles., o mezclas de los mismos, opcionalmente un potenciador de la penetración, y en donde el pH de la composición es de 6 a 6,5 y una viscosidad de 1 a 200 mPas. Además, la presente invención proporciona una composición acuosa intranasal estable que comprende cianocobalamina en una concentración de 500 mcg / 0,1 ml a 1.500 mcg / 0,1 ml, codisolventes / solubilizantes o mezclas de los mismos en agua, y al menos un potenciador de la penetración, donde el codisolvente / solubilizante es seleccionados de glicofurol, propilenglicol, polietilenglicoles, o mezclas de los mismos, en donde el potenciador de la penetración se selecciona de sales biliares tales como glicocolato de sodio y en donde el pH de la composición es de 4 a 6 y una viscosidad de 1 a 200 mPas.

La metilcobalamina tiene una solubilidad mucho menor en agua en comparación con la cianocobalamina o la hidroxocobalamina. Para proporcionar un beneficio terapéutico óptimo por la ruta nasal, es necesario solubilizar la metilcobalamina de manera tal que las soluciones tengan una concentración que varía de aproximadamente 500 mcg por 0,1 ml a aproximadamente 1.500 mcg por 0,1 ml. Sorprendentemente, hemos encontrado que la solubilización puede conseguirse en el intervalo de concentración deseado para producir soluciones de viscosidades controladas, mediante la formulación juiciosa de un sistema disolvente que utiliza codisolventes / solubilizantes, a saber, glicofurol, propilenglicol, polietilenglicoles o mezclas de los mismos individualmente o en combinación con agua, en donde la cantidad de los codisolventes / solubilizantes es de 1 a 35% p/v. Además, las formulaciones se han optimizado en términos de su viscosidad y pH para asegurar la maximización de la absorción intranasal del fármaco para lograr eficacia terapéutica efectiva y biodisponibilidad con un mejor cumplimiento del paciente.

Además del sistema disolvente, la formulación incluye otros excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados entre, pero sin limitación, un grupo de excipientes que comprenden humectantes tales como glicerina, y/o conservantes y/o antioxidantes / o potenciadores de la penetración y/o mucoadhesivos.

Los conservantes de la presente invención se seleccionan de cloruro de benzalconio, metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, ácido benzoico, alcohol bencílico, bronopol, butilhidroxil anisol, butilhidroxil tolueno, clorocresol o alcohol isopropílico o una combinación de los mismos.

Los potenciadores de la penetración de la presente invención se pueden seleccionar entre sales biliares, vitamina E TPGS, alquil maltosidas, tensioactivos no iónicos, aniónicos o anfóteros que tienen un valor de HLB 8-14 o una combinación de los mismos. Los ejemplos no limitantes de tales potenciadores de la penetración son glicocolato de sodio, taurocolato de sodio, dodecilmaltosidas, tridecilmaltosida o tetradecilmaltosidas, o cualquiera de sus combinaciones. Los potenciadores de la penetración se usan hasta el 2,5% en peso de las composiciones.

Los mucoadhesivos se seleccionan de polímeros sintéticos tales como derivados de celulosa (metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polímeros de poli (ácido acrílico) (carbómeros o carbopols, policarbofilo) tales como carbopol 934; Poli (metilacrilato de hidroxietilo), poli (óxido de etileno), poli (vinilpirrolidona), poli (alcohol vinílico). Los adhesivos muco se seleccionan adicionalmente de polímeros naturales tales como tragacanto, alginato de sodio, goma de karaya, goma guar, goma de xantano, Lectina, almidón soluble, gelatina, pectina y quitosano y se utilizan hasta 5% en peso de la composición.

Los humectantes se seleccionan de glicerina, lactato de sodio, sorbitol, xilitol, butilenglicol.

Sorprendentemente, hemos descubierto que es posible alcanzar la viscosidad deseada de aproximadamente 1 a 200 CPS (mPas) mediante una combinación juiciosa de los ingredientes, especialmente el sistema disolvente, y aún proporcionar una absorción transnasal significativamente mejorada de metilcobalamina. Las formulaciones se presentan en forma de una solución, gotas o paquetes de pulverización, en contenedores multidosis, para la entrega de volúmenes predeterminados. Es importante observar que, a pesar de la menor viscosidad de las formulaciones de la presente invención, no tienen una absorción transnasal comprometida del fármaco. La técnica anterior enseña que las formulaciones deben tener alta viscosidad (Patente de Estados Unidos N° 4724231 que recomienda viscosidades de 2.500 a 10.000 CPS (mPas)) para garantizar el tiempo de residencia deseado en la mucosa nasal. La presente invención es una desviación distinta de las enseñanzas de la técnica anterior y, sin embargo, logra un equilibrio perfecto entre la viscosidad, capacidad de pulverización, absorción y biodisponibilidad mejorada.

Las formulaciones de la presente invención comprenden opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales que se usan para aumentar adicionalmente la estabilidad de las formulaciones. Los ejemplos no limitantes de tales excipientes son agentes quelantes tales como EDTA sódico y/o antioxidantes que no irritan la mucosa nasal. Un ejemplo no limitante de tales antioxidantes es el ácido ascórbico.

Las formulaciones de las soluciones nasales de metilcobalamina descritas en este documento exhiben una estabilidad deseable que permite, de este modo, menores excedentes.

El mero logro de la solubilización no es una condición suficiente para garantizar la máxima absorción del fármaco, como la metilcobalamina. Parámetros tales como la viscosidad de la formulación, la estabilidad del fármaco con respecto a la vida útil, también necesitan optimizarse para garantizar la absorción transnasal requerida y la biodisponibilidad para la eficacia terapéutica.

- 5 Se preparó una gama de soluciones con un pH en el intervalo de aproximadamente 3.75 a 7. Se pueden usar sistemas tampón adecuados tales como tampón de citrato para alcanzar el pH deseado. Luego fue necesario determinar el impacto del pH sobre la absorción intranasal de metilcobalamina.

- 10 Con el fin de evaluar el impacto del pH en la absorción intranasal de metilcobalamina, se prepararon soluciones de metilcobalamina y se realizaron estudios de biodisponibilidad para las formulaciones con pH 3.75, 5 y 6.25. Sorprendentemente, hemos encontrado que el pH superior a 6 es el más apropiado para lograr la absorción intranasal deseada de metilcobalamina. Los resultados se dan en las tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1

Ingredientes	Prueba A	Prueba B	Prueba C
Metilcobalamina	500 mcg	500 mcg	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg	0,02 mg	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg	2,23 mg	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg	1,00 mg	1,00 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg	0,32 mg	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.	c.s.	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml	c.s. para 0,1 ml	c.s. para 0,1 ml
pH Ajustado a	6.25	5.00	3.75

- 15 **Resultados:** AUC0-t (pg.hr / ml) para mecobalamina con la dosis de 1.500 mcg y dosis ajustada de 500 mcg con corrección basal se presentan a continuación.

Tabla 2

Prueba	AUC0-t (pg.hr / ml) (Para dosis de 1.500 mcg)	AUC0-t (pg.hr / ml) (Para dosis ajustada a 500 mcg)
Prueba A	8.374,328	2.791,44
Prueba B	5.120,904	1.702,18
Prueba C	4.044,998	1.348,33

Proceso para la preparación de las composiciones

- 20 La preparación completa se llevó a cabo bajo un chorro de nitrógeno bajo una lámpara de vapor de sodio. Los niveles de oxígeno disuelto se mantuvieron al mínimo factible, preferiblemente alrededor de 1 a 1,5 ppm. El proceso comprende los siguientes pasos:

- i) Agregar Glicofurol al 80% v/v de agua para el lote;
- ii) Disolver cloruro de benzalconio y glicerina con agitación;
- iii) Tamponar la solución usando tampón de citrato;
- 25 iv) Agregar metilcobalamina con agitación hasta la disolución;
- v) Ajustar el pH al valor requerido mediante la adición de ácido / álcali
- vi) Compensar el volumen de la solución para obtener la concentración deseada de 500 mcg por 0,1 ml de solución de pulverización nasal.

- 30 Las composiciones de la presente invención típicamente comprenderían: el fármaco 500 mcg / 0,1 ml a 1.500 mcg / 0,1 ml; Disolventes (total) 1-35%; Humectante 0- 5%, Mucoadhesivo hasta 5%; Potenciadores de la penetración hasta 2,5%; Conservantes hasta 4%. Como se describe adicionalmente en la memoria descriptiva, las composiciones

contendrían adicionalmente los ingredientes tamponantes para ajustar el pH al valor requerido, dependiendo del fármaco usado.

Estudios sobre biodisponibilidad de formulaciones

- 5 Se condujo un estudio de biodisponibilidad de sprays nasales preparado, de acuerdo como se describió anteriormente, conteniendo 500 mcg / 0,1 ml de metilcobalamina en sujetos humanos sanos en ayunas. El diseño del estudio fue un estudio de biodisponibilidad comparativo cruzado de tres vías, de etiqueta abierta, aleatorio, tres periodos, tres tratamientos, dosis única en ayunas en seis sujetos humanos adultos sanos.

- 10 Métodos: El estudio se llevó a cabo para determinar la biodisponibilidad comparativa de los tres productos de prueba mediante la evaluación de los parámetros farmacocinéticos, C_{max}, AUC_{0-t}, AUC_{0-inf} en ayunas en 6 sujetos sanos, adultos y humanos en un estudio aleatorizado cruzado. Todos los sujetos proporcionaron un consentimiento informado por escrito para participar en el estudio antes de la inscripción y se pudieron retirar en cualquier momento durante el estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética institucional y se realizó de acuerdo con la Buena práctica clínica y la Declaración de Helsinki.

Productos de estudio: (Fórmula descrita en la Tabla 1)

- 15 Producto de Prueba (A): Spray Nasal de Mecobalamina 500 mcg / 0,1 ml

Producto de Prueba (B): Spray Nasal de Mecobalamina 500 mcg / 0,1 ml

Producto de Prueba (C): Spray Nasal de Mecobalamina 500 mcg / 0,1 ml

- 20 Evaluación previa al estudio: Los sujetos fueron examinados en busca de datos demográficos, historia clínica, examen físico, ECG de 12 derivaciones, hemograma, bioquímica, serología, análisis de orina y análisis de orina para el análisis de fármacos.

Administración del medicamento:

Los sujetos recibieron cada tratamiento (Spray Nasal de Mecobalamina) de forma cruzada de acuerdo con el Programa de aleatorización de la formulación con un período de inactividad de al menos 7 días entre cada período.

- 25 Después de una noche de ayuno de 10 horas, a los sujetos se les administró la dosis programada de la formulación de prueba (A) o la formulación de prueba (B) o la formulación de prueba (C) que se administraron por vía nasal, bajo la supervisión de un personal médico.

Preparación (Activación) del spray nasal:

- 30 Antes de la administración de la primera dosis, la bomba es preparada. Para preparar la bomba, se colocó la boquilla entre el primer y segundo dedo con el pulgar en el fondo de la botella. La unidad fue bombeada con firmeza y rapidez hasta la primera aparición de aerosol. La bomba se activó dos veces más y el spray nasal estaba listo para su uso.

Procedimiento de administración:

Se pidió a los sujetos que inclinaran la cabeza ligeramente hacia atrás para facilitar la administración del spray nasal. Luego fue rociado tres veces más profundo en la fosa nasal. Se pidió a los sujetos que se sentaran en la misma posición durante dos minutos para que la dosis no se filtrara.

- 35 Monitoreo del sujeto durante el estudio: Se monitoreó la exploración física, el monitoreo de signos vitales y el bienestar a las 0.00 horas (antes de la dosis), 2.00, 5.00, 12.00, 24.00 y 36.00 horas (Post-dosis) ± 30 minutos, y cuando sea necesario.

Evaluación posterior al estudio: 12 ECG, hemograma, bioquímica y análisis de orina de plomo se realizaron después de la última recolección de muestras de sangre del período III o en la interrupción / retirada del sujeto del estudio.

- 40 Alojamiento: aproximadamente 12 horas antes de la administración del medicamento y hasta 36 horas después de la administración del mismo.

Comidas: Se proporcionaron comidas estandarizadas a los sujetos a las 4.00, 8.00, 12.00, 25, 29 y 33 horas después de la dosis en cada período de estudio.

Colección de muestra:

- 45 Número total de muestras de sangre: veinte (20) por período.

Horas de muestreo: -10.00, -06.00, 0.00 hrs (muestras previas a la aplicación para la línea base), 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.50, 3.00, 4.00, 5.00, 6.00, 8.00, 12.00, 18.00, 24.00 y 36.00 h (post aplicación). Las muestras de sangre se recogieron en color ámbar / cubiertas con papel de aluminio vacutainer.

Pérdida Total de Sangre: se recogió una muestra de sangre de 5,0 ml y se descartó 0,1 ml antes de cada toma de muestras que representa 306 ml. Se extrajo un total de aproximadamente 326 ml (incluidos 20 ml para las pruebas de laboratorio clínico pre y post) de sangre de cada sujeto, para todos los periodos.

- 5 Procesamiento de la muestra: las muestras de sangre se dejaron coagular durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 4.000 ± 300 rpm durante 10 minutos. El suero se separó y se transfirió rápidamente a un tamaño adecuado, con tapa de rosca de polipropileno de color ámbar (previamente etiquetados con el código de estudio y el código de muestra), por duplicado. Todas las muestras se almacenaron en un congelador a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Parámetros farmacocinéticos:

Parámetros principales: Cmax, AUC0-t, AUC0-inf

- 10 Parámetros secundarios: $t_{1/2}$, ke, Tmax

Método analítico:

La concentración sérica de mecobalamina se midió mediante un método analítico previamente validado.

Evaluación estadística

- 15 ANOVA, dos pruebas de una cara para comparar y análisis de proporción para los parámetros farmacocinéticos no transformados y logarítmicos transformados Cmax, AUC0-t, AUC0-inf se realizaron. Como todos los parámetros indicaban conclusiones similares, AUC0-t (pg.hr / ml), el parámetro más relevante para el beneficio terapéutico se proporciona en los resultados para las formulaciones ejemplificadas.

- 20 Este estudio condujo para la dosis de 1.500 mcg de metilcobalamina y el análisis estadístico se realizó para la dosis de 1.500 mcg así como para la dosis ajustada de 500 mcg. El perfil de concentración plasmática-tiempo promedio para la dosis de 1.500 mcg se muestra en la figura 1 y el perfil de concentración plasmática-tiempo promedio para datos corregidos para una dosis única de 500 mcg se muestra en la figura 2. Área media debajo de la curva (AUC0-t) para la dosis de 1.500 mcg y para 500 mcg de formulaciones de prueba se enumeran en la Tabla 2.

Resultados: AUC0-t (pg.hr / ml) para mecobalamina con la dosis de 1.500 mcg y dosis ajustada de 500 mcg con corrección basal se presentan a continuación.

- 25 **Tabla 3**

Prueba	AUC0-t (pg.hr / ml) (Para dosis de 1.500 mcg)	AUC0-t (pg.hr / ml) (Para la dosis ajustada a 500 mcg)
Prueba A	8.374,328	2.791,44
Prueba B	5.120,904	1.702,18
Prueba C	4.044,998	1.348,33

- 30 Los resultados de los estudios de biodisponibilidad de las tres formulaciones muestran que se encontró que la prueba A proporcionaba la máxima liberación transnasal de metilcobalamina. Es de destacar que la disponibilidad de metilcobalamina aumentó drásticamente al aumentar el pH de 3,75 a 6,25. Los gráficos para la dosis de 1.500 mcg así como el de la dosis ajustada a 500 mcg se proporcionan en la Figura 1 y en la Figura 2.

Sorprendentemente, se encontró que el intervalo de pH para la absorción favorable de metilcobalamina era 5-7, siendo el pH más preferido de 5,5 a 7, siendo el pH de 6.25 el más apropiado para la absorción más alta. Se puede observar que los valores de pH superiores a 7 no son preferidos ya que un pH alto facilita el crecimiento de bacterias patógenas en el pasaje nasal.

- 35 Sorprendentemente se descubrió adicionalmente la adición de potenciadores de penetración tales como sales biliares. La vitamina E TPGS (d-alfa-tocoferil polietilenglicol 1000 succinato), o los alquil maltósidos tales como dodecil maltósidos, tridecil maltósido de tetradecil maltósido o cualquier combinación de los mismos, tienen un impacto significativo en la absorción y biodisponibilidad de metilcobalamina cuando la formulación se administra por vía nasal.

- 40 Por consiguiente, una formulación de metilcobalamina sin el potenciador de la penetración (Prueba D) se comparó con una formulación de metilcobalamina con un 2% de potenciador de la penetración (Prueba E) para evaluar el efecto del potenciador de la penetración sobre la absorción intranasal de metilcobalamina. El pH de estas formulaciones se ajustó a 6.25 ± 0.25 . La composición de estas formulaciones de prueba se describe en la tabla a continuación. Consulte también la Figura 3 y la Figura 4.

Tabla 4

Ingredientes	Prueba D	Prueba E
Metilcobalamina	500 mcg	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg	1,00 mg
Glicocolato de Sodio	-	2,00 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml	c.s. para 0,1 ml
pH Ajustado a	6.23	6.28

Tabla 5

Prueba	Componente Medido	AUC0-t (pg.hr / ml) (Línea de base corregida)
Prueba D	metilcobalamina	22.323,09
	Total B12	18.651,79
Prueba E	metilcobalamina	897.877,47
	Total B12	37.399,75

- 5 Los resultados muestran sorprendentemente que la penetración transnasal de metilcobalamina se incrementó significativamente en presencia de una pequeña cantidad del potenciador de la penetración. Esto fue confirmado por los resultados del estudio que mide la concentración plasmática de vitamina B total. Como se encontró que concentraciones más altas de glicocolato de sodio causaban irritación nasal, la concentración de glicocolato de sodio se ajustó preferiblemente para que no fuera más de 2,5% p/v de las formulaciones.
- 10 Formulaciones similares a la prueba E con concentraciones variables de glicocolato de sodio a saber. El 2% p/v, 1,5% p/v, y 1% p/v fueron preparados y evaluados para la absorción transnasal de metilcobalamina a través de un estudio de bioequivalencia tridireccional. Los resultados del estudio que indican los niveles totales de vitamina B12 son los que se muestran a continuación.

Tabla 6

Prueba	Componente Medido	AUC0-t (pg.hr / ml) (Línea de base corregida)
Formulación con 2% de Glicocolato de Sodio	Total B12	43.446,58
Formulación con 1,5% de Glicocolato de Sodio	Total B12	27.748,35
Formulación con 1% de Glicocolato de Sodio	Total B12	208.134,59

- 15 Los resultados del estudio anterior, como también se muestra en la Figura 5, demuestran claramente que la incorporación de glicocolato de sodio al 1% p/v da como resultado una mayor absorción de metilcobalamina en comparación con glicocolato de sodio al 2% p/v. En otras palabras, la absorción aumenta cuando la cantidad de penetración se reduce de 2% p/v a 1% p/v. En consecuencia, la disminución de la cantidad del potenciador de la penetración dio como resultado una mayor absorción.
- 20 Se llevó a cabo otro conjunto de experimentos para acceder al papel del potenciador de la penetración, como el glicocolato sódico en formulaciones que contienen cianocobalamina o hidroxocobalamina.

Se realizó un estudio de bioequivalencia tridireccional para evaluar el efecto del glicocolato de sodio sobre la absorción intranasal de cianocobalamina, así como para comparar los niveles de metilcobalamina producidos por las respectivas formulaciones. Las formulaciones sometidas al estudio de bioequivalencia comprenden formulaciones de cianocobalamina preparadas que incorporan glicocolato de sodio de acuerdo con la presente invención (prueba G), formulación intranasal comercializada de pulverización de cianocobalamina (Nascobal-USA) y formulación de metilcobalamina de la presente invención (prueba F). Las fórmulas de Prueba F y Prueba G se describen en la tabla a continuación.

Tabla 7

Ingredientes	Prueba F	Prueba G
Metilcobalamina	500	--
Cianocobalamina	--	500
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg	1,00 mg
Glicocolato de Sodio	1,00 mg	1,00 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml	c.s. para 0,1 ml

Se midió la concentración plasmática de metilcobalamina, así como la vitamina B1 total para evaluar el efecto de la administración de metilcobalamina sobre cianocobalamina para formulaciones intranasales. El Spray Nasal Nascobal® es una solución de cianocobalamina en forma de spray para el suministro a la mucosa nasal. Cada botella de Spray Nasal Nascobal contenía 2,3 ml de una solución de 500 mg / 0,1 ml de cianocobalamina con citrato de sodio, ácido cítrico, glicerina y cloruro de benzalconio en agua purificada. Se ensayó la formulación comercial de cianocobalamina (Nascobal) y luego las formulaciones de prueba F y G se prepararon de acuerdo con la presente invención para incorporar cantidades equivalentes de metilcobalamina y cianocobalamina, respectivamente, para comparar con precisión la biodisponibilidad de las dos formulaciones. Se encontró que el pH de Nascobal era 5 y, por lo tanto, el pH de la formulación de cianocobalamina de la presente invención (Prueba G) se ajustó a aproximadamente 4.96. Los resultados del estudio de bioequivalencia se muestran a continuación, también en la Figura 6 y la Figura 7. El pH de la formulación de metilcobalamina se ajustó a 6.25 ± 0.25 .

Tabla 8

Prueba	Componente Medido	AUC _{0-t} (pg.hr / ml) (Línea de base corregida)
Prueba F	Metilcobalamina	43.376,84
	Total B12	47.913,54
Prueba G	Metilcobalamina	-3.314,79
	Total B12	67.567,87
Nascobal	Metilcobalamina	461,5
	Total B12	30.022,68

Sorprendentemente se descubrió que la formulación de cianocobalamina que contiene glicocolato de sodio preparado según la presente invención produjo más del doble de la biodisponibilidad de la Vitamina B12 total en comparación con la pulverización de cianocobalamina comercializada (Nascobal). Además, los niveles totales de vitamina B12 de la formulación de metilcobalamina de la presente invención (Prueba F) fueron significativamente mayores en comparación con Nascobal.

También se descubrió que la formulación de metilcobalamina de la presente invención (Prueba F) producía niveles significativamente más altos de metilcobalamina en comparación con otras dos formulaciones de cianocobalamina. Es pertinente observar únicamente la formulación de metilcobalamina según la presente invención, proporcionando altos niveles de metilcobalamina que es la coenzima activa de la vitamina B12.

- 5 Los resultados establecen inequívocamente que la formulación intranasal que comprende cianocobalamina con al menos un potenciador de la penetración, opcionalmente conservante, agente quelante, humectantes o una combinación de los mismos con un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 y una viscosidad de aproximadamente 1-200 CPS (mPas) proporciona aumentó significativamente la administración sistémica del fármaco dando como resultado una eficacia mejorada de la terapia sin comprometer el cumplimiento del paciente o la estabilidad de la formulación.

La invención se ejemplifica adicionalmente con los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Citrato Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua purificada	c.s. para 0,1 ml

- 10 El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se encontró que la viscosidad de la formulación era 1.28 CPS (mPas).

Ejemplo 2

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg
Glicocolato de Sodio	2,00 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Citrato Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua purificada	c.s. para 0,1 ml
pH Ajustado a	6.28

El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se encontró que la viscosidad de la formulación era 2.3 CPS (mPas).

Ejemplo 3

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg
Glicocolato de Sodio	1,00 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml

El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se encontró que la viscosidad de la formulación era 1.57 CPS (mPas).

Ejemplo 4

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg
Glicocolato de Sodio	1,50 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml

El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se encontró que la viscosidad de la formulación era 2.0 CPS (mPas).

5 Ejemplo 5

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg
Glicocolato de Sodio	0,50 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua	q.s. a 0,1 ml

El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se encontró que la viscosidad de la formulación era 1.43 CPS (mPas).

Ejemplo 6

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	5 mg
Glicofurol	30 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml

10 El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se encontró que la viscosidad de la formulación era 8 CPS (mPas).

Ejemplo 7

Ingredientes	Cantidades
Cianocobalamina	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg
Glicocolato de Sodio	1,00 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml

El pH de la formulación se ajustó a 4.5 ± 0.5 según la formulación comercial de cianocobalamina. Se observó que la viscosidad de la formulación era de 16 CPS (mPas).

5 **Ejemplo 8**

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	2,23 mg
Glicofurol	1,00 mg
Carbopol 934P	0.30 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Solución de NaOH (1% p/v)	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml

El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se encontró que la viscosidad de la formulación era 10 CPS (mPas).

Ejemplo 9

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	5 mg
Propilenglicol	10 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml

- 10 El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se observó que la viscosidad de la formulación estaba en el intervalo según la presente invención.

Ejemplo 10

Ingredientes	Cantidades
Metilcobalamina	500 mcg
Cloruro de Benzalconio	0,02 mg
Glicerina	5 mg
Polietilenglicol	15 mg
Citrato de Sodio Dihidratado	0,32 mg
Ácido Cítrico Anhidro (5% p/v)	c.s.
Agua	c.s. para 0,1 ml

El pH de la formulación se ajustó a 6.25 ± 0.5 y se observó que la viscosidad de la formulación estaba en el intervalo según la presente invención.

- 5 Se pueden preparar composiciones de viscosidades sustancialmente más altas cuando se aumenta el nivel de carbopol, polietilenglicol.

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa intranasal estable que comprende metilcobalamina en una concentración de 500 mcg / 0,1 ml a 1.500 mcg / 0,1 ml, codisolventes / solubilizantes o mezclas de los mismos en agua, en donde el codisolvente / solubilizante se selecciona de glicofurol, propilenglicol, polietilenglicoles, o mezclas de los mismos, opcionalmente un potenciador de la penetración, y en donde el pH de la composición es de 6 a 6.5 y una viscosidad de 1 a 200^{mPas}.
2. Una composición acuosa intranasal estable que comprende cianocobalamina en una concentración de 500 mcg / 0,1 ml a 1.500 mcg / 0,1 ml, codisolventes / solubilizantes o mezclas de los mismos en agua, y al menos un potenciador de la penetración, en donde el codisolvente / solubilizante se selecciona de glicofurol, propilenglicol, polietilenglicoles, o mezclas de los mismos, en donde el potenciador de la penetración se selecciona de sales biliares tales como glicocolato de sodio y en donde el pH de la composición es de 4 a 6 y una viscosidad de 1 a 200^{mPas}.
3. Una composición intranasal estable según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los codisolventes / solubilizantes están en el intervalo de 1 a 35% p/v.
4. Una composición intranasal estable según las reivindicaciones 1 y 2, en la que la cantidad de potenciador de la penetración es de hasta el 2,5% p/v de la composición.

Figura 1. Concentración media de Mecobalamina (pg/ml) vs. el Tiempo para la dosis de 1.500 mcg.

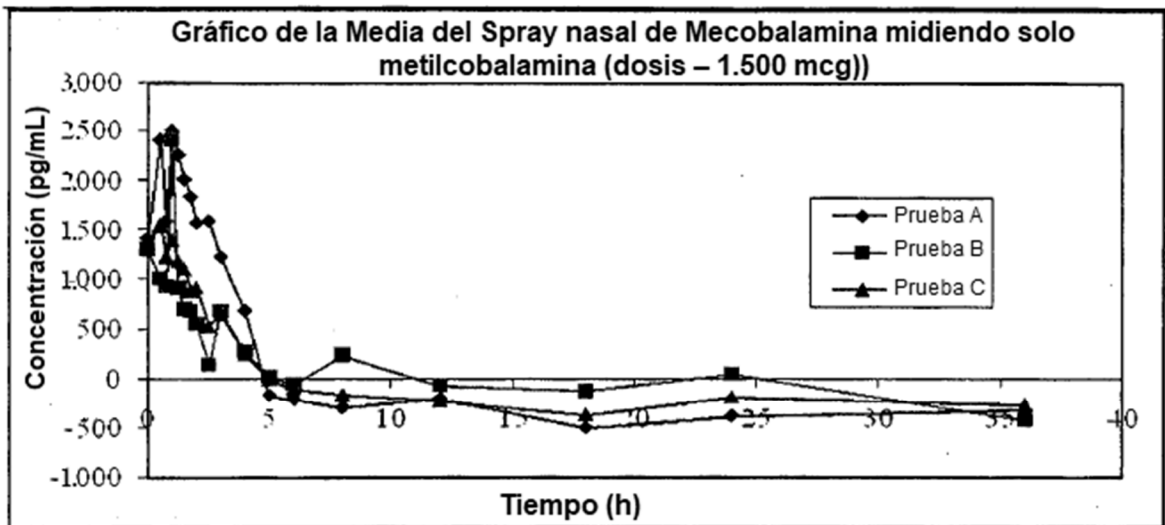


Figura 2. Concentración media de Mecobalamina (pg/ml) vs. el Tiempo para la dosis ajustada a 500 mcg.

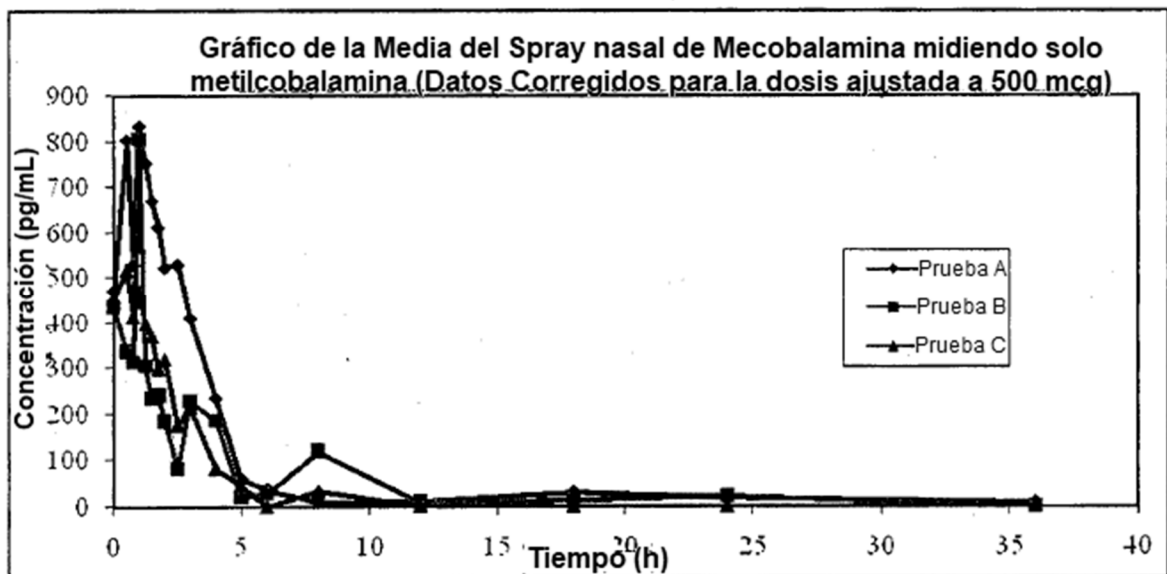


Figura 3. Gráfico de la Media del Spray nasal de Mecobalamina midiendo Metilcobalamina

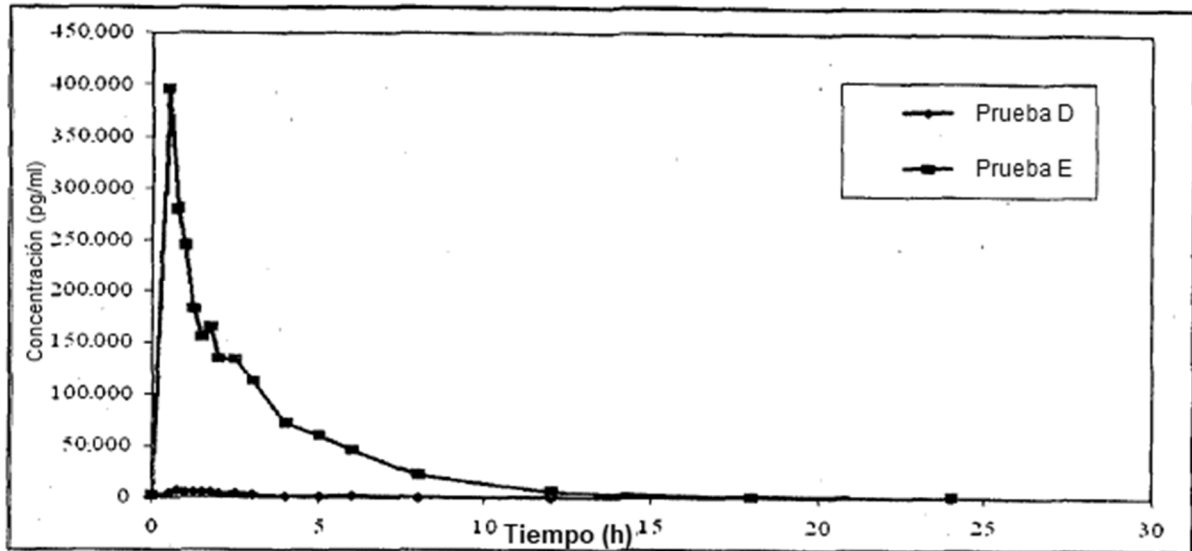


Figura 4. Gráfico de la Media del Spray nasal de Mecobalamina midiendo Total de B12

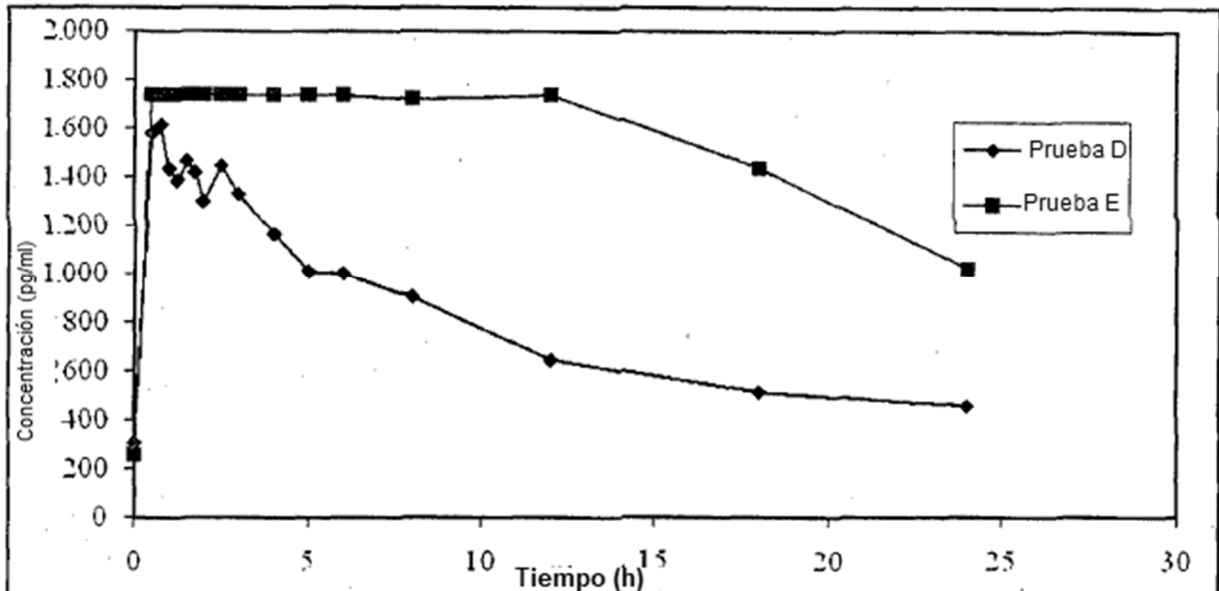


Figura 5. Gráfico de la Media del Spray nasal de Mecobalamina midiendo Total de B12

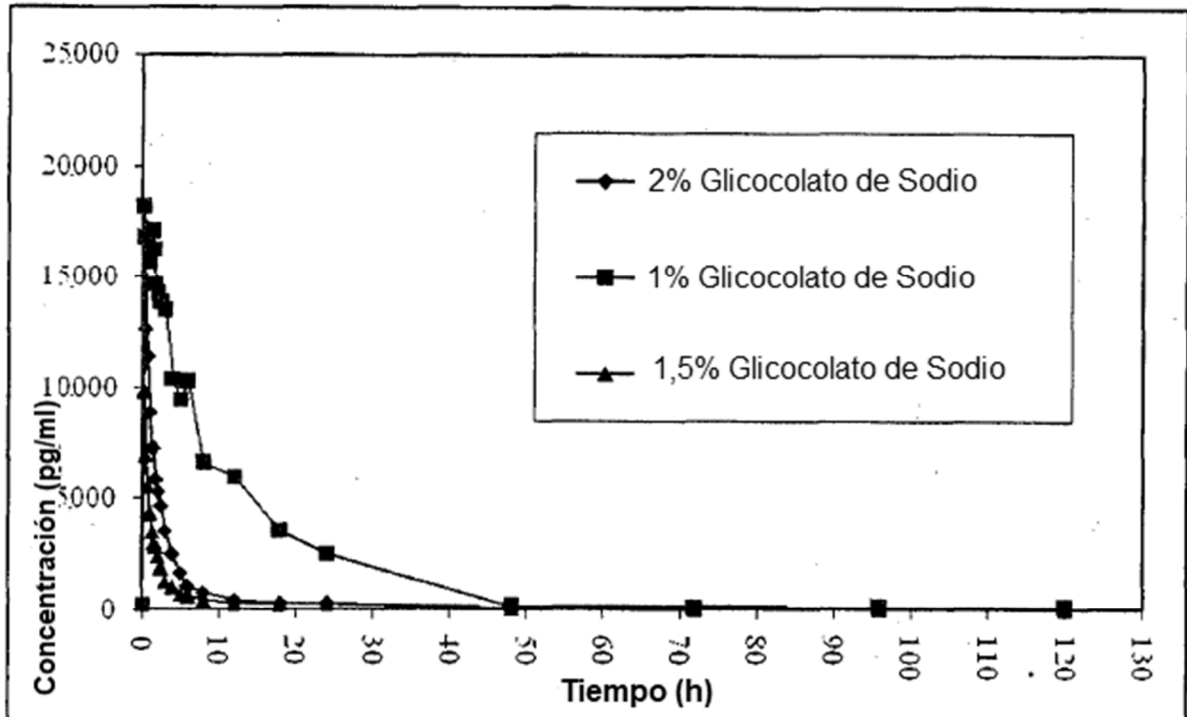


Figura 6. Gráfico de la Media del Spray nasal de Mecobalamina midiendo Total Vitamina B12

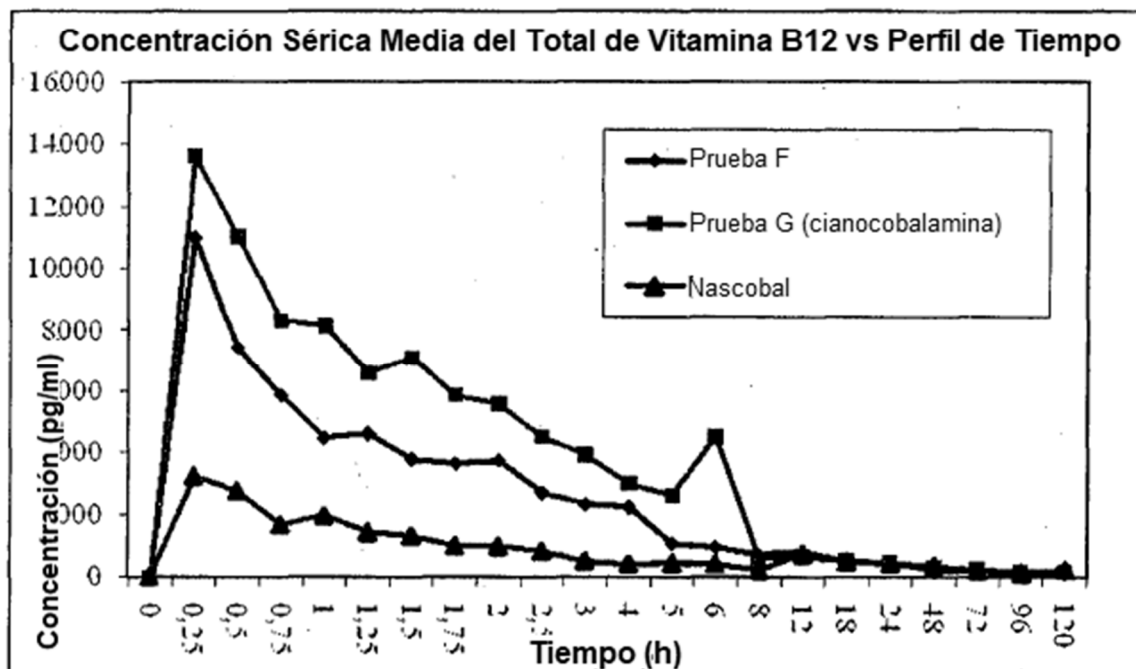


Figura 7. Gráfico de la Media del Spray nasal de Mecobalamina midiendo Metilcobalamina

