

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 348**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2014 PCT/EP2014/001152**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177273**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2014 E 14721211 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2991618**

54 Título: **Composición farmacéutica estable de alta resistencia de levoleucovorina**

30 Prioridad:

30.04.2013 EP 13002298

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

09.07.2019

73 Titular/es:

**APROFOL AG (100.0%)
Brülisauerstrasse 18
9050 Appenzell Steinegg, CH**

72 Inventor/es:

ULMANN, MARTIN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 719 348 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

Composición farmacéutica estable de alta resistencia de levoleucovorina

5 Esta invención se refiere a composiciones acuosas farmacéuticas estables de alta resistencia que contienen levoleucovorina.

Las sales de levoleucovorina, en particular, levoleucovorina de calcio, son sustancias farmacéuticas que contienen 5-formil-(6S)-tetrahidrofolato o ácido levofolínico.

10 La administración de levoleucovorina es útil como antídoto para fármacos que actúan como antagonistas del ácido fólico y como inhibidores de la dihidrofolato reductasa. La levoleucovorina se usa también en quimioterapia de combinación con 5-FU en el tratamiento de paciente con, por ejemplo, cáncer colorrectal metastásico. En quimioterapia del cáncer, típicamente la levoleucovorina se administra por vía intravenosa en 5 a 10 mg de ácido levofolínico por mililitro de solución acuosa. La estabilidad de estas soluciones acuosas está limitada debido a la degradación oxidativa que produce compuestos de degradación casi insolubles y, por tanto, precipitados. De forma más importante, la levoleucovorina y, específicamente, su sal de calcio, tienen una baja solubilidad en agua y tienden a formar soluciones supersaturadas que probablemente forman precipitados durante almacenamiento. Por lo tanto, las soluciones acuosas son inestables y pueden formar precipitados durante la manipulación y el almacenamiento. El aspecto de dichos precipitados en productos farmacéuticos pretendidos para administración intravenosa constituye "materia particulada", un defecto de calidad crítico y un riesgo significativo para pacientes, que provoca una retirada de los productos farmacéuticos afectados. La degradación oxidativa del levoleucovorina se minimiza si la solución inicial se liofilia en un manto de nitrógeno y se envasa en viales como polvo liofilizado. El producto entonces se reconstituye antes de su uso con un diluyente (por ejemplo, agua para inyección, cloruro de sodio al 0,9 % o solución de dextrosa al 5 %). Sin embargo, la solubilidad limitada restringe la preparación de composiciones de alta resistencia, para la forma de "solución lista para su uso", así como la forma de "polvo liofilizado" reconstituida. En vista de estos problemas de estabilidad, muchos de los productos farmacéuticos que contienen levoleucovorina se usan como soluciones reconstituidas hechas de "polvo liofilizado". Hay soluciones "listas para su uso" en el mercado que requieren un estricto control de cadena de frío durante el ciclo de distribución completo (por ejemplo, transporte, depósito, almacenamiento). La vida útil de los productos farmacéuticos está directamente relacionada con el grado de degradación oxidativa de la sustancia farmacéutica, y con la precipitación de productos de degradación menos solubles. La solubilidad acuosa limita y la posibilidad de precipitación dictamina la concentración limitada de la sustancia farmacéutica en la formulación y la solución reconstituida. Las razones principales para la formación de materia particulada son: la cristalización de la sustancia farmacéutica en la solución supersaturada y la degradación de la sustancia farmacéutica que forma compuestos menos solubles que precipitan, produciendo ambos materia particulada.

El documento US 2007/0099866 propone una composición farmacéutica estable de 5,10-metileno-tetrahidrofolato con citrato formulado en un intervalo de pH entre 7,5 y 10,5. Las formulaciones son particularmente adecuadas para producir soluciones de liofilización y liofilizados o polvos secos y mezclas secas. Los liofilizados deben reconstituirse añadiendo diluyentes adecuados para prepararlos para administración intravenosa. Una preparación acuosa para inyección se divulga en el documento EP 1640008 que consiste en ácido 5-formil-(6S)-tetrahidrofólico con un material de basificación o un agente tamponante y un antioxidante, por ejemplo, ácido ascórbico. El documento US 4931441 divulga una solución acuosa de leucovorina de calcio (sal de calcio del ácido 5-formil-(6R,S)-tetrahidrofólico) en la cantidad de 6,35 mg/ml de solución (5 mg/ml como ácido libre). La concentración baja de la solución reduce el beneficio de la medicación durante la administración. Una composición acuosa estable e inyectable que comprende una sal de ácido fólico o leucovorina se describe en el documento EP 0416232. El compuesto alcohol bencílico es necesario para conservar y estabilidad la composición.

50 Para uso terapéutico, dichas composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz suficiente para el tratamiento de pacientes. Como se indica en este documento, es importante en la preparación de soluciones inyectables acuosas, que estos productos farmacéuticos se pongan a disposición del paciente en una forma estable de alta resistencia sin el riesgo de formación de materia particulada. De acuerdo con la presente invención, las composiciones definidas en la reivindicación independiente 1 se han desarrollado para cumplir dichos requisitos. Las realizaciones preferidas están sometidas a las reivindicaciones dependientes.

La expresión "producto farmacéutico", como se usa en este documento, significa una forma galénica acabada, por ejemplo, comprimido, cápsula o solución, que contiene una sustancia farmacéutica, generalmente, aunque no necesariamente, en asociación con uno o más ingredientes diferentes.

60 La expresión "sustancia farmacéutica" o "ingrediente farmacéutico activo (API)", como se usa en este documento, significa un ingrediente activo que está destinado a otorgar actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedad o a lograr la estructura o cualquier función del organismo humano.

65

El término "estable", como se usa en este documento, significa que la solución que comprende los folatos reducidos no forma ningún precipitado y/o cristal durante un periodo prolongado de tiempo, es decir, durante un periodo de tiempo de, por ejemplo, tres años. La estabilidad, por tanto, se refiere a la estabilidad de la solución para permanecer libre de materia particulada durante el periodo completo de su vida útil. Se encuentran detalles adicionales sobre la estabilidad de los productos farmacéuticos en "Guidance for Industry", Q1A (R2) "Stability Testing of New Drug Substances and Products" (noviembre de 2003), sección 2.2, en particular 2.2.5 "Specification" y 2.2.7 "General Case". Para la determinación de materia particulada, puede usarse un ensayo de recuento de partículas microscópicas como se describe en Particulate Matter in Injections, United States Pharmacopeial Convention, Revision Bulletin, Official 1 de julio de 2012.

La expresión "alta resistencia", como se usa en este documento, se refiere a soluciones que comprenden al menos 7 mg/ml de levoleucovorina (calculada como ácido libre).

Las composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden la sal de calcio, la sal de magnesio o la sal de cinc de levoleucovorina, y uno o más de los compuestos gluconato de sodio, gluconato de potasio, lactato de sodio, lactato de potasio, sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato. Las composiciones comprenden opcionalmente un compuesto tamponante farmacéuticamente aceptable y/o un compuesto antioxidante farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos más preferidos son gluconato de sodio, gluconato de potasio, sal de disodio de glicerofosfato y sal de dipotasio de glicerofosfato. Los compuestos menos preferidos son la sal de sodio y la sal de potasio de lactato.

En una realización preferida, la composición de acuerdo con la presente invención comprende un compuesto tamponante seleccionado del grupo que consiste en trometamol (tris(hidroximetil)aminometano) y HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperacina]etanosulfónico). El trometamol es el compuesto tamponante preferido. El tamponamiento de las composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la presente invención en el intervalo preferido de pH 7,4 a pH 8,1 estabiliza significativamente la composición acuosa y reduce enormemente la formación de materia particulada.

En otra realización preferida, la composición comprende el compuesto tamponante en un intervalo de concentración de 5 a 50 mM, preferiblemente en un intervalo de concentración de 10 a 25 mM.

En una realización preferida adicional, la composición comprende un compuesto antioxidante seleccionado del grupo de tioglicerol, ditiotreitól (DTT) y cisteína. El compuesto antioxidante más preferido es tioglicerol, mientras que la cisteína es el compuesto antioxidante menos preferido. La cantidad preferida del compuesto antioxidante está en el intervalo de un 0,1 % a un 1,0 % (p/v), más preferiblemente en el intervalo de un 0,3 % a un 0,8 % (p/v), mucho más preferiblemente en el intervalo de un 0,4 % a un 0,6 % (p/v).

La cantidad de tioglicerol en la composición acuosa farmacéutica está en el intervalo de un 0,1 % a un 1,0 % (p/v). Preferiblemente la cantidad de tioglicerol está en el intervalo de un 0,3 % a un 0,8 % (p/v), más preferiblemente en el intervalo de un 0,4 % a un 0,6 % (p/v).

Las composiciones de acuerdo con la presente invención son composiciones acuosas que comprenden levoleucovorina como se divulga anteriormente. Las composiciones acuosas permanecen estables durante periodos prolongados de tiempo en condiciones de almacenamiento refrigeradas o a temperatura ambiente. Incluso después de periodos prolongados, no se observa precipitación o cristalización. Los periodos de almacenamiento típicos, a temperaturas ambiente de 15 ° a 25 °C o refrigeradas a temperaturas de 2 ° a 8 °C pueden prolongarse para los ensayos, a modo de ejemplo, más de 7, 15, 30, 60 o 120 días y, en la práctica, puede durar hasta el final de la vida útil, por ejemplo, 12, 24 o 36 meses. La solución acuosa puede rellenarse y almacenarse como un polvo seco por congelación (liofilizado) a reconstituir hasta una concentración establecida para su administración, o puede producirse en una concentración "lista para su uso" en recipientes como, por ejemplo, viales o ampollas. Los productos farmacéuticos en la forma final pueden administrarse por vía intramuscular o intravenosa. La composición puede contener o no, excipientes adicionales. Preferiblemente, las composiciones están libres de compuestos tales como alcohol bencílico. Pueden añadirse a las composiciones excipientes tales como manitol para la formación de torta aceptable durante el proceso de liofilización, o cloruro de sodio y dextrosa para ajustar la osmolaridad. El pH de las soluciones típicamente está en el intervalo de 6,5 a 8,5, preferiblemente en el intervalo de 7,4 a 8,1 y puede ajustarse durante la fabricación del producto farmacéutico con, por ejemplo, una pequeña cantidad de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La solución puede contener un compuesto tamponante y/o un antioxidante para evitar la degradación oxidativa de levoleucovorina.

Las composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la presente invención permanecen sorprendentemente estables durante un periodo prolongado de tiempo en términos de materia particulada a partir de la sustancia farmacéutica. La combinación preferida de sales de gluconato, lactato o glicerofosfato con un compuesto tamponante y/o un compuesto antioxidante mejora además la solubilidad de levoleucovorina y también estabiliza la levoleucovorina en composiciones acuosas, casi eliminando por tanto el riesgo de materia particulada causada por productos de degradación.

ES 2 719 348 T3

En la composición, al menos un compuesto adicional, como la sal de calcio, la sal de magnesio o la sal de cinc de levoleucovorina, ácido (6R,S)-tetrahidrofólico, ácido (6S)-tetrahidrofólico, 5,10-metileno-(6R,S)-tetrahidrofolato, 5,10-metileno-(6R)-tetrahidrofolato, 5-metil-(6R, S)-tetrahidrofolato o 5-metil-(6S)-tetrahidrofolato o una mezcla de 2 o 3 o más de dichos compuestos puede usarse.

Composiciones preferidas comprenden la sal de calcio levoleucovorina.

Composiciones preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más de los compuestos gluconato de sodio, gluconato de potasio, lactato de sodio, lactato de potasio, sal de dipotasio de glicerofosfato o sal de disodio de glicerofosfato. Las composiciones más preferidas comprenden uno o más de los compuestos gluconato de sodio, gluconato de potasio, sal de dipotasio de glicerofosfato o sal de disodio de glicerofosfato.

Respecto a las cantidades de los compuestos en las composiciones, se prefieren las siguientes relaciones. Las composiciones preferiblemente contienen para un mol de las sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina, de 0,8 a 6,0 moles, de forma ventajosa de 1,0 a 4,0 moles, de gluconato de sodio, gluconato de potasio, lactato de sodio o lactato de potasio. En una realización práctica, las composiciones preferiblemente contienen para un mol de las sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina, de 1,5 a 3,0 moles de gluconato de sodio o gluconato de potasio. Dicha composición puede contener para un mol de levoleucovorina un mínimo de 0,8, preferiblemente de 1,0 moles, ventajosamente 1,5 moles y un máxima de 6,0 moles, preferiblemente de 4,0 moles, ventajosamente 3,0 moles de gluconato de sodio, gluconato de potasio, lactato de sodio o lactato de potasio.

Otras composiciones preferiblemente contienen para un mol de las sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina, de 0,4 a 4,0 moles, preferiblemente de 0,5 a 3,0 moles, ventajosamente de 0,7 a 2,0 de sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato. dicha composición puede contener para un mol de levoleucovorina un mínimo de 0,4, preferiblemente de 0,5 moles, ventajosamente 0,7 moles y un máximo de 4,0 moles, preferiblemente de 3,0 moles, ventajosamente de 2,0 moles de sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato.

Las composiciones acuosas preferidas de acuerdo con la presente invención comprenden de 7 a 300 mg, preferiblemente de 10 a 100 mg, ventajosamente de 10 a 50 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina, en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre). En otras palabras, dichas composiciones pueden contener un mínimo de 7 mg y preferiblemente 20 mg y un máximo de 300, preferiblemente de 100 mg, ventajosamente de 50 mg, de sales de calcio, sales de magnesio y sales de cinc de levoleucovorina, en 1 ml de agua.

Las composiciones acuosas ventajosas comprenden de 7 a 100 mg, preferiblemente de 20 a 50 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina, en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre) y la cantidad de 0,8 a 6,0 molar, preferiblemente de 1,0 a 4,0 molar de gluconato de sodio, gluconato de potasio, lactato de sodio o lactato de potasio.

Otras composiciones acuosas ventajosas comprenden de 7 a 100 mg, preferiblemente de 20 a 50 mg, de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina, en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre) y la cantidad de 0,4 a 4,0 molar, preferiblemente de 0,5 a 3,0 molar de sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato.

Se prefieren composiciones acuosas farmacéuticas estables de alta resistencia que comprenden de 7 a 100 mg, ventajosamente de 20 a 50 mg/ml de la sal de calcio de levoleucovorina (levoleucovorina de calcio, calculada como el ácido libre) y la cantidad de 1,5 a 3,0 molar de gluconato de sodio.

Otra realización preferida es composiciones acuosas farmacéuticas estables de alta resistencia por las que la composición comprende de 50 a 300 mg, preferiblemente de 100 a 200 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales cinc de levoleucovorina, en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre) y una cantidad de 1,5 a 3,0 molar de gluconato de sodio, gluconato de potasio, lactato de sodio o lactato de potasio. Se prefiere gluconato de sodio y gluconato de potasio. Otras composiciones acuosas farmacéuticas estables de alta resistencia pueden comprender de 50 a 330 mg, preferiblemente de 100 a 200 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre) y una cantidad de 0,4 a 4,0 molar, preferiblemente de 0,5 a 3,0 molar de sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato. Todas estas composiciones muestran una concentración muy elevada de levoleucovorina. En la práctica, las composiciones tienen que reconstituirse con un diluyente, como un diluyente acuoso, antes de su uso o administración. Pueden usarse composiciones con una concentración muy alta en lugar de polvos liofilizados.

Los pesos de levoleucovorina dados anteriormente se calculan como el ácido libre.

Las composiciones de la invención pueden contener o no excipientes adicionales y antioxidantes, y podrían ajustarse hasta un pH de 6,5 a 8,5, preferiblemente hasta un pH de 7,4 a 8,1.

5 Las composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para fabricar un polvo liofilizado.

10 El polvo liofilizado es una forma galénica destinada para inyección preparada por liofilización ("secado por congelación"), un proceso que implica la eliminación de agua de los productos en estado congelado a presiones extremadamente bajas; esto está destinado para reconstitución posterior con líquido para crear una solución que se adapte en todos los aspectos a los requisitos para inyección. Aunque los polvos liofilizados hechos de composiciones acuosas farmacéuticas que comprende levoleucovorina de acuerdo con la presente invención pueden almacenarse a temperatura ambiente, las soluciones acuosas farmacéuticas "listas para su uso" se almacenan referiblemente en un refrigerador a 2 °C hasta 8 °C.

15 La presente invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos.

Ejemplos 1 a 19:

20 El siguiente método se usa para la preparación de los ejemplos 1 a 19 enumerados en la tala 1. La cantidad de (x) mg de la sal de calcio de levoleucovorina se disuelve a temperaturas de aproximadamente 20 °C en 10 ml de disolvente que contiene (y) ml del excipiente. La cantidad del excipiente se disuelve en primer lugar en 10 ml de agua purificada. Dependiendo de las condiciones, la temperatura se aumenta hasta aproximadamente 40 °C para obtener una solución transparente. La solución transparente se filtró con un filtro 0,45 µm y se dividió en dos partes. Una parte se almacena el refrigerador a 1 ° hasta 8 °C, la otra se mantiene a temperatura ambiente a 15 ° hasta 25 °C. Las condiciones de almacenamiento y los tiempos de almacenamiento aplicados se divulgan en las columnas "almacenamiento, temperatura ambiente" y "almacenamiento en refrigerador". Al final del periodo de ensayo, las muestras se comprueban y se clasifican. Se usa la clasificación "transparente", si la composición permanece transparente y no hay precipitación visible en el líquido de la muestra de ensayo. Se usa "crist." en caso de que haya un precipitado visible en el líquido o en el fondo del vial de ensayo. En un ensayo adicional, las muestras se almacenan durante 7 días y se siembran con unos pocos cristales de la sal de calcio de levoleucovorina. Se observan las características de cristalización 24 horas después de la siembra. En la columna "almacenamiento, refrigerador, siembra" se registran los resultados. Una clasificación "semillas" significa que permanecen los cristales de siembra, pero no inician una precipitación. Una clasificación "transparente" significa que los cristales de siembra se disuelven y la composición es transparente de nuevo.

35 En la tabla 1, 2 y 3 "Na-Glc" indica gluconato de sodio, "Na-Lac" indica lactato de sodio, "K-Glc" indica gluconato de potasio y "Gly" indica sal de disodio de glicerofosfato. "Tio" indica tioglicerol y "DTT" indica ditiotreititol.

40 La tabla 2 muestra los ejemplos 1 a 19, en los que el periodo de almacenamiento a temperatura ambiente se ha prolongado hasta dos meses. Los resultados demuestran que ninguno de los ejemplos muestra ninguna precipitación o materia particulada.

45 Para una cantidad limitada de ejemplos (n.º 11 a 18) el almacenamiento a 2 °C-8 °C (mencionado como almacenamiento en refrigerador) se ha hecho durante un periodo prolongado de tiempo. Después de 10 meses estos ejemplos aún no muestran ninguna precipitación o cristalización.

Ejemplo 20

50 Se suspenden 4,0 g de levoleucovorina de calcio 6,7 mmol) en 100 ml de agua. La suspensión se calienta hasta aproximadamente 40 °C para obtener una solución transparente. Se añade lentamente 1,5 g de aceto de cinc dihidrato (4,6 mmol) en 10 ml de agua. Se forma inmediatamente un precipitado. Después de un día, el precipitado se separa de las aguas madre. Rendimiento: 2,5 g de levoleucovorina de cinc (4,0 mmol) casi insoluble en agua. Se añaden 0,4 g de la levoleucovorina de cinc anterior a una solución que contiene 1,0 g de gluconato de potasio en 30 ml de agua. Después d 15 minutos, se obtiene una solución transparente que no forma precipitado durante 10 días a temperatura ambiente.

Ejemplo 21

60 Se disuelven 3,0 g de levoleucovorina de calcio a una temperatura de aproximadamente 20 °C en un disolvente que contiene 2,88 g de gluconato de sodio. La cantidad del excipiente se disuelve en primer lugar en 10 ml de agua purificada. Se obtiene una solución transparente a aproximadamente 25 °C. La solución transparente se filtra con un filtro de 0,45 µm y se divide en dos partes. Una parte se almacena en el refrigerador a 2 °C hasta 8 °C, la otra se mantiene a temperatura ambiente a 15 °C hasta 25 °C. No se produce precipitación o cristalización ni a temperatura ni a temperatura ambiente ni en el refrigerador.

65

Ejemplos 22 a 27:

ES 2 719 348 T3

Se usa el siguiente método para la preparación de los ejemplos 22 a 27 enumerados en la tabla 3.

- 5 Se disuelven (x) mg/ml de la sal de calcio levoleucovorina a temperaturas de aproximadamente 20 °C en 40 ml de disolvente que contiene (y) cantidad molar de gluconato de sodio. El excipiente se disuelve en primer lugar en 40 ml de agua purificada. Opcionalmente, se añade el compuesto tamponante y/o el antioxidante en la concentración dada.
- 10 Dependiendo de las condiciones, la temperatura se aumenta hasta aproximadamente 40 °C para obtener una solución transparente. El pH se ajusta hasta un intervalo entre 7,4 y 8,1 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La solución transparente se filtra con un filtro de 0,45 µm y se divide en diferentes partes. Una parte se almacena en el refrigerador a 4 °C, otra se mantiene a temperatura ambiente a 25 °C, respectivamente, a 40 °C (ensayo de sobrecarga). Las soluciones a 40 °C (ensayo de sobrecarga) se analizan con HPLC después de 60 días.
- 15 La tabla 3 muestra los resultados para los ejemplos 22 a 27. Las composiciones comprenden los compuestos indicados en la tabla 3. Las muestras se almacenaron durante 60 días a 40 °C (ensayo de sobrecarga). Después del periodo de almacenamiento, las muestras se analizan para medir la cantidad de levoleucovorina. Las muestras que comprenden levoleucovorina en solitario se usaron como comparación. La medición se realizó de acuerdo con el método descrito en la Farmacopea de Estados Unidos 35, monografía sobre comprimidos de leucovorina de calcio, páginas 3651-3652. En resumen, las muestras se analizaron por HPLC en columna RC-C18 (4,6 mm x 150 mm). La fase móvil era fosfato de tetrabutilamonio 0,005 M en agua y metanol (80:20) a un caudal de 2 ml/min. La detección se hizo por medición de UV a una longitud de onda de 254 nm. La cantidad de levoleucovorina se indica como porcentaje de la cantidad inicial. El ensayo cuantitativo se calculó de acuerdo con USP 35 (% p/v, patrón externo).
- 20

Tabla 1

N.º	Cantidad de levoleucovorina ("LL") (x) mg por 10 ml	Cantidad de levoleucovorina ("LL") en mg por ml, basado en el ácido libre	Excipiente ("E") Nombre	(y) mg por 10 ml	Relación mol de LL/mol de E	Almacenamiento temp. ambiente	Almacenamiento refrigerador	Almacenamiento refrigerador
						15 días	7 días	siembra
1	133	10	Na-Glc	48	1 a 1	transparente	transparente	semillas
2	333	25	Na-Glc	120	1 a 1	transparente	transparente	semillas
3	333	25	Na-Lac	103	1 a 1	transparente	transparente	semillas
4	666	50	Na-Glc	240	1 a 1	transparente	transparente	semillas
5	333	25	Na-Glc	240	1 a 2	transparente	transparente	transparente
6	666	50	Na-Glc	480	1 a 2	transparente	transparente	transparente
7	666	50	Na-Glc	240	1 a 1	transparente	transparente	semillas
8	666	50	Na-Glc	480	1 a 2	transparente	transparente	semillas
9	1333	100	Na-Glc	1440	1 a 3	transparente	transparente	transparente
10	1333	100	Na-Glc	960	1 a 2	transparente	transparente	transparente
11	333	25	Na-Glc	240	1 a 2	transparente	transparente	semillas
12	333	25	Na-Glc	480	1 a 4	transparente	transparente	transparente
13	666	50	Na-Glc	960	1 a 4	transparente	transparente	transparente
14	666	50	Na-Lac	417	1 a 2	transparente	transparente	semillas
15	666	50	K-Glc	520	1 a 2	transparente	transparente	semillas
16	333	25	Na-Lac	410	1 a 4	transparente	transparente	semillas
17	333	25	Gly	500	1 a 4	transparente	transparente	semillas
18	333	25	K-Glc	520	1 a 4	transparente	transparente	semillas
19	1333	100	Na-Glc	1920	1 a 4	transparente	transparente	transparente

ES 2 719 348 T3

Tabla 2

N.º	Cantidad de levoleucovorina ("LL")	Cantidad de levoleucovorina ("LL")	Excipiente ("E")		Relación	Almacenamiento	Almacenamiento
	(x) mg por 10 ml	en mg por ml, basado en el ácido libre	Nombre	(y) mg por 10 ml	mol de LL/mol de E	temperatura ambiente	temperatura ambiente
						15 días	2 meses
1	133	10	Na-Glc	48		transparente	transparente
2	333	25	Na-Glc	120	1 a 1	transparente	transparente
3	333	25	Na-Lac	103	1 a 1	transparente	transparente
4	666	50	Na-Glc	240	1 a 1	transparente	transparente
5	333	25	Na-Glc	240	1 a 2	transparente	transparente
6	666	50	Na-Glc	480	1 a 2	transparente	transparente
7	666	50	Na-Glc	240	1 a 1	transparente	transparente
8	666	50	Na-Glc	480	1 a 2	transparente	transparente
9	1333	100	Na-Glc	1440	1 a 3	transparente	transparente
10	1333	100	Na-Glc	960	1 a 2	transparente	transparente
11	333	25	Na-Glc	240	1 a 2	transparente	transparente
12	333	25	Na-Glc	480	1 a 4	transparente	transparente
13	666	50	Na-Glc	960	1 a 4	transparente	transparente
14	666	50	Na-Lac	417	1 a 2	transparente	transparente
15	666	50	K-Glc	520	1 a 2	transparente	transparente
16	333	25	Na-Lac	410	1 a 4	transparente	transparente
17	333	25	Gly	500	1 a 4	transparente	transparente
18	333	25	K-Glc	520	1 a 4	transparente	transparente
19	1333	100	Na-Glc	1920	1 a 4	transparente	transparente

Tabla 3

Estabilidad de soluciones de levoleucovorina					
Después de 60 días a 40 °C					
N.º	Concentración mg/ml	Excipiente	Tampón	Antioxidante	Ensayo
	como ácido levofolínico	Na-Glc	Trometamol		%
		relación molar	mg/ml		
22	10	sin	0	0	77,5
23	20	1:1,6	5	0,5 % de Tio	83,3
24	20	1:1,6	3	0,5 % de Tio	81,5
25	20	1:1,6	3	0,5 % de DTT	89,9
26	20	1:1,6	3	0,5 % de Cisteína	87,0
27	10	1:2	3	0,5 % de Tio	88,7

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición acuosa farmacéutica que contiene levoleucovorina, **caracterizada por que** la composición comprende la sal de calcio, la sal de magnesio o la sal de cinc de levoleucovorina y uno o más de los compuestos gluconato de sodio, gluconato de potasio, sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato, opcionalmente un compuesto tamponante farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un compuesto antioxidante farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. Composición acuosa farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la composición comprende el compuesto tamponante seleccionado del grupo que consiste en trometamol y HEPES.
- 15 3. Composición acuosa farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** la composición comprende el compuesto tamponante en un intervalo de concentración de 5 a 50 mM, preferiblemente en un intervalo de concentración de 10 a 25 mM.
- 20 4. Composición acuosa farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la composición comprende el compuesto antioxidante seleccionado del grupo de tioglicerol, ditiotreitól y cisteína en el intervalo de un 0,1 % a un 1,0 % (p/v), preferiblemente en el intervalo de un 0,3 % a un 0,8 % (p/v), más preferiblemente en el intervalo de un 0,4 % a un 0,6 % (p/v).
- 25 5. Composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la composición contiene para un mol de las sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina de 0,8 a 6,0 moles, preferiblemente de 1,0 a 4,0 moles, ventajosamente de 1,5 a 3,0 moles de gluconato de sodio o gluconato de potasio.
- 30 6. Composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la composición contiene para un mol de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina de 0,4 a 4,0 moles, preferiblemente de 0,5 a 3 moles, ventajosamente de 0,7 a 2,0 moles de sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato.
- 35 7. Composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la composición comprende de 7 a 300 mg, preferiblemente de 20 a 200 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre).
- 40 8. Composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la composición comprende de 7 a 100 mg, preferiblemente de 20 a 50 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina en un 1 ml de agua (calculada como el ácido libre) y una cantidad de 0,8 a 6,0 molar, preferiblemente de 1,0 a 4,0 molar de gluconato de sodio o gluconato de potasio.
- 45 9. Composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la composición comprende de 7 a 100 mg, preferiblemente de 20 a 50 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre) y una cantidad de 0,4 a 4,0 molar, preferiblemente de 0,5 a 3,0 molar, de sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato.
- 50 10. Composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la composición comprende de 7 a 100 mg, preferiblemente de 20 a 50 mg de la sal de calcio de levoleucovorina (levoleucovorina de calcio, calculada como el ácido levofolínico libre) y una cantidad de 1,5 a 3,0 molar de gluconato de sodio o gluconato de potasio.
- 55 11. Composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la composición comprende de 50 a 300 mg, preferiblemente de 100 a 200 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre) y una cantidad de 1,5 a 3,0 molar de gluconato de sodio o gluconato de potasio.
- 60 12. Composiciones acuosas farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizadas por que** la composición comprende de 50 a 300 mg, preferiblemente de 100 a 200 mg de sales de calcio, sales de magnesio o sales de cinc de levoleucovorina en 1 ml de agua (calculada como el ácido libre) y una cantidad de 0,4 a 4,0 molar, preferiblemente de 0,5 a 3,0 molar de sal de disodio de glicerofosfato o sal de dipotasio de glicerofosfato.
13. Uso de una composición acuosa farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la fabricación de un polvo liofilizado.