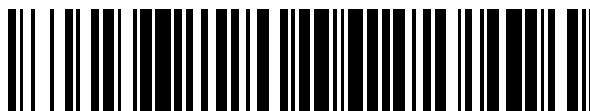


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 605**

51 Int. Cl.:

A61K 47/69 (2007.01)

A61K 31/4188 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61P 11/16 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

A61K 31/724 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2011** **PCT/NL2011/050366**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011** **WO11149349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011** **E 11723744 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019** **EP 2575892**

54 Título: **Formulaciones de 2-iminobiotina y usos de las mismas**

30 Prioridad:

26.05.2010 EP 10163925

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

11.05.2020

73 Titular/es:

NEUROPHYXIA B.V. (100.0%)
Onderwijsboulevard 225
5223 DE 's-Hertogenbosh, NL

72 Inventor/es:

LEUFKENS, PAUL WILLEM THERESIA JOSEF

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 759 605 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

Formulaciones de 2-iminobiotina y usos de las mismas.

Campo de la invención

- 5 La divulgación se refiere a mejorar la solubilidad acuosa de 2-iminobiotina. En un aspecto particular, la invención se refiere a formulaciones apropiadas para la administración de 2-iminobiotina a mamíferos que padecen trastornos o afecciones que se benefician de dicha administración.

Antecedentes de la invención

- 10 Se ha informado que la 2-iminobiotina se puede usar para prevenir y/o tratar los efectos de la asfisia perinatal (hipoxia-isquemia) en neonatos (Patente de los Estados Unidos No. 6,894, 069). En particular, los estudios en vivo con lechones demostraron que la 2-iminobiotina es más eficaz para prevenir y/o tratar estos efectos que ya sea el alopurinol o la deferoxamina.

El documento WO01/74351A1 describe de manera general composiciones farmacéuticas de 2-iminobiotina para su uso en la prevención o el tratamiento de los efectos de la asfisia perinatal.

- 15 La baja solubilidad de la 2-iminobiotina a pH fisiológico, sin embargo, limita su utilidad como agente terapéutico. Existe una necesidad en la técnica de formulaciones mejoradas de 2-iminobiotina y métodos para aumentar su solubilidad. La presente divulgación proporciona tales mejoras.

Resumen de la invención

- 20 Un aspecto de la divulgación proporciona una formulación acuosa, soluble de 2-iminobiotina (2-IB) que tiene un pH entre alrededor de 3 y alrededor de 7, y que comprende alrededor de 1 mg/ml o más de 2-iminobiotina y entre alrededor de 2.5 a alrededor de 40% de una beta-ciclodextrina sustituida.

En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH entre alrededor de 4 y alrededor de 7, y que comprende alrededor de 2 mg/ml o más de 2-iminobiotina y alrededor de 2.5 a alrededor de 20% de una beta-ciclodextrina sustituida, preferiblemente seleccionada entre sulfobutil-éter-beta-ciclodextrina (SBE-CD) e hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP-CD).

- 25 En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH entre alrededor de 4 y alrededor de 5, y que comprende alrededor de 3.5 mg/ml o más de 2-iminobiotina y entre alrededor de 2.5 a alrededor de 40, preferiblemente entre alrededor de 5 alrededor de 10% de una beta-ciclodextrina sustituida, preferiblemente seleccionada entre sulfobutil-éter-beta-ciclodextrina (SBE-CD) e hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP-CD)

- 30 En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH entre alrededor de 4 y alrededor de 5 y que comprende entre alrededor de 3 a alrededor de 5 mg/ml, preferiblemente entre alrededor de 4 a alrededor de 5 mg/ml de 2-iminobiotina, y alrededor de 2.5 a alrededor de 5% de una beta-ciclodextrina sustituida, preferiblemente seleccionada entre sulfobutil-éter-beta-ciclodextrina (SBE-CD) e hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP-CD). Preferiblemente, la formulación comprende además ácido cítrico o una versión desprotonada del mismo (citrato) como potenciador de la solubilidad.

- 35 En algunas realizaciones, se proporciona una formulación soluble de 2-iminobiotina o un derivado de la misma que tiene un pH de alrededor de 5 y que comprende alrededor de 3 mg/ml o más de 2-iminobiotina y alrededor de 3 a alrededor de 40%, preferiblemente alrededor de 5% de SBE-CD.

- 40 En algunas realizaciones, se proporciona una formulación soluble de 2-iminobiotina que tiene un pH de alrededor de 4, y que comprende alrededor de 3 mg/ml o más de 2-iminobiotina y alrededor de 5 a alrededor de 40% de HP-CD. Preferiblemente, la formulación comprende de alrededor de 5 a alrededor de 20% de HP-CD.

En algunas realizaciones, las formulaciones comprenden además NaCl, preferiblemente entre 0.1 y 2%, más preferiblemente entre 0.5 y 0.8% como agente de isotonicidad.

- 45 Un aspecto adicional de la invención de la divulgación proporciona una formulación acuosa, soluble de 2-iminobiotina (2-IB) que tiene un pH entre alrededor de 3 y alrededor de 7, y que comprende alrededor de 0.75 mg/ml o más de 2-iminobiotina y ácido cítrico, una versión desprotonada de la misma, o una mezcla de los mismos. Sorprendentemente, se encontró que 2-IB tenía una mayor solubilidad en la solución reguladora de ácido cítrico. Como se usa en este documento, la solución reguladora de ácido cítrico se refiere al ácido cítrico, una versión desprotonada del mismo, o una mezcla de los mismos e incluye soluciones acuosas de, por ejemplo, citrato de sodio deshidratado.

- 50 Preferiblemente, dicha formulación tiene un pH entre alrededor de 3 y alrededor de 7, preferiblemente entre alrededor de 3 y alrededor de 6, más preferiblemente entre alrededor de 3.5 y alrededor de 4.5, incluso más preferiblemente alrededor de pH 4, y comprende entre alrededor de 0.5 mg/ml y alrededor de 10 mg/ml,

preferiblemente entre alrededor de 0.5 mg/ml y alrededor de 5 mg/ml de 2-iminobiotina, más preferiblemente entre alrededor de 0.5 mg/ml y alrededor de 2 mg/ml, incluso más preferiblemente entre alrededor de 0.5 mg/ml y alrededor de 1 mg/ml de 2-iminobiotina y ácido cítrico, una versión desprotonada de los mismos o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, las formulaciones comprenden entre aproximadamente 1 a aproximadamente 40, aproximadamente 5 a aproximadamente 30, preferiblemente aproximadamente 10 a aproximadamente 20, más preferiblemente aproximadamente 12.5 a aproximadamente 17.5 mM, incluso más preferiblemente alrededor de ácido cítrico 15mM, una versión desprotonada del mismo o una mezcla del mismo. Para una persona experta está claro que la cantidad de solución reguladora se puede ajustar para obtener el nivel de pH deseado. Preferiblemente, dicha formulación comprende entre 0.1 y 2% de NaCl como agente de isotonicidad, más preferiblemente entre 0.5 y 1.5%. Una formulación de ejemplo tiene una concentración de aproximadamente 0.9% de NaCl.

Preferiblemente, la formulación es apropiada para la administración a un neonato humano. Preferiblemente, la 2-iminobiotina permanece soluble durante al menos 3 días a 5 °C. En algunas realizaciones, la 2-iminobiotina permanece soluble durante al menos 0.5, 1, 1.5, 2 o 3 años a 5 °C.

Otro aspecto de la divulgación proporciona una formulación acuosa de 2-iminobiotina como se define en las reivindicaciones, uso en el tratamiento de los efectos de complicaciones durante el parto, preferible para tratar la asfisia perinatal o el riesgo de la misma, en un neonato. La formulación se puede administrar al neonato. La formulación se puede administrar a la madre del neonato antes y/o durante el parto.

Otro aspecto de la divulgación proporciona una formulación acuosa de 2-iminobiotina o un derivado de la misma, para uso en el tratamiento de los efectos de complicaciones durante el parto, preferiblemente para tratar la asfisia perinatal o el riesgo de la misma, en el que el tratamiento se combina con someter el neonato a la hipotermia.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona métodos para preparar las formulaciones como se define en las reivindicaciones que comprenden las etapas de disolver 2-iminobiotina en una solución acuosa que comprende una beta-ciclodextrina seguido de ajustar el pH de la solución dando como resultado una solución de 2-iminobiotina o un derivado de la misma. Preferiblemente, el pH de la solución de 2-iminobiotina se ajusta usando ácido cítrico. Preferiblemente, el pH se ajusta entre alrededor de 3 a alrededor de 7. Preferiblemente, la solución acuosa está entre pH 4 y 6.6. Preferiblemente, la beta-ciclodextrina es SBE-CD. Preferiblemente, la solución acuosa comprende NaCl. Preferiblemente, la solución acuosa comprende ácido cítrico o una versión desprotegida del mismo.

Descripción detallada de las realizaciones descritas

La 2-iminobiotina (2-IB) tiene poca solubilidad en agua y, por lo tanto, es difícil de formular como una solución acuosa para la administración (véanse los ejemplos comparativos). De acuerdo con la presente divulgación, se ha encontrado que la solubilidad en agua de 2-IB se puede aumentar lo suficiente como para permitir que se formule como una solución acuosa mediante la adición de 2-IB a una solución reguladora de ácido cítrico/citrato y/o un beta-ciclodextrina sustituida. Los términos "insoluble" y "poco soluble" se usan en este documento para caracterizar un fármaco con respecto a su solubilidad en agua. Como se usa en este documento, insoluble se refiere a una solubilidad de menos de 0.1 mg/ml y poco soluble se refiere a una solubilidad en el intervalo de 0.1 a 1 mg/ml.

La solubilidad de 2-IB depende del pH. La solubilidad de 2-IB en agua es de alrededor de 0.34 mg/ml a pH 7.4, de alrededor de 0.59 mg/ml a pH 5 y alrededor de 4.5 mg/ml a pH 3.5. Ya que la administración de soluciones de pH bajo por vía intramuscular puede provocar dolor en un sujeto (Rukwied R., J Pain. 2007 May;8(5):443-51) y puede provocar acidosis metabólica cuando se administra como una infusión intravenosa continua (Federman MD, Clinical Neuropharmacology 2009 Nov-Dec;32(6):340-1), un objeto de la divulgación es proporcionar formulaciones de 2-IB con un pH y una concentración de 2-IB apropiados para la administración en un entorno terapéutico.

En el tratamiento de afecciones asociadas con, por ejemplo, asfisia o hipoxia, se necesita administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de fármaco dentro de un período de tiempo específico para que sea eficaz. Con las formulaciones presentes en la técnica anterior, se necesita administrar un volumen significativo de solución de 2-IB debido a la baja solubilidad de 2-IB. Cuanto mayor sea el volumen de solución necesario para administrar, mayor será el tiempo antes de que se alcance una concentración terapéuticamente eficaz en el cuerpo. Para algunas aplicaciones, tales como el tratamiento de neonatos, el volumen de solución necesario para administrar dentro de la ventana terapéutica es un factor limitante. Por lo general, la cantidad máxima de líquido a considerar, salvo para administrar por vía intravenosa a un neonato asfisiado, es de 50 ml/kg/día. Al aumentar la solubilidad de 2-IB, el fármaco se puede administrar más rápidamente y en un volumen menor.

Las formulaciones de 2-IB deberían, de manera óptima, ser estables durante largos períodos de tiempo, preferiblemente durante varios años. Además, las formulaciones no deben precipitarse cuando se almacenan frías, tal como 5 grados C.

Se produjeron diversas formulaciones de fármacos usando una variedad de disolventes, codisolventes, surfactantes, ciclodextrinas y otros excipientes. La solubilidad de 2-IB era baja o la formulación era tóxica (véanse los ejemplos comparables). Sorprendentemente, la formulación de 2-IB con más del 1% de beta-ciclodextrinas sustituidas, en

particular con 2.5% o más, y/o con soluciones reguladoras de ácido cítrico proporcionó soluciones con mayor solubilidad a niveles de pH apropiados.

Las ciclodextrinas varían en estructura y propiedades. Por ejemplo, el tamaño (por ejemplo, diámetro y profundidad) y la funcionalidad (por ejemplo, hidrofobicidad, carga, reactividad y capacidad de enlace de hidrógeno) de la cavidad hidrófoba varía entre alfa, beta y gamma-ciclodextrinas sustituidas y no sustituidas. El término "ciclodextrina" se refiere a un compuesto que incluye unidades de D-glucopiranosas unidas, alfa cíclicas. La alfa-ciclodextrina se refiere a una ciclodextrina con 6 unidades de D-glucopiranosas unidas cíclicas, la beta-ciclodextrina tiene 7 unidades de D-glucopiranosas unidas, cíclicas, y la gamma-ciclodextrina tiene 8 unidades de D-glucopiranosas unidas, cíclicas. Estas unidades de D-glucopiranosas cíclicas, unidas definen una cavidad hidrófoba, y se sabe que las ciclodextrinas forman compuestos de inclusión con otras moléculas orgánicas, con sales y con halógenos ya sea en estado sólido o en soluciones acuosas. Por lo general, una ciclodextrina seleccionada para una formulación tiene un tamaño y una funcionalidad que es apropiada para el componente diana y los otros componentes de la formulación. Desafortunadamente, hay muchos fármacos para los cuales la formación de complejos de ciclodextrina no es posible o no produce ventajas aparentes (J. Szejtli, Cyclodextrins in Drug Formulations: Part II, Pharmaceutical Technology, 24-38, August, 1991).

Las ciclodextrinas sustituidas pueden incluir como cadenas laterales cualquier unidad estructural orgánica o una unidad estructural heteroorgánica. Las ciclodextrinas preferidas incluyen beta-ciclodextrinas sustituidas que se han alquilado, hidroxialquilado o reaccionado para formar un sulfoalquil éter. Las beta-ciclodextrinas preferidas incluyen hidroxipropil-beta-ciclodextrina, por ejemplo, (S)-2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, 2-O-[(S)-2'-hidroxilpropil]-beta-ciclodextrina, 2-O-[(R)-2'-hidroxilpropil]-beta-ciclodextrina, 6-O-[(S)-2'-hidroxilpropil]-beta-ciclodextrina, 2-O-[(R)-2', 3'-hidroxilpropil]-beta-ciclodextrina; hidroxietil-beta-ciclodextrina; carboximetil-beta-ciclodextrina; carboximetil-etil-beta-ciclodextrina; dietil-beta-ciclodextrina; dimetil-beta-ciclodextrina; glucosil-beta-ciclodextrina; hidroxibutenil-beta-ciclodextrina; maltosil-beta-ciclodextrina; y sulfobutíler-beta-ciclodextrina. Para las presentes formulaciones y métodos, se cree que las beta-ciclodextrinas sustituidas, tales como, por ejemplo, hidroxipropil-beta-ciclodextrina y sulfobutíler-beta-ciclodextrina tienen un tamaño y una funcionalidad que complementan los otros componentes de la formulación. Más preferiblemente, la ciclodextrina es sulfobutíler-beta-ciclodextrina ("SBE-CD").

Se probaron dos tipos de beta-ciclodextrinas sustituidas en las formulaciones de 2-IB. Ambos aumentaron notablemente la solubilidad de 2-IB. (Véanse los ejemplos) La sulfobutíler-beta-ciclodextrina (SBE-CD) es un derivado de beta-ciclodextrina polianiónico comercialmente disponible con una sal de sulfonato de sodio separada de la cavidad hidrófoba por un grupo espaciador de butil éter, o sulfobutíler (Captisol™ es el nombre comercial de sulfobutíler-beta-ciclodextrina hepta-sustituida disponible en CyDex Inc.). La hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP-CD) es un derivado de beta-ciclodextrina disponible comercialmente de Roquette Pharma S.A. como Kleptose™. Las ciclodextrinas se describen adicionalmente en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,134,127 y 5,376,645, cuyo contenido completo se incorpora aquí como referencia.

Las formulaciones de 2-IB descritas en este documento pueden estar formadas por mezclas físicas secas de 2-IB y la betaciclodextrina sustituida o sus complejos de inclusión en seco que, tras la adición de agua, se reconstituyen para formar una formulación acuosa. Alternativamente, la formulación acuosa puede liofilizarse y luego reconstituirse con agua.

En algunas realizaciones, las formulaciones de 2-IB descritas en este documento están en forma de una solución acuosa e incluyen una solución reguladora de ácido para ajustar el pH dentro del intervalo desde aproximadamente 4 a aproximadamente 7. Los ejemplos de soluciones reguladoras de ácidos apropiados para su uso en este documento incluyen ácidos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético, ácido metanosulfónico, ácido toluenosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido etanosulfónico y similares. También se pueden emplear sales ácidas de los ácidos anteriores. Preferiblemente, la formulación comprende suficiente ácido cítrico y/o citrato de sodio u otra sal de citrato para alcanzar el pH deseado. En algunas realizaciones, las formulaciones comprenden entre 1 y 25 mM de ácido cítrico. En algunas realizaciones, las formulaciones comprenden entre citrato de sodio 0.1 y 5 mM. En algunas realizaciones, las formulaciones comprenden al menos ácido cítrico/citrato 20 mM. Preferiblemente, las formulaciones comprenden entre aproximadamente 1 a aproximadamente 40, aproximadamente 5 a aproximadamente 30, preferiblemente aproximadamente 10 a aproximadamente 20, más preferiblemente aproximadamente 12.5 a aproximadamente 17.5 mM, una versión desprotonada de los mismos o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, las formulaciones comprenden alrededor de ácido cítrico 15 mM, una versión desprotonada del mismo o una mezcla de los mismos.

Las formulaciones de 2-IB descritas en este documento se pueden preparar de la siguiente manera: el ácido cítrico u otra solución reguladora de ácido se disuelve en agua para inyección. La beta-ciclodextrina sustituida (preferiblemente SBE-CD), si se usa, se disuelve en la solución de solución reguladora de ácido-agua. Luego se disuelve 2-IB en la solución. Alternativamente, la beta-ciclodextrina sustituida (preferiblemente SBE-CD), si se usa, se disuelve en una solución de agua, y luego se disuelve 2-IB en la solución. El pH se ajusta dentro del intervalo desde aproximadamente 3 a aproximadamente 6.

Las formulaciones se preparan y envasan preferiblemente para su uso como estériles y libres de pirógenos. Por ejemplo, la solución resultante se puede filtrar asépticamente, por ejemplo, a través de un filtro de membrana de 0.22 micras y rellenarse en viales estériles. Los viales se detienen y se sellan y se pueden esterilizar terminalmente. Las soluciones también se pueden proporcionar en ampollas, jeringas, bolsas IV u otros dispensadores. 5 Preferiblemente, la formulación se proporciona en una unidad de dosis única. Las soluciones se pueden esterilizar en autoclave sin afectar la estabilidad de 2-IB (Tabla 24).

También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

10 Las formulaciones de 2-IB destinadas a la administración pediátrica preferiblemente no comprenden excipientes contraindicados (por ejemplo, ácido láctico, docusato de sodio, propilenglicol, etc.). Preferiblemente, las formulaciones para administración pediátrica tampoco contienen alcohol bencílico, galato de propileno, polisorbato 20, 40 o 60, benzoato de sodio, timerosal, aceite de maní o ácido bórico. Está dentro del alcance de un experto en el arte seleccionar agentes adicionales apropiados.

15 Preferiblemente, las formulaciones de 2-IB son isotónicas. En algunas realizaciones, las formulaciones de 2-IB comprenden además NaCl, preferiblemente entre 0.1 y 0.9%, más preferiblemente entre 0.2 y 0.9%. En algunas realizaciones, las formulaciones de 2-IB comprenden además azúcares, tales como glucosa, lactosa o manitol, preferiblemente entre 1 y 5%, más preferiblemente entre 2 y 5%. Preferiblemente, en particular con una formulación pediátrica, el azúcar es glucosa. La formulación puede comprender una combinación de NaCl y azúcar en dicha 20 cantidad que la formulación es isotónica.

La divulgación proporciona soluciones y formas de dosificación de 2-IB apropiadas para, preferiblemente, la administración parenteral. La administración parental como se usa en este documento se refiere a modos de administración que incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, 25 intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal e infusión. Preferiblemente, las formulaciones son apropiadas para administración intravenosa.

Las formulaciones se pueden proporcionar en viales, ampollas, jeringas, bolsas IV u otros dispensadores. Se pueden administrar directamente a un sujeto o diluirse adicionalmente. Una dosis concentrada de una formulación proporcionada puede estar en un recipiente sellado que contenga una cantidad de la formulación que se empleará 30 durante un intervalo de tratamiento estándar tal como inmediatamente después de la dilución, o hasta 24 horas después de la dilución, según sea necesario. Se puede preparar una solución para administración intravenosa, por ejemplo, agregando una formulación de dosis concentrada a un recipiente (por ejemplo, botellas de vidrio o plástico, viales, ampollas) en combinación con diluyente para lograr la concentración deseada para la administración.

La adición de disolvente acuoso a un concentrado de dosis líquida se puede usar convenientemente para formar 35 dosis unitarias de formulaciones farmacéuticas líquidas eliminando porciones alícuotas o el contenido completo de un concentrado de dosis para dilución. La dosis concentrada se puede agregar a un recipiente intravenoso (IV) que contiene un disolvente acuoso apropiado. Los disolventes útiles son soluciones estándar para inyección (por ejemplo, dextrosa al 5%, solución salina, ringer lactato o agua estéril para inyección, etc.). Las bolsas IV de dosis unitarias típicas son recipientes convencionales de vidrio o plástico que tienen medios de entrada y salida y tienen 40 capacidades estándar (por ejemplo, 25 mL, 50 mL, 100 mL y 150 mL).

En otras realizaciones, puede ser deseable empaquetar una forma de dosificación proporcionada en un recipiente para proteger la formulación de la luz hasta su uso. En algunas realizaciones, el uso de dicho recipiente protector de la luz puede inhibir una o más rutas de degradación. Por ejemplo, un vial puede ser un recipiente ligero que protege el contenido de la exposición a la luz. Además y/o alternativamente, un vial se puede empaquetar en cualquier tipo 45 de recipiente que proteja una formulación de la exposición a la luz (por ejemplo, el embalaje secundario de un vial). De manera similar, cualquier otro tipo de recipiente puede ser un recipiente protector de luz o empacado dentro de un recipiente protector de luz.

Las formulaciones se pueden administrar a un sujeto, que incluye cualquier animal vertebrado, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano. Ejemplos de sujetos incluyen humanos, primates no humanos, 50 roedores, cobayas, conejos, ovejas, cerdos, cabras, vacas, caballos, perros, gatos, pájaros y peces.

En algunas realizaciones, las formulaciones de 2-IB son apropiadas para la administración a los recién nacidos, y en particular a los neonatos que sufren, se espera que sufran o que se considere que están en riesgo de complicaciones durante el parto, en particular de asfixia perinatal, que puede conducir a hipoxia-isquemia. La asfixia perinatal también puede ocurrir mucho antes del nacimiento o después y también es apropiada para el tratamiento 55 con las formulaciones de 2-IB descritas en este documento. Los términos "bebé recién nacido" y "neonato" incluyen bebés nacidos por parto natural, así como bebés que han sido dados a luz por cesárea, y también incluyen bebés que nacieron prematuramente y/o cuyo nacimiento ha sido inducido artificialmente.

En algunas realizaciones, las formulaciones de 2-IB son apropiadas para la administración a la madre del feto, cuando se espera un recién nacido asfíxiado. El término madre se refiere a la madre del feto o al bebé recién nacido, incluidas las madres naturales, inseminadas, inducidas y portadoras.

Por lo general, el tratamiento de un neonato con las formulaciones de 2-IB se llevará a cabo poco después del parto, por ejemplo, durante la "ventana" para la intervención terapéutica. Por lo general, esta ventana abarca el primer día después del parto y, en particular, las primeras 0-24 horas después del parto. Sin embargo, si se puede esperar un bebé asfíxiado, el tratamiento se puede realizar en la madre antes del parto esperado, en particular aproximadamente 0-24 h antes del parto.

Como parte de dicho tratamiento, las formulaciones de 2-IB generalmente se administrarán a los neonatos en una o más cantidades farmacéuticamente eficaces, y en particular en una o más cantidades que son eficaces para prevenir y/o tratar los efectos mencionados anteriormente. Tal tratamiento puede implicar solo una administración única, pero generalmente, y preferiblemente, implica administraciones múltiples durante varias horas o días, por ejemplo, como parte de o según un régimen de administración o régimen de tratamiento. Dicho régimen de tratamiento puede ser, por ejemplo, el siguiente: cada 4 horas, inyección intravenosa de la sustancia durante las primeras 24 horas.

Normalmente, la cantidad de 2-IB administrada al neonato corresponderá entre 0.01 y 30 mg por kg de peso corporal por día, preferiblemente entre 0.1 y 25 mg/kg por día, más preferiblemente entre 1.8 y 12 mg/kg/día. Estas cantidades se refieren al componente activo y no incluyen materiales portadores o adyuvantes tales como carbohidratos, lípidos o proteínas o similares. Estas cantidades se pueden administrar como una dosis única o como dosis múltiples por día, o esencialmente de forma continua durante un cierto período de tiempo, por ejemplo, por infusión continua. Preferiblemente, la 2-IB se administra en 3-6 dosis/día. Preferiblemente, 2-IB se administra a un neonato humano en una dosis de entre 0.01 a 1 mg/kg, preferiblemente entre 0.05 a 0.75 mg/kg, más preferiblemente entre 0.05 a 0.5 mg/kg. Las dosis de ejemplo son 0.075, 0.45 y preferiblemente 0.15 mg/kg.

El tratamiento puede continuar hasta 24, 48 o 72 horas después de la asfíxia, o hasta que se considere que el neonato ya no está en riesgo de los efectos mencionados anteriormente. Sin embargo, el tratamiento, especialmente el tratamiento preventivo también puede implicar la administración de la formulación 2-IB a la madre antes o durante la partición. La formulación se puede administrar a la madre, por ejemplo, por vía oral, subcutánea o por inyección intravenosa. Las cantidades que se van a administrar pueden ser iguales o mayores, dependiendo de la transferencia placentaria y el metabolismo, el efecto de primer paso en el hígado y el volumen de distribución del compuesto. De este modo, las cantidades administradas a la madre pueden variar entre, por ejemplo, 0.01-25 mg de componente activo por kg del peso corporal de la madre por día.

En el tratamiento de complicaciones en el parto, se puede administrar 2-IB en combinación con hipotermia. Se ha demostrado que la hipotermia tiene un efecto terapéutico en varios modelos de lesión cerebral. Por ejemplo, existen numerosas publicaciones que muestran el efecto beneficioso de la hipotermia en ambos in vitro (Onitsuka, M., et al. 1998. Mild hypothermia protects rat hippocampal CA1 neurons from irreversible membrane dysfunction induced by experimental ischemia. *Neuroscience Research* 30:1-6) y modelos in vivo de asfíxia neonatal (Debillon, T., et al. 2003. Whole-body cooling after perinatal asphyxia: a pilot study in term neonates. *Developmental Medicine and Child Neurology* 45:17-23).

Como se usa en este documento, el término "hipotermia" se refiere a someter a un sujeto particular (en este caso, un sujeto neonatal) a condiciones hipotérmicas, por ejemplo, bajando la temperatura corporal a través de técnicas pasivas o activas. Por lo general, someterse a condiciones hipotérmicas conduce a una disminución en el metabolismo de los tejidos corporales del sujeto, disminuyendo así la necesidad de oxígeno.

La temperatura corporal central en un mamífero se puede reducir al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10° por debajo de la temperatura corporal central normal para el mamífero. La temperatura corporal central se puede reducir entre 1-10, 2-6, o preferiblemente 2-4° por debajo de la temperatura corporal central normal para el mamífero.

La temperatura del mamífero se puede mantener a una temperatura desde aproximadamente 31° a aproximadamente 37 grados Celsius. La temperatura del mamífero se puede mantener a una temperatura desde aproximadamente 32 grados Celsius a aproximadamente 36 grados Celsius más preferiblemente desde aproximadamente 32 grados Celsius a aproximadamente 35 grados Celsius, más preferiblemente aún desde aproximadamente 33 grados Celsius a aproximadamente 35 grados Celsius.

La inducción de hipotermia mediante la disminución de la temperatura central del cuerpo se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica. La inducción típica de hipotermia significa usar enfriamiento ya sea de todo el cuerpo o de la cabeza. La hipotermia se puede inducir usando agua hielo/fría o dispositivos de enfriamiento mecánico tales como el enfriamiento de la superficie, el sistema Olympic CoolCap™ y el enfriamiento usando catéteres colocados en un recipiente grande. Alternativamente, la hipotermia se puede inducir usando agentes farmacéuticos tales como, por ejemplo, agonistas del receptor vanilloide, capsaicinoides o agonistas similares a los capsaicinoides (descritos en la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 20090197966) y análogos de

neurotensina capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, tales como NT69L y NT77 (descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 7,319,090).

La hipotermia y la 2-IB se pueden administrar simultánea, secuencialmente o por separado. Como se usa en este documento, "simultáneamente" se usa para significar que la 2-IB se administra simultáneamente con hipotermia, mientras que el término "en combinación" se usa para significar que la 2-IB se administra, si no simultáneamente, luego "secuencialmente" dentro de un marco temporal en el que la 2-IB y la hipotermia exhiben un efecto terapéutico, esto es, ambos están disponibles para actuar terapéuticamente dentro del mismo marco temporal. De este modo, la administración "secuencialmente" puede permitir que la 2-IB se administre en 5 minutos, 10 minutos o en cuestión de horas antes o después de la hipotermia, siempre que la semivida circulatoria de la 2-IB sea tal que esté presente en una cantidad terapéuticamente eficaz cuando el sujeto neonatal está expuesto a condiciones hipotérmicas.

En contraste con "en combinación" o "secuencialmente", "por separado" se usa en este documento para significar que la brecha entre administrar la 2-IB y exponer al sujeto neonatal a hipotermia es significativa, esto es, la 2-IB ya no puede estar presente en el torrente sanguíneo en una cantidad terapéuticamente eficaz cuando el sujeto neonatal está expuesto a condiciones hipotérmicas.

La combinación de 2-IB e hipotermia puede tener un efecto sinérgico, esto es, la combinación puede ser sinérgica.

La hipotermia se puede mantener durante un período de al menos aproximadamente 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 o 96 horas después del insulto hipóxico-isquémico (HI) o después del nacimiento. La hipotermia se puede mantener durante un período de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 horas después del insulto hipóxico-isquémico (HI) o después del nacimiento, preferiblemente al menos 72 horas.

El tratamiento se puede iniciar dentro de aproximadamente 6 horas del insulto hipóxico-isquémico (HI), y más preferiblemente dentro de aproximadamente 2 horas, más preferiblemente dentro de 1 hora, del insulto hipóxico-isquémico.

La 2-IB se puede administrar antes del insulto hipóxico. De este modo, la 2-IB se puede administrar al neonato a través de la madre antes del nacimiento, por ejemplo, administrando a la madre antes o durante el parto. Las formulaciones acuosas de acuerdo con las reivindicaciones, se pueden usar en un método para tratar la asfixia neonatal en un mamífero que lo necesite, comprendiendo dicho método: (a) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de 2-IB a la madre del mamífero antes y/o durante el parto; y (b) someter al mamífero a hipotermia después del nacimiento.

La 2-IB se puede administrar a la madre hasta aproximadamente 48 o 24 horas antes del nacimiento. Después del nacimiento, el neonato puede ser sometido a condiciones hipotérmicas. La 2-IB se puede administrar a la madre tan pronto como la madre se encuentre en riesgo o el feto sea asfixiante o haya retrasado el crecimiento.

"Acerca de" y "aproximadamente" generalmente significará un grado aceptable de error para la cantidad medida dada la naturaleza o precisión de las medidas. Por lo general, los grados de error de ejemplo están dentro del 20 por ciento (%), preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5% de un valor dado o intervalo de valores.

Como se usa en este documento, un agente terapéutico que "previene" un trastorno o afección se refiere a un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada en proporción con una muestra de control no tratada, o retrasa el inicio o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección en proporción con la muestra de control no tratada.

El término "tratar" incluye tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. El término tratamiento "profiláctico o terapéutico" está reconocido en la técnica e incluye la administración al huésped de una o más composiciones. Si se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped), entonces el tratamiento es profiláctico (esto es, protege al huésped contra el desarrollo de la afección no deseada), mientras que si se administra después de la manifestación de la condición no deseada, el tratamiento es terapéutico (esto es, está destinado a disminuir, mejorar o estabilizar la afección no deseada existente o los efectos secundarios de la misma).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Solubilidad de 2-IB con y sin SBE-CD al 10% a diferente pH

Ejemplificación

La 2-IB tiene tanto un grupo ácido, ácido carboxílico como un grupo básico, amino. Los pKa calculados para estos grupos son 4.78 para el grupo de ácido carboxílico y 11.48 para el grupo amino usando el software de cálculo PrologP. Debido a los grupos ácidos y básicos presentes en 2-IB, 2-IB exhibe un comportamiento zwitteriónico en el intervalo de pH neutro. Como resultado, la solubilidad en agua de 2-IB depende en gran medida del pH y es mucho

menor que el valor calculado de 35 g/l en condiciones de pH neutro (véase la tabla 1). En base a la naturaleza zwitteriónica de 2-IB, es difícil desarrollar una formulación apropiada. Los siguientes ejemplos comparativos demuestran una serie de intentos de desarrollar una formulación de 2-IB apropiada para la administración IV.

Ejemplo comparativo 1; Selección de disolvente

- 5 La solubilidad de 2-IB se determinó en los siguientes disolventes:
- 0.9% de cloruro de sodio en agua
 - 5% de dextrosa en agua
 - N, N-dimetilacetamida
 - N, N-dimetilformamida
- 10 - Dimetilsulfóxido
- Etanol
 - Propilenglicol
 - Polietilenglicol 400
 - Aceite de maíz
- 15 Se pesaron aproximadamente 10 mg de 2-IB en un tubo de 10 ml. Posteriormente, se agregaron alícuotas pequeñas (100 μ l - 100 μ l - 200 μ l - 400 μ l - 800 μ l - 1600 μ l - 3200 μ l) de los disolventes respectivos por etapas. Después de cada adición, la solución se mezcló intensamente y se evaluó visualmente la solubilidad. El volumen final para todos los disolventes fue de 6400 μ l (1.6 mg/ml).
- 20 En todos los experimentos, quedó una gran cantidad de 2-IB sin disolver después de la adición de 6400 μ l de disolvente, lo que indica que 2-IB no es suficientemente soluble en ninguno de estos disolventes. Después de la adición de 100 μ l de ácido clorhídrico 1N, la 2-IB se disolvió completamente en todos los disolventes. Esto ilustra más el comportamiento zwitteriónico de 2-IB y la fuerte influencia del pH en la solubilidad.
- Visualmente, la fracción más alta de 2-IB se disolvió en propilenglicol. Por lo tanto, el experimento se repitió para propilenglicol pero con la adición de 100 μ l de ácido clorhídrico 1N después de 200 μ l de propilenglicol (esto es, 10 mg de 2-IB + 200 μ l de propilenglicol + 100 μ l de ácido clorhídrico 1N). Esto dio como resultado una solución de 33 mg/ml de 2-IB que estaba completamente disuelta y estable. La adición de agua a esta formulación resultó inmediatamente en la precipitación de 2-IB, lo que ilustra que esta no es una ruta viable hacia una formulación IV.
- 25 Como todos los disolventes probados requieren la adición de ácido para la solubilización completa de 2-IB, se decidió continuar con dextrosa al 5% en agua ya que los otros disolventes obviamente eran mucho menos biocompatibles durante la introducción IV o poseen un mayor riesgo de efectos de salado (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Cuando se prepara una formulación acidificada de 2-IB en dextrosa al 5%, el pH después de la acidificación es aproximadamente 2 para concentraciones nominales de 2-IB en el intervalo de 1-5 mg/ml. La neutralización parcial con hidróxido de sodio al 0.1% es posible hasta un pH de 3-3.5 (dependiendo de la concentración nominal) pero eventualmente ocurre la precipitación de 2-IB, primero en forma de agujas muy finas en forma de "pelo" que crecen hasta ser más grandes aglomerados. A un pH de 7, casi todo la 2-IB se precipitó de la solución en base a la observación visual.
- 30
- 35

Ejemplo comparativo 2; Surfactantes

Se estudiaron los siguientes surfactantes por su comportamiento de mejora de la solubilidad:

- Bromuro de hexadecil trimetilamonio (surfactante catiónico, 1%)
- 40 - Estearato de polioxietileno (40) (surfactante no iónico, 1%, 0.1% y 0.01%)
- Polisorbato 80 (surfactante no iónico, 1%)
 - Dodecilsulfato de sodio (surfactante aniónico, 1%, 0.1%, 0.01%). Se prepararon soluciones madre del surfactante en dextrosa al 5%. El procedimiento de prueba usado fue la adición gradual de la solución de surfactante respectiva a una pequeña cantidad de 2-IB (10 mg), como se describe en el ejemplo comparativo 1. La 2-IB no se disolvió en ninguna de las soluciones de surfactante a la concentración nominal de 1.6 mg/ml sin la adición de ácido. Después de la adición de ácido, se disolvió completamente pero después de la neutralización posterior (parcial) con hidróxido de sodio 0.1 N, la 2-IB precipitó nuevamente exactamente como se observó en los experimentos sin surfactantes.
- 45

Esto lleva a la conclusión de que los surfactantes no mejoran la solubilidad de 2-IB (tampoco a un pH bajo) y, por lo tanto, no son una adición útil para las formulaciones.

La tabla 1 representa varios ejemplos de solubilidad de 2-IB en diversas formulaciones. Se agregó un exceso de 2-IB a las soluciones de disolvente/surfactante, se mezcló a temperatura ambiente y luego se filtró para eliminar 2-IB no solubilizado. Estas soluciones fueron analizadas por RP-HPLC para determinar el contenido solubilizado de 2-IB.

Tabla 1: Descripción general de 2-IB

Descripción	Inspección visual después de 12 horas a 5 °C	Conc. de 2IB (mg/mL)
2-IB en 10 % de propilenglicol/90 % de agua	Precipitación	0.40
2-IB en 30 % de propilenglicol/70 % de agua	Pequeña cantidad de precipitación	0.51
2-IB en 10 % de PEG 300/ 90 % de agua	Pequeña cantidad de precipitación	0.35
2-IB en 30 % de PEG 300/70 % de agua	Sin precipitación	0.38
2-IB en 2 % de Tween BO/98 % de agua	Sin precipitación	0.37
2-IB en 10 % de Cremophor ELP/90 % de agua	Sin precipitación	0.34
2-IB en 10 % de propilenglicol, 10 % de PEG 300/80% de agua	Pequeña cantidad de precipitación	0.24
2-IB en 10 % de propilenglicol, 10 % de PEG 300, 2 % de Tween80/78% de agua	Pequeña cantidad de precipitación	0.37
2-IB en 10 % de propilenglicol, 10 % de PEG 300, 10 % de Cremophor ELP/ 70% de agua	Pequeña cantidad de precipitación	0.35
2-IB en 10 % de propilenglicol, 10 % de PEG 300, 2 % de Tween80, 10 % de Cremophor ELP/ 68% de agua	Pequeña cantidad de precipitación	0.33

Ejemplo comparativo 3; Ciclodextrinas

Se probaron las siguientes ciclodextrinas, todas a una concentración del 1% en una solución de dextrosa al 5%:

- 10 - α -ciclodextrina
- β -ciclodextrina
- hidroxipropil- α -ciclodextrina
- (2-hidroxipropil) - β -ciclodextrina
- (2-hidroxipropil) - γ -ciclodextrina

- 15 De manera similar a los surfactantes, no se observó aumento en la solubilidad durante ninguno de los experimentos, tampoco a pH bajo.

Ejemplo comparativo 4; excipientes novedosos

Finalmente, se analizaron dos nuevos excipientes, Cremophor EL y Solutol HS 15. Se prepararon soluciones madre de estos excipientes a una concentración del 10% en dextrosa al 5% y luego se realizó el enfoque de solubilidad gradual. Usando Solutol HS 15 se obtuvieron los mejores resultados (después de la adición de ácido clorhídrico) y, por lo tanto, la siguiente etapa fue optimizar la concentración de Solutol HS 15.

- 5 Se analizaron cinco concentraciones, 5-10-15-20-25% de Solutol HS 15 a una concentración de formulación de aproximadamente 5 mg/ml (Tabla 2). Se observó una solubilidad óptima de 2-IB en Solutol HS 15 al 20%, pero aún se requería una solución inicial muy ácida (pH <2) para solubilizar 2-IB completo. Sin embargo, tras la neutralización parcial posterior con hidróxido de sodio, se produjo precipitación de 2-IB a un pH más alto y en cantidades mucho más bajas que las observadas en las formulaciones de 2-IB en dextrosa. Se preparó una gama de formulaciones de 2-IB que se almacenaron durante 48 horas y se midió el contenido de 2-IB:

Tabla 2

Concentración nominal (mg/ml)	pH ¹	Concentración t=0 (mg/ml) ²	Concentración t=48 h (mg/ml) ²	Concentración t=48h en proporción con t=0 (%) ²
5.0	2.4	5.65	4.78	85
	2.8	5.43	5.45	100
	3.0	4.64	4.87	105
	3.5	5.21	4.94	95
	3.6	4.52	3.93	87
	3.8	5.10	2.62	51
	10.2	5.71	0	0
10	3.0	9.06	8.64	95
	3.5	8.30	8.04	97
20	3.0	16.6	16.7	101
	3.5	14.7	13.2	90

¹ pH ajustado con ácido clorhídrico 1 N e hidróxido de sodio 0.1 N

² La concentración se analizó después de la filtración.

- 10 En base a la investigación realizada durante este proyecto, se seleccionó un vehículo que consiste en 20% de Solutol HS 15 y 5% de Dextrosa en agua como el vehículo óptimo para la preparación de formulaciones de 2-IB. Debido a la naturaleza zwitteriónica de 2-IB, la formulación solo se pudo preparar a pH relativamente bajo (esto es, <3.5 - 3.6).

Ejemplo comparativo 5; Estudio de toxicidad Solutol HS 15

Estudio de toxicidad preliminar mediante infusión intravenosa continua en ratas Wistar.

- 15 Grupo I: vehículo 20% de solutol (infusión intravenosa continua). Los animales recibieron una infusión continua de vehículo solo (20% de solutol en 5% de dextrosa) a un volumen de dosis de 4 mL/kg/h durante 24 horas.

- 20 No se produjo mortalidad y los pesos corporales fueron normales. Se observó una postura encorvada y piloerección para todos los animales desde aproximadamente 12 horas después del inicio de la infusión en adelante. Se realizó una necropsia para investigar cualquier efecto macroscópico del tratamiento con Solutol. Los hallazgos macroscópicos en la necropsia compuestos por decoloración amarilla de todo el cuerpo y las cavidades corporales (2/4), recubrimiento mínimo similar a la fibrina en la vena cava (4/4), patrón lobular acentuado del hígado (1/4), un pequeño hígado (1/4) y dilatación pélvica de los riñones (1/4).

- 25 Grupo II: vehículo 5% de solutol (infusión intravenosa continua). Los animales recibieron una infusión continua de vehículo solo (5% de solutol en 5% de dextrosa) a un volumen de dosis de 4 mL/kg/h durante aproximadamente 96 horas.

No se produjo mortalidad, no se observaron signos clínicos consistentes y los pesos corporales fueron normales. Se observó un aumento moderado a marcado de alanina aminotransferasa (2/3), aspartato aminotransferasa (2/3) y

bilirrubina (2/3), y un ligero aumento de fosfatasa alcalina (3/3) y glucosa (3/3) al final del tratamiento. Se observó decoloración amarilla del plasma en dos animales.

Grupo III: 960 mg/kg/24 h de 2-IB en 5% de Solutol (infusión intravenosa continua).

5 Los animales recibieron una infusión continua (concentración de dosis de 10 mg/mL a un volumen de dosis de 4 mL/kg/h) usando Solutol al 5%/dextrosa al 5% (la concentración final de dextrosa y solución salina fue hipotónica; aproximadamente 2.5% y 0.45%, respectivamente). La infusión se terminó después de 46 horas, debido a los efectos clínicos adversos y las dificultades con la formulación en el sistema de infusión (alarmas de bomba indicativas de bloqueo de los sistemas de infusión, probablemente en los giros).

10 Un animal murió después de 46 horas de infusión. Se aumentaron los pesos corporales para dos animales. Se observó una postura encorvada, piloerección y palidez para todos los animales en los días 2-3 de tratamiento. Se encontró un aumento de leve a moderado en la aspartato aminotransferasa (1/2), fosfatasa alcalina (1/2) y glucosa (2/2) al final del tratamiento, así como valores altos de creatinina y orina (1/2) Los niveles de bilirrubina estaban dentro del intervalo normal.

15 Los hallazgos macroscópicos en la necropsia comprenden edema (2/3), dilatación pélvica de los riñones (2/3), hígado agrandado (1/3), ganglio linfático iliaco agrandado (1/3), manchas oscuras en los pulmones (1/3), y revestimiento similar a la fibrina en o alrededor de la vena femoral. La decoloración amarilla de los tejidos no estaba en evidencia.

20 En base a estos resultados, se concluyó que, aunque se encontraron mejores características de disolución en Solutol al 5-20% para 2-IB, este vehículo no era apropiado para infusión intravenosa continua en ratas con los volúmenes y las tasas de dosis aplicadas.

Ejemplo comparativo 6; pH

25 La solubilidad de 2-IB (5 mg/ml) se probó usando diferentes ácidos. La solubilidad se logró a un pH relativamente más alto (pH 3.3) usando ácidos débiles (ácido acético y ácido cítrico) en comparación con el pH 3.0 usando HCl. Esta diferencia probablemente se deba al efecto sinérgico del ajuste del pH y la formación de enlaces de hidrógeno entre 2-IB y los grupos carboxílicos de ácidos débiles.

Ejemplo comparativo 7; solución reguladora de citrato

30 Se agregó un exceso de 2-1B a soluciones reguladoras de citrato, se mezcló a temperatura ambiente y luego se filtró para eliminar 2-1B no solubilizado. Estas soluciones fueron luego analizadas por RP-HPLC para determinar el contenido solubilizado de 2-1B (Tabla 3). Se determinó que la solubilidad de 2-1B en solución reguladora de citrato 50 mM en un intervalo de pH era de 11 mg/ml a pH 3.0 (temperatura ambiente). A pH 3.5 hay aproximadamente la mitad de la cantidad de 2-1B solubilizada.

Tabla 3

pH de citrato 50mM	pH final	Citrato final (mM)	Apariencia después de 12 horas a 5 °C	Conc. de 2IB (mg/mL)
3.0	3.07	106	Precipitada	11.27
3.5	3.52	65	Precipitada	4.45
4.0	4.03	52	Precipitada	1.72
4.5	4.54	49	Precipitada	0.86
5.0	5.02	49	Precipitada	0.59

Ejemplo 1

35 Aunque los experimentos anteriores demostraron que la ciclodextrina no aumentaba significativamente la solubilidad de 2-IB, los experimentos se repitieron usando concentraciones más altas de ciclodextrina. Sorprendentemente, en contraste con los resultados del uso de ciclodextrina al 1%, se encontró que una mayor concentración de ciclodextrina aumentaba la solubilidad de 2-IB. Se agregó un exceso de 2-1B a las soluciones de ciclodextrina, se mezcló a temperatura ambiente durante tres días y luego se filtró para eliminar la 2-IB no encapsulada/no solubilizada. Estas soluciones fueron luego analizadas por RP-HPLC para determinar el contenido solubilizado de 2-IB (véase la tabla 13). Aproximadamente 14 mg/ml de 2-IB se disolvieron/encapsularon en SBE-CD al 40% en citrato 50 mM pH 4.0 con un pH de formulación final de 5.1. A 40% de SBE-CD pero usando solución reguladora de citrato

pH 5 con un pH final de 5.5, se encapsuló aproximadamente 10 mg/ml. Al 40% de SBE-CD pero usando agua con un pH final de 6.8, se disolvieron/encapsularon aproximadamente 4.2 mg/ml. Los resultados de este experimento demuestran que pueden encapsularse niveles apropiados de 2-IB usando una combinación de pH relativamente bajo, un pH inicial bajo y una concentración de ciclodextrina del 5 al 20%.

5 Los resultados indican una clara diferencia con la eficiencia de encapsulación de 2-IB para dos tipos de ciclodextrinas usadas. La solubilidad de 2-IB en SBE-CD (Sulfobutíler-β-ciclodextrina) con agua muestra que a 40% de SBE-CD 4.2 mg/ml de 2-IB está encapsulado, esto es significativamente mayor que el 1.2 mg/ml de 2-IB que se encapsuló usando 40% de HP-CD (hidroxipropil-β-ciclodextrina). La mayor solubilidad de 2-IB en SBE-CD que en HP-CD no solo se puede atribuir a la formación de complejos de inclusión por encapsulación porque Mw de SBE-CD (2163) es mayor que HP-CD (1400). Otras interacciones físicas entre las moléculas 2-IB y SBE-CD podrían contribuir a una mayor solubilidad, tal como el enlace de hidrógeno o la interacción de carga.

10 La inspección visual de las formulaciones de ciclodextrina después de 12 horas de almacenamiento a 5 °C mostró que tanto el pH de la formulación como la concentración de ciclodextrina tienen un efecto sobre la estabilidad de la formulación en términos de precipitación/liberación de la encapsulación (Tabla 13). Para las formulaciones de SBE-CD, todas las formulaciones permanecieron encapsuladas (solución transparente) excepto la formulación con la concentración de ciclodextrina más baja o 2.5% a pH 4.4. A una concentración más alta de ciclodextrina (5%) con un pH comparable (4.5), la 2-IB permaneció solubilizada. De manera similar, a una concentración de ciclodextrina comparable (2.5%) pero a un pH más alto (5.0), la 2-IB permaneció solubilizada, lo que indica que tanto el pH como la concentración de ciclodextrina contribuyen a la estabilidad de las formulaciones de SBE-CD durante el almacenamiento a pH 5. Las tablas 4A y 4B resumen los efectos del pH y el tipo de ciclodextrina y concentración en 2-IB.

Tabla 4A: Efecto de SBE-CD y pH sobre la concentración de 2-IB (mg/ml)

% de ciclodextrina	SBE-CD					
	WFI		Citrato pH 5.0		Citrato pH 4.0	
	Final	2-IB	Final	2-IB mg/ml	Final	2-IB
0	6.5	0.4	5.0	0.6	4.0	1.7
2.5	6.3	0.7	5.0	1.9	4.3	3.7
5	6.5	1.0	5.1	2.9	4.4	5.5
10	6.5	1.5	5.1	4.6	4.6	8.0
20	6.7	2.4	5.3	7.0	4.9	11.4
40	6.8	4.2	5.5	9.9	5.1	14.5

Tabla 4B: Efecto de HP-CD y pH sobre la concentración de 2-IB (mg/ml)

% de ciclodextrina	HP-CD					
	WFI		Citrato pH 5.0		Citrato pH 4.0	
	Final	2-IB	Final	2-IB	Final	2-IB
0	6.5	0.4	5.0	0.6	4.0	1.7
2.5	6.5	0.5	5.1	0.9	4.2	2.5
5	6.5	0.5	5.1	1.2	4.3	3.0
10	6.5	0.6	5.2	1.6	4.5	4.1
20	6.6	0.9	5.3	2.1	4.7	5.1

40	6.7	1.2	5.6	2.6	5.0	5,6
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Ejemplo 2

La solubilidad de 2-IB se cribó en soluciones de SBE-CD al 10% a diferentes pH ajustados con solución ácido cítrico 0.1 M. Las etapas experimentales se muestran a continuación.

1. Pesar 0.5 g de SBE-CD en un vial de vidrio de 10 ml.
- 5 2. Agregar 3 ml de WFI en cada vial para disolver SBE-CD
3. Pesar la cantidad en exceso de 2-IB (25 mg - 100 mg) en diferentes viales
4. Agitación magnética durante 1 h.
5. Ajustar el pH al pH diana con ácido cítrico 0.1 M
6. Determinar el peso de ácido cítrico 0.1 M agregado
- 10 7. Agregar WFI al peso total de 5 g
8. Medir nuevamente el pH después de 1 hora de agitación.
9. Filtrar completamente la formulación a través de un filtro de PVDF de 0.22 μ m
10. Determinar la solubilidad de 2-IB por el método HPLC

15 La solubilidad de 2-IB aumentó de 1.71 mg/g a 13.08 mg/g con una disminución del pH de 7.0 a 4.0 (Tabla 5). Las soluciones saturadas eran físicamente estables y no se observaron precipitados a temperatura ambiente. Sin embargo, se observaron precipitados de 2-IB después de 5 días de almacenamiento a 5 grados C (Tabla 5). En presencia de SBE-CD al 10%, la solubilidad de 2-IB aumentó significativamente en comparación con el ajuste del pH solo (pH 5.0: 5.2 vs. 0.59 mg/g; pH 4.0: 13.08 vs. 1.72 mg/g). La solubilidad aumentó 7.6 - 8.8 veces en presencia de 10% de SBE-CD (Figura 1).

20 Tabla 5: Solubilidad de 2-IB en 10% de SBE-CD a diferentes pH

SBE-CD, %	pH	Solubilidad de 2-IB, mg/g	5 días a 5 °C	5 días a RT
10	7.0	1.71	-	+
10	6.2	1.94	-	+
10	5.5	3.29	-	+
10	5.0	5.21	-	+
10	5.1	5.30	-	+
10	4.5	9.00	-	+
10	4.0	13.08	-	+
-: Precipitación de 2-IB; + sin precipitación				

Ejemplo 3

Se prepararon seis formulaciones que contenían 8-10% de SBE-CD (Tabla 6). La concentración de 2-IB en cada formulación fue aproximadamente del 75% de la solubilidad de 2-IB para evitar la precipitación de 2-IB a baja temperatura (Tabla 6 vs. Tabla 5). El pH final se ajustó con solución ácido cítrico 0.1 M (o citrato de sodio 0.1 M) a pH 4.0 – 6.0. El procedimiento detallado de preparación de la formulación se describe a continuación usando F429-02- 001P004 como ejemplo (véase la tabla 14).

F429-02-001p004: 3.9 mg/g de 2-IB, 10% de SBE-CD, pH 5.0

1. Agregar 82.93 g de agua para inyección en una botella de vidrio de 200 ml
2. Pesar 10 g de polvo de SBE-CD en la botella de vidrio y disolver bajo agitación magnética.

3. Pesar 400 mg de 2-IB
4. Agregar 6.67 g de solución de ácido cítrico 0.1 mM
5. Agitación magnética durante 5 minutos para disolver completamente la 2-IB
6. Ajuste el pH a 5.0 con citrato de sodio 0.1M
- 5 7. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.22 μm (Millex-GP (PES))
8. Llenar 1.5 ml en un vial de vidrio de 6 ml y almacenar a 5, 25 y 40 °C.

Tabla 6: Formulaciones de 2-IB en base a SBE-CD a pH diferente

SBE-CD, %	Ácido cítrico, mM	Citrato de sodio, mM	2-IB, mg/g	pH
10	0.6	0.0	1.5	6.0
10	2.0	0.0	2.5	5.5
10	6.6	1.5	3.9	5.0
8	5.6	0.0	4.0	5.0
10	15.0	0.2	7.0	4.5
10	32.3	3.5	9.7	4.0

10 Aunque la solubilidad de 2-IB a pH 7.0 es 1.71 mg/g, se probó una formulación a pH 7.0 con 1.5 mg/g de 2-IB en agua y no fue factible porque 2-IB no se disolvió completamente después de agitación durante la noche. Esto podría deberse a los diferentes enfoques para la prueba de solubilidad y la preparación de la formulación. Para la prueba de solubilidad se agregó una cantidad en exceso de polvo de 2-IB en una solución de SBE-CD al 10% y las pequeñas partículas de 2-IB se podrían disolver rápidamente para alcanzar el equilibrio. Sin embargo, se agregó una cantidad precisa de polvo de 2-IB para la preparación de la formulación, que contiene partículas de 2-IB con diferentes tamaños. El gran tamaño de las partículas 2-IB podría tener una velocidad de disolución muy lenta en agua a pH 7.0. Para las seis formulaciones en la tabla 6, la 2-IB se disolvió rápidamente en 30 minutos, lo que indica una velocidad de disolución rápida. Las seis formulaciones eran todas soluciones transparentes e incoloras.

15 No es factible aumentar la solubilidad preparando primero una formulación a un pH bajo y luego titulando a un pH alto. Se observó precipitación cuando se tituló la formulación F429-02-001P004 desde pH 5.0 a pH 5.9 y la formulación F429-02-001P006 de pH 4.0 a pH 5.1 con citrato trisódico 0.1 M.

20 Las seis formulaciones en la tabla 6 se almacenaron a 5, 25 y 40 °C, durante seis semanas. En el punto de tiempo de T = 0, 2 semanas, 4 semanas y 6 semanas, las formulaciones se probaron para determinar su apariencia, pH, osmolalidad y pureza y contenido de 2-IB (HPLC) (Tabla 15). Después de 6 semanas de almacenamiento, no se observó precipitación en las formulaciones en 3 condiciones de almacenamiento (Tabla 16). La apariencia de las 6 formulaciones no cambió a 5 y 25 °C por inspección visual. Sin embargo, se observó un ligero color parduzco a 40 °C. La intensidad del color parecía aumentar con el aumento de la concentración de 2-IB y la disminución del pH. La razón de esto no se conoce. Parece que la 2-iminobiotina es estable y la pureza y el contenido no cambiaron. SBE-CD solo se degrada a pH extremadamente bajo y alta temperatura. El pH y la osmolalidad de las 6 formulaciones permanecen estables después de 2, 4 y 6 semanas de almacenamiento a 5, 25 y 40 °C en comparación con los valores de T = 0.

25 La 2-IB permanece estable en las seis formulaciones después de 6 semanas de almacenamiento a 5, 25 y 40 °C en base a la pureza, el contenido y la recuperación (Tabla 17). La pureza de 2-IB en las 6 formulaciones se calculó en base al % de área de pico de 2-IB medido por el método de HPLC. Fue aproximadamente del 99% y no disminuyó después de 6 semanas de almacenamiento a 5, 25 y 40 °C. La razón del contenido ligeramente mayor y la recuperación en comparación con T = 0 probablemente se debió a la variación analítica del método HPLC.

Ejemplo 4

35 Las condiciones de formulación se estudiaron adicionalmente como se muestra en las tablas 18 y 19. Cada formulación se preparó hasta un volumen final de 10 ml. Se pesó 2-IB para la preparación de la formulación teniendo en cuenta el contenido de agua como se especifica en el CoA de este lote (4.2% p/p). La estabilidad preliminar de

las formulaciones se evaluó mediante inspección visual durante 3 días de almacenamiento a 5, 25 y 40 °C. En T-0, las muestras se caracterizaron adicionalmente por pH y osmolalidad.

Ejemplo 5

- Se estudiaron dos de las formulaciones del ejemplo 4 con más detalle. Las formulaciones F30 y F34 se prepararon de la siguiente manera. Se pesó 2-IB en una botella de vidrio prepesada teniendo en cuenta el contenido de agua (4.2% p/p). Se agregó ácido cítrico 100 mM (90% de la cantidad total), solución de reserva de NaCl/SBE-CD y WFI (agua para inyección) (80% de la cantidad total). La mezcla se agitó usando una placa agitadora magnética. El pH fue superior a 4.0 y se ajustó a 4.0 ± 0.2 usando una solución 100 mM de ácido cítrico. El peso final de la solución se corrigió mediante la adición de WFI para obtener 750 g. La formulación obtenida se filtró usando Millipak 20 Durapore (membrana de PVDF). Ambas formulaciones se dividieron en 9 bolsas de infusión de etileno y acetato de vinilo que contenían aproximadamente 70 ml de solución. La composición de la formulación se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

	F30 (g)	F34 (g)
2-IB (95.8%)	0.418	0.522
NaCl	0.490	0.490
SBE-CD	5.00	5.00
Ácido cítrico (100mM)	11.7	14.3
WFI	Hasta 100g	Hasta 100g

- Se probó una muestra de ambas formulaciones para determinar su apariencia, pH, osmolalidad, contenido de 2-IB y pureza inmediatamente después de la preparación. Las muestras de estabilidad se almacenaron a tres temperaturas: 5 °C, 25 °C y 40 °C. Los puntos de tiempo para la estabilidad fueron 1 día, 2 días y 3 días. En cada punto de tiempo de estabilidad, se analizaron muestras de 2-IB en todas las condiciones de almacenamiento para determinar su apariencia, pH, contenido de 2-IB y pureza. Se encontró que ambas formulaciones probadas eran estables durante 3 días a 5 °C, 25 °C y 40 °C (véanse las tablas 19A y 19B).

Ejemplo 6

Las dos formulaciones del ejemplo 4 se probaron para predecir su potencial de precipitación tras la inyección en base al Modelo de dilución en serie estático in vitro descrito en el artículo de Li P.; Vshnuvajjala R.; Tabibi S. E.; Yalkovsky S.H. "Evaluation of in-vitro precipitation methods" published in J. Pharma Sci, 1998 Feb; 87(2):196-9.

El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

- Se diluyeron tres ml de formulación con 3 ml de ISPB o vehículo y se agitaron. (solución reguladora de fosfato de Sorensen isotónica (ISPB) pH 7.4 se preparó usando heptahidrato dibásico de fosfato de sodio - 2.146%, fosfato de dihidrógeno de sodio deshidratado - 0.296% y cloruro de sodio - 0.178%). Luego se mezclaron tres ml de la solución/suspensión resultante con otros 3 ml de ISPB/vehículo. Esta etapa se repitió hasta que se obtuvieron 7 diluciones en serie. Además, el tubo de control para cada dilución se preparó usando un vehículo como diluyente en lugar de ISPB.

Se usaron observaciones visuales para determinar la presencia o ausencia de precipitado al mezclar. Después de estas observaciones iniciales, las mezclas de formulación-solución reguladora se colocaron en un baño de agua a 37 °C y 50 rpm durante 1 hora y luego se centrifugaron. La fase superior se analizó por el método HPLC.

- Para propósitos de análisis de datos, la proporción formulación-diluyente se define como la proporción del volumen de formulación al volumen total (volumen de formulación + volumen de ISPB). La diferencia entre la concentración de control y la concentración medida en cada dilución es la cantidad de fármaco ausente por ml de formulación original.

Modelo de dilución en serie estática in vitro para formulación F30

- La formulación F30 se probó para predecir su potencial de precipitación tras la inyección usando el modelo de dilución en serie estática in vitro. En este método, la formulación se diluyó secuencialmente en una proporción uno a uno con ISPB. La apariencia de la formulación en las diferentes etapas de dilución se presenta en la tabla 7. La concentración de equilibrio de 2-IB obtenida en cada etapa de dilución y la cantidad de fármaco ausente por ml se

presentan en la tabla 8 ($n = 3$ para cada dilución). La concentración de equilibrio en cada solución diluida se determinó por el método HPLC. La diferencia entre la concentración de control y la concentración medida en cada dilución es igual a la cantidad de fármaco que precipitó de 1 ml de formulación original. La proporción formulación-diluyente se define como la proporción entre el volumen de formulación y el volumen total. Con una proporción formulación-diluyente de 0.5, la formulación se volvió translúcida y se observó una ligera precipitación al reposar. La cantidad de fármaco perdida en esta proporción de dilución fue leve, y probablemente sea el resultado de la precipitación del fármaco. Las proporciones de formulación-diluyente de 0.25-0.0625 dieron como resultado una solución transparente, pero los resultados analíticos demostraron que se perdió el fármaco. La cantidad de fármaco faltante puede ser el resultado de una pequeña precipitación que no se observó visualmente o la adsorción del fármaco en la pared del tubo.

Tabla 7. Observación visual de las etapas de dilución en serie.

Dilución No.	Proporción formulación-diluyente	Apariencia después de la preparación	Apariencia después de la incubación
1	0.5	Solución transparente	Solución translúcida con ligera precipitación.
2	0.25	Solución transparente	Solución transparente
3	0.125	Solución transparente	Solución transparente
4	0.0625	Solución transparente	Solución transparente
5	0.03125	Solución transparente	Solución transparente
6	0.015625	Solución transparente	Solución transparente
7	0.007875	Solución transparente	Solución transparente

Tabla 8. Concentraciones medias de equilibrio de 2-IB y cantidad de 2-IB ausente por ml para las diferentes proporciones de formulación-diluyente (promedio de $n = 3$)

Proporción formulación-diluyente	Concentración de 2-IB control (mg/ml)	Equilibrio medio de concentración de 2-IB (mg/ml)	2-IB ausente (mg/ml)
1	4.188	4.188	0.000
0.5	2.074	2.066	0.048
0.25	1.039	1.025	0.031
0.125	0.526	0.511	0.015
0.0625	0.265	0.256	0.009
0.03125	0.128	0.127	0.000
0.015625	0.063	0.064	0.000
0.007875	0.030	0.032	0.000

Modelo de dilución en serie estática in vitro para formulación F34

La formulación F34 se probó para predecir su potencial de precipitación tras la inyección usando el modelo de dilución en serie estática in vitro. La apariencia de la formulación en las diferentes etapas de dilución se presenta en la tabla 9. La concentración de equilibrio de 2-IB obtenida en cada etapa de dilución y la cantidad de fármaco ausente por ml se promedian en la tabla 10. Con proporciones de formulación-diluyente de 0.5- 0.125, la formulación se volvió turbia a translúcida y se observó precipitación. La cantidad de fármaco perdida en esta proporción de

dilución fue perceptible, y probablemente sea el resultado de la precipitación del fármaco. A medida que la dilución continúa y la proporción alcanza 0.0625, se observó un precipitado pero no se detectó mediante una prueba analítica, probablemente debido a una pequeña cantidad de precipitado. Por debajo de la proporción 0.0625, los puntos de concentración de equilibrio se superponen a la curva de control con la observación de que el precipitado se vuelve a disolver.

5

Tabla 9. Observación visual de las etapas de dilución en serie.

Dilución No.	Proporción formulación diluyente	Apariencia después de la preparación	Apariencia después de la incubación
1	0.5	Solución turbia con precipitación pronunciada	Solución turbia con precipitación pronunciada
2	0.25	Solución turbia con precipitación	Solución turbia con precipitación
3	0.125	Solución translúcida con ligera precipitación.	Solución translúcida con ligera precipitación.
4	0.0625	Solución transparente con ligera precipitación	Solución transparente con ligera precipitación
5	0.03125	Solución transparente	Solución transparente
6	0.015625	Solución transparente	Solución transparente
7	0.007875	Solución transparente	Solución transparente

Tabla 10. Concentraciones medias de equilibrio de 2-IB y cantidad de 2-IB ausente por ml para las diferentes proporciones de formulación diluyente (n = 3 para cada dilución)

Proporción formulación-diluyente	Concentración de 2-IB control (mg/ml)	Equilibrio medio de concentración de 2-IB (mg/ml)	2-IB ausente (mg/ml)
1	5.12	5.12	0.000
0.5	2.565	0.929	1.636
0.25	1.263	0.697	0.565
0.125	0.632	0.433	0.199
0.0625	0.317	0.358	0.000
0.03125	0.158	0.184	0.000
0.015625	0.078	0.091	0.000
0.007875	0.038	0.046	0.000

10

Para la formulación de F30 de 4 mg/ml, los resultados no mostraron turbidez o precipitación después de la dilución en serie y se encontraron las concentraciones esperadas de 2-IB, lo que indica que es poco probable que la formulación basada en 2-lminobiotin (4 mg/ml) SBE-CD precipitar in vivo debido a la dilución fisiológica por flujo sanguíneo tras la administración intravenosa.

15 Ejemplo 7

La naturaleza y el propósito de este estudio fue evaluar la transferencia placentaria de 2-iminobiotina (2-IB) y el posible paso de 2-IB sobre la barrera hematoencefálica, cuando se administra por dos inyecciones subcutáneas a ratas Wistar hembra en el día 20 después coito.

5 Se inyectaron subcutáneamente cuatro ratas Wistar hembras el día 20 después del coito con 55 mg/kg de 2-IB (cada inyección de 27.5 mg/kg). La 2-IB se preparó en una solución salina fisiológica, pH 3.6-3.8, con una concentración de 2.75 mg/ml. No se produjo mortalidad entre los animales materiales durante el período de estudio y todos los fetos fueron viables. La necropsia tuvo lugar aproximadamente una hora después de la segunda inyección. Se recogieron muestras de sangre y cerebro tanto para la madre como para los fetos.

10 La 2-IB fue cuantificable en las muestras de plasma de todos los animales y fetos maternos. Las concentraciones en plasma de 2-IB fueron 3-7 veces más altas para los animales maternos (la concentración promedio fue de 10,039 ng/mL) que para los fetos (la concentración promedio fue de 1,765 ng/ml para los machos y 1,903 ng/mL para las hembras).

Tabla 10 Concentración en plasma de 2-IB

	Concentración materna	Concentración fetos agrupados	Concentración fetos agrupados
mujer 1	7,104	1,868 (n=8)	2,442* (n=3)
mujer 2	14,185	2,080 (n=4)	2,063 (n=8)
mujer 3	7,490	1,598 (n=5)	1,474 (n=4)
mujer 4	11,378	1,512 (n=8)	1.634 (n=7)
promedio (±SD)	10,039 (±3371)	1,765 (±259)	1,903 (±437)

15 El límite inferior de cuantificación (LLOQ) fue de 5.0 ng/mL y el límite superior de cuantificación (ULOQ) fue de 5000 ng/mL.

* Valor indicativo (el lote analítico inicial se rechazó, pero debido al bajo volumen, esta muestra no se pudo volver a analizar).

20 La 2-IB fue cuantificable en las muestras de cerebro de todos los animales y fetos maternos. Las concentraciones de 2-IB en cerebro fueron comparables en los animales maternos (la concentración promedio fue de 268 ng/g) y sus fetos (la concentración promedio fue de 329 ng/g para los machos y 369 ng/g para las hembras).

Tabla 11. Concentración de 2-IB en muestra de cerebro

	Concentración materna	Concentración fetos agrupados	Concentración fetos agrupados
mujer 1	151	287 (n=8)	474 (n=3)
mujer 2	375	435 (n=4)	317 (n=8)
mujer 3	270	283 (n=5)	329 (n=4)
mujer 4	276	309 (n=8)	356 (n=7)
promedio (±SD)	268 (±92)	329 (±72)	369 (±72)
LLOQ fue de 20.0 ng/g y ULOQ fue de 5000 ng/g.			

25 En general, el paso de 2-IB al cerebro parecía ser relativamente más bajo en los animales maternos (la proporción promedio de cerebro a plasma fue de 0.03, que oscila desde 0.02 a 0.04) que en sus fetos (la proporción promedio

de cerebro a plasma fue de 0.19, que van desde 0.15 a 0.21 para los hombres y 0.20, que van desde 0.15 a 0.22 para las mujeres).

Los resultados bioanalíticos mostraron que todos los animales maternos y sus fetos estuvieron expuestos a 2-IB después de inyecciones subcutáneas, con los animales maternos mostraron concentraciones plasmáticas de 3-7 veces más altas que sus fetos (la concentración en plasma promedio de 2-IB fue de 10,039 ng/mL para animales maternos, y 1,765 ng/mL para los machos y 1,903 ng/mL para los fetos hembras). Además, las concentraciones de 2-IB podrían medirse en los cerebros de todos los animales maternos (la concentración promedio fue de 268 ng/g) y sus fetos (la concentración promedio fue de 329 ng/g para los machos y 369 ng/g para los fetos hembras). El paso de 2-IB al cerebro parecía ser relativamente más bajo en los animales maternos (la proporción promedio de cerebro a plasma fue de 0.03) que en sus fetos (la proporción promedio de cerebro a plasma fue de 0.20). En base a los resultados mencionados anteriormente, la transferencia de 2-IB sobre la placenta y la barrera hematoencefálica se confirma después de dos inyecciones subcutáneas en ratas Wistar a un nivel de dosis total de 55 mg/kg.

Ejemplo 8

Se prepararon soluciones de 2-IB en las concentraciones de 0.6 mg/g, 0.75 mg/g y 1 mg/g en soluciones reguladoras de citrato a pH de 3.8, 4.0 y 4.2 hasta un peso final de 20 g de la siguiente manera (capacidad de solución reguladora diana a pH 4.0 fue de 15 mM):

Una solución de ácido cítrico 0.1M y una solución de citrato de sodio dihidrato 0.1M se prepararon cada una en WFI. Se agregó solución de ácido cítrico a 2-IB pesado en un vial de vidrio previamente pesado (teniendo en cuenta el contenido de agua como se especifica en el CoA de este lote (4.2% p/p). Se agregó WFI para dilución, y luego se agregó solución 0.1 M de citrato de sodio dihidrato para ajustar el pH hasta el valor de pH requerido. Se agregó WFI hasta un peso total de 20 g seguido de medición de pH.

Las 12 soluciones a granel obtenidas se dividieron posteriormente y se almacenaron en cámaras de estabilidad a 5 °C±3 °C y 25 °C± 2 °C, durante 3 días. Se evaluó el pH y la apariencia de todas las soluciones almacenadas en cada punto de tiempo (0, 1, 2, 3 días).

La tabla 20 muestra la composición de las formulaciones de solución reguladora de ácido cítrico, y los pH previstos y medidos antes y después de la adición de WFI a un peso total de formulación de 20 g.

Ejemplo 9

En un estudio posterior, se examinó la estabilidad de las formulaciones de solución reguladora de citrato 2-IB a pH 4±0.2 a una temperatura de 15 °C±3 °C y 25 °C± 2 °C. Se prepararon formulaciones de solución reguladora de citrato de 2-IB a concentraciones de 2-IB de 0 mg/ml (Placebo), 0.75 mg/ml y 1 mg/ml en solución reguladora de citrato pH 3.8, 4.0 y 4.2 como se describe en el ejemplo 8. Cada formulación fue preparada para un peso final de 20 g (la capacidad de solución reguladora diana era 15 mM a pH 4.0), y cada uno fue examinado visualmente para determinar su apariencia y determinar su pH. Las soluciones se dividieron y almacenaron en cámaras de estabilidad a 15 °C±3 °C y 25 °C± 2 °C, durante 3 días. Se evaluó el pH y la apariencia de todas las soluciones almacenadas en los puntos de tiempo T = 0, 1, 2 y 3 días.

La tabla 21 presenta la composición de cada una de las formulaciones de solución reguladora de ácido cítrico, y los valores de pH previstos y medidos antes y después de la adición de WFI a un peso total de formulación de 20 g. También se presentan datos de apariencia y pH para cada uno de los puntos de tiempo.

Ejemplo 10

La solubilidad de 2-iminobiotina se evaluó en una solución regulada de Captisol al 5% para valores de pH de 4.0-6.2. Las formulaciones también incluyeron NaCl para el ajuste de la osmolalidad, y la concentración de solución reguladora de citrato dirigida a pH 4.0 fue de 15 mM. Las concentraciones de 2-IB de estas soluciones fueron 4.0, 2.0, 1.0, 0.75 y 0 mg/g (Placebo) 2-IB.

La preparación de una solución de ácido cítrico 0.1M y la solución de citrato dihidrato 0.1M se describe en el ejemplo 8. Se preparó una solución a granel de solución de Captisol al 25%-NaCl al 2.45% y se usó para la preparación adicional de las formulaciones.

Cada una de las formulaciones finales a granel se examinó visualmente para determinar la apariencia y el pH. Las soluciones se dividieron y almacenaron en cámaras de estabilidad a 5 °C±3 °C y 25 °C± 2 °C, durante 3 días. Se evaluaron el pH y la apariencia de todas las soluciones almacenadas en los puntos de tiempo T = 0, 1, 2 y 3 días.

Las tablas 22 y 23 presentan la composición de las soluciones solución reguladora de citrato 2-IB y los datos de apariencia y pH.

Ejemplo 11

Se realizó un estudio de estabilidad a corto plazo (STS) de 2-IB en solución reguladora citrato (puntos de tiempo: T = 0, 2 semanas, 4 semanas y 6 semanas) en las siguientes formulaciones:

Formulación 03-15 que comprende: 0.75 mg/g de 2-IB en solución reguladora citrato pH 6.0, con solución de Captisol al 5% y NaCl al 2.45% (para isotonicidad) y

- 5 Formulación 02-5B que comprende: 0.75 mg/g de 2-IB en solución reguladora citrato pH 4.0, con NaCl para isotonicidad.

Se estudiaron los siguientes parámetros: apariencia visual, pH, osmolalidad, ensayo, IDD, claridad, partículas visibles y partículas subvisibles. La variación del pH (0.1 unidades durante 6 semanas a pH 6.0) fue insignificante. No hubo evidencia de que la estabilidad sea problemática en ninguna de las temperaturas probadas.

10 Ejemplo 12

Se realizó un estudio de solubilidad de 2-IB seca en comparación con la 2-IB hidratada. Se prepararon tres formulaciones, en base a la formulación # 02-5. La formulación 07-1 se obtuvo del material 2-IB "tal cual" (esto es, 2-IB tomado directamente del vial) después del secado. La formulación 07-2 se obtuvo a partir de material 2-IB completamente hidratado al dejar el material 2-IB "tal cual" a 20 °C/HR (70±5%). La formulación 07-3 se obtuvo del material 2-IB "tal cual". Las soluciones fueron examinadas por su apariencia y pH. 1. El contenido de agua del material seco, el material "tal cual" y el material completamente hidratado se determinó como 1%, 12% y 18%, respectivamente.

La tabla 12 a continuación presenta las cantidades de los ingredientes usados para la preparación de las formulaciones (07-1, 07-2 y 07-3), el tiempo que llevó disolver el material 2-IB (usado en cada formulación) en la solución de ácido cítrico 0.1M, los pH finales de las tres formulaciones y su apariencia.

Tabla 12.

	07-1	07-2	07-3
Conc. de 2-IB	0.75 mg/g	0.75 mg/g	0.75 mg/g
2-IB tomada como:	seca	hidratada completamente	"tal cual"
Cantidad teórica de 2-IB, (g)	0.157	0.157	0.157
Contenido de agua (%)	1.3340	18.1020	11.8330
Contenido de agua (%), replica	1.2470	18.1050	11.7900
Contenido de agua (%), promedio	1.2905	18.1035	11.8115
2-IB seca, %	98.71	81.90	88.19
Cantidad calculada de 2-IB en base corregida por contenido de agua	0.1591	0.1917	0.1780
Cantidad real de 2-IB tomada, (g)	0.1605	0.1915	0.1781
Solución de ácido cítrico 0.1 M (g)	20.0	20.0	20.0
Solución real ácido cítrico 0.1 M (g)	20.0	20.0	20.0
Tiempo para disolver 2-IB (min)	1.0	1.0	1.0
Solución 0.1 M de citrato de sodio dihidrato (ca., g)	~ 10.0	~ 10.0	~ 10.0
Solución real 0.1 M de citrato de sodio dihidrato (g)	23.1	23.7	23.5

Agua calculada para inyección para agregar (hasta 200 g)	160.0	160.0	160.0
Agua real para inyección agregada (g)	160.0	160.0	160.0
Conc. de 2-IB	0.75 mg/g	0.75 mg/g	0.75 mg/g
Cantidad total de solución (g)	203.3	203.9	203.7
pH (teórico)	4.0	4.0	4.0
pH (real)	4.00	4.00	4.00
Apariencia	Transparente e incolora	Transparente e incolora	Transparente e incolora

Ejemplo 13

Se realizó un estudio de esterilización final de 2 formulaciones de 2-IB en solución reguladora de citrato con o sin captisol para determinar qué métodos de esterilización se pueden usar sin degradar 2-IB.

- 5 Se prepararon cuatro (4) formulaciones de 2-IB reguladas que incluyen formulaciones de placebo que carecen de 2-IB. Cada una de estas soluciones se filtró a través de un filtro PES de 0.22 μm . Se determinó el pH, la osmolalidad, la apariencia visual y el contenido de 2-IB. El pH también se determinó después de la valoración de la solución de ácido cítrico 2-IB con la solución de citrato de sodio.

- 10 Cada formulación se dividió en porciones de 4 x 10 g. Cada porción se distribuyó en un vial de vidrio de 20 ml. Cada una de las 4 muestras se colocó en el esterilizador de vapor Tuttnauer y se esterilizó en autoclave (Programa 6 (para líquidos, 121 °C, durante 15 min)). Después de la esterilización en autoclave, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se tomó una muestra de 5 g de cada uno de los cuatro viales para determinar la apariencia, el pH y la osmolalidad. Los 5 g restantes de la formulación se emplearon para el ensayo.

- 15 La tabla 24 presenta los materiales y sus cantidades usadas para la preparación de cada una de las 4 formulaciones, capacidad de solución reguladora de citrato, apariencia visual, pH y análisis antes y después de la esterilización final. El análisis mencionado en la tabla 24 se refiere a la estabilidad de las soluciones monitoreadas por análisis HPLC. Como se demuestra en la tabla 24, las formulaciones se pueden esterilizar en autoclave sin una disminución significativa en la estabilidad de 2-IB.

Ejemplo 14

- 20 Se realizó un estudio para evaluar el potencial de precipitación in vivo de 2 formulaciones seleccionadas. Para este propósito, se usó el modelo en serie estático in vitro como se describe en el ejemplo 6.

- 25 La tabla 25 presenta las cantidades de los materiales usados para las preparaciones 09-1, 09-1V, 09-2 y 09-2V, sus capacidades reguladoras y el pH y la apariencia después de la titulación de la solución de ácido cítrico 2-IB con el citrato de sodio. Las tablas 26 y 27 presentan la apariencia y los valores de pH para diluciones de 09-1 y 09-1V en ISPB y diluciones de 09-1 en el vehículo. Los resultados de apariencia y pH presentados en las tablas 26 y 27 indican que para todas las diluciones realizadas, ambas preparaciones 09-1 y 09-2 no muestran precipitación cuando se diluyen con solución reguladora Sorensen que imita el pH fisiológico. Por lo tanto, el riesgo de precipitación in vivo de estas formulaciones debe ser bajo. Además, el cambio de pH hacia valores más fisiológicos es rápido, aumentando la compatibilidad/seguridad in vivo.

Tablas

- 30 Tabla 13: Resumen de formulación, pH, solubilidad 2-IB/encapsulado y estabilidad en formulaciones SBE-CD o HP-CD

Formulación	pH final	2 IB Solubilizado/encapsulado (mg/ml)	Inspección visual después de 12 horas a 5 °C
2-IB en Captisol al 40%/WFI	6.8	4.2	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 20%/WFI	6.7	2.4	Sin precipitación

ES 2 759 605 T3

2-IB en Captisol al 10%/WFI	6.5	1.5	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 5% /WFI	6.5	1,0	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 2.5%/WFI	6.3	0.7	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 40%/Citrato 50 mM pH5.0	5,5	9.9	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 20%/Citrato 50 mM pH5.0	5,3	7.0	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 10%/Citrato 50 mM pH5.0	5.1	4.6	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 5%/Citrato 50 mM pH5.0	5.1	2.9	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 2.5%/Citrato 50 mM pH5.0	5.0	1.9	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 40%/Citrato 50 mM pH4.0	5.1	14.5	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 20%/Citrato 50 mM pH4.0	4.9	11.4	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 10%/Citrato 50 mM pH4.0	4.6	8.0	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 5%/Citrato 50 mM pH4.0	4.4	5.5	Sin precipitación
2-IB en Captisol al 2.5%/Citrato 50 mM pH4.0	4.3	3.7	Pequeña cantidad de precipitación
2-IB en Kleptose al 40% HPB/WFI	6.7	1.2	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 20% HPB/WFI	6.6	0.9	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 10% HPB/WFI	6.5	0.6	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 5% HPB/WFI	6.5	0.5	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 2.5% HPB/WFI	6.5	0.5	Precipitación
2-IB en Kleptose al 40% HPB/Citrato 50 mM pH5.0	5.6	2.6	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 20% HPB/Citrato 50 mM pH5.0	5.3	2.1	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 10% HPB/Citrato 50 mM pH5.0	5.2	1.6	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 5% HPB/Citrato	5.1	1.2	Sin precipitación

50 mM pH5.0			
2-IB en Kleptose al 2.5% HPB/Citrato 50 mM pH5.0	5.1	0.9	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 40% HPB/Citrato 50 mM pH4.0	5.0	5.6	Sin precipitación
2-IB en Kleptose al 20% HPB/Citrato 50 mM pH4.0	4.7	5.1	Precipitación
2-IB en Kleptose al 10% HPB/Citrato 50 mM pH4.0	4.5	4.1	Precipitación
2-IB en Kleptose al 5% HPB/Citrato 50 mM pH4.0	4.3	3.0	Precipitación
2-IB en Kleptose al 2.5% HPB/Citrato 50 mM pH4.0	4.2	2.5	Precipitación

Tabla 14: Formulaciones de 2-IB en base a SBE-CD a pH diferente

Formulaciones	Captisol, %	Ácido cítrico, mM	Citrato de sodio, mM	2-IB, mg/g	pH
F49.9-02-001p002	10	0.6	0.0	1.5	6.0
F429-02-001p003	10	2.0	0.0	2.5	5.5
F429-02-001p004	10	6.6	1.5	3.9	5.0
F429-02-001p007	8	5.6	0.0	4.0	5.0
F429-02-001p005	10	15.0	0.2	7.0	4.5
F429-02-001p006	10	32.3	3.5	9.7	4.0

Tabla 15: pH y osmolalidad de las formulaciones después de 6 semanas de almacenamiento a 3 temperaturas diferentes

Muestra	Almacenamiento	pH				Osmolalidad, osm/kg			
		T=0	T=2	T=4	T=6	T=0	T=2	T=4	T=6
			semanas	semanas	semanas		semanas	semanas	semanas
	5 °C		6.0	6.0	6.0		0.292	0.239	0.288
F429-02-001P002	25 °C	6.0	6.0	6.0	6.0	0.287	0.290	0.288	0.290
	40 °C		6.0	6.0	6.0		0.293	0.317	0.292
F429-02-001P003	5 °C	5.5	5.6	5.6	5.6		0.298	0.293	0.291
	25 °C		5.6	5.6	5.6	0.292	0.296	0.293	0.292

ES 2 759 605 T3

	40 °C		5.6	5.6	5.6		0.298	0.301	0.295
F429-02-001P004	5 °C	5.0	5.0	5.0	5.0	0.299	0.304	0.298	0.300
	25 °C		5.0	5.0	5.0		0.302	0.300	0.299
	40 °C		5,0	5.0	5.0		0.303	0.306	0.300
F429-02-001P005	5 °C	4.5	4.5	4.5	4.6	0.311	0.316	0.312	0.311
	25 °C		4.5	4.5	4.5		0.314	0.314	0.313
	40 °C		4.5	4.5	4.5		0.317	0.317	0.310
F429-02-001P006	5 °C	4.0	4.0	4.1	4.1	0.329	0.340	0.332	0,332
	25 °C		4.0	4.0	4.0		0.332	0.330	0.327
	40 °C		4.0	4.0	4.0		0.337	0.350	0.336
F429-02-001P007	5 °C	5.0	5.0	5.1	5.1	0.232	0.233	0.232	0.233
	25 °C		5.0	5.0	5.1		0.231	0.233	0.231
	40 °C		5.0	5,0	5.0		0.235	0.236	0,234

Tabla 16: Pureza y contenido de 2-IB en las 6 formulaciones después de 6 semanas de almacenamiento a 3 temperaturas diferentes

Almacenamiento	F429-02-001p002			F429-02-001p003			F429-02-001p004			F429-02-001p005			F429-02-001p006			F429-02-001p007		
	% de pureza	Contenido mg/ml	% de recuperación	% de pureza	Contenido mg/ml	% de recuperación	% de pureza	Contenido mg/ml	% de recuperación	% de pureza	Contenido mg/ml	% de recuperación	% de pureza	Contenido mg/ml	% de recuperación	% de pureza	Contenido mg/ml	% de recuperación
T=0	96.9	1.59	100	99.0	2.60	100	99.1	4.02	100	99.1	7.17	100	99.1	10.01	100	99.1	4.03	100
2 semanas, 5°C	96.6	1.64	103	99.0	2.69	104	99.0	4.22	105	99.1	7.60	106	99.1	10.49	105	99.1	4.46	111
2 semanas, 25°C	98.8	1.62	102	98.8	2.68	103	99.0	4.20	104	99.1	7.70	107	99.1	10.43	104	99.0	4.35	108
2 semanas, 40°C	98.7	1.61	102	98.9	2.70	104	99.0	4.26	106	99.0	7.85	110	99.1	10.72	107	99.0	4.29	106
4 semanas, 5°C	98.5	1.64	103	98.9	2.69	104	98.9	4.31	107	99.0	7.49	105	99.0	10.42	104	99.0	4.37	108
4 semanas, 25°C	98.5	1.63	102	99.0	2.69	104	98.9	4.18	104	99.1	7.42	104	99.0	10.42	104	98.9	4.15	103
4 semanas, 40°C	98.5	1.60	101	96.9	2.67	103	98.9	4.20	104	98.9	7.46	104	99.0	10.42	104	98.9	4.10	102
6 semanas, 5°C	99.3	1.69	106	99.3	2.73	105	99.3	4.29	107	99.2	7.70	107	99.2	11.23	112	99.2	4.32	107
6 semanas, 25°C	99.3	1.64	103	99.2	2.74	106	99.2	4.24	105	99.2	7.67	107	99.2	11.01	110	99.2	4.30	107
6 semanas, 40°C	99.3	1.64	103	99.3	2.73	105	99.2	4.26	106	99.2	7.73	108	99.1	10.86	108	99.2	4.49	111

Tabla 17: Resumen del estudio de estabilidad para formulaciones de 2-IB sin ciclodextrina

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18
2-IB (mg/g)	1	1	1	1	1	1	5	4	5	3.5	3	3.5	3	4	5	2	2.5	3
NaCl (%)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.51	0.51	0.51	0.73	0.73	0.73	0.51	0.51	0.51	0.73	0.73	0.73
Glucosa (%)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5	5	5	2.5	2.5	2.5	5	5	5	2.5	2.5	2.5
Sol.reguladora de citrato pH 4.0 (mM)	0	1	2.5	5	7.5	10	10	10	5	10	10	5	15	15	15	15	15	15
Apariencia después de la preparación	no es transparente	no es transparente	no es transparente	transparente	transparente	transparente	no es transparente	no es transparente	no es transparente	no es transparente	no es transparente	no es transparente	transparente	no es transparente	no es transparente	transparente	transparente	no es transparente
Osmolalidad (mOsm)						313							318			321	321	
pH				4.43	4.31	4.23							4.66			4.40	4.49	
estudio: 1º día, 5 °C				ppt	ppt	ppt							transparente			transparente	ppt	
estudio: 2º día, 5 °C				ppt	ppt	ppt							transparente			transparente	ppt	
estudio: 3º día, 5 °C				ppt	ppt	ppt							Pocas part.			transparente	ppt	

Tabla 18: Resumen del estudio de estabilidad para formulaciones de 2-LB con ciclodextrina

	F19	F20	F21	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F31	F32	F33	F34	F35	F36	F37	F38
2-LB (mg/g)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	3	3	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5	3	4	5
NaCl (%)	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51	0.73	0.51	0.51
Captisol (%)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2.5	5	5
Sol. Reguladora de citrato pH 4.0 (mM)	15																			
Ácido cítrico (mM)	1.75	10		15	20	10	15	20	10	15	20	10.8	15	20	14.2	15.3	20		2.75	5
Sol. Reguladora de citrato pH3.5 (mM)			15															20	20	20
Citrato de sodio (100mM)		4	1.5	9.5	4	1.6	7.45	11.2	1	5.75	10.3	0.25	1	4.8			5.15	0.25		
Apariencia después de la preparación	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente
Molaridad total (mM)	16.8	14	16.5	24.5	24	11.6	22.5	31.2	11	20.8	30.3	11	16	24.8	14.2	15.3	25.2	20.2	22.8	25
Osmolalidad (mOsm)	321	319	320	340	360	306	333	356	308	323	345	307	307	326	307	309	333	328	326	330
pH	4.01	3.99	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.01	4.00	4.00	4.00	3.98	3.97	4.01	3.99	3.99	4.00	3.99	3.99
Estudio: 1º día, 5 °C		transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	ppt	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	ppt	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	ppt
Estudio: 2º día, 5 °C	ppt	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	ppt	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	ppt	transp arente	transp arente	pocas part	transp arente	ppt
Estudio: 3º día, 5 °C	ppt	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	ppt	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	ppt	pocas part	ppt	ppt	transp arente	ppt

ppt: precipitación; pocas part: algunas partículas son visibles

Tabla 19: Resultados del estudio de estabilidad de tres días para la formulación F30 (Fig. 19A) y la formulación F34 (Fig. 19B). Tabla 19A

	T-0	T-1 ^{er} día			T-2 ^o día			T-3 ^{er} día		
		5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
ensayo 2-IB (mg/g)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.1	4.0	4.1	4.0	4.0	4.1
pH	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2
Apariencia	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente

Tabla 19B

	T-0	T-1 ^{er} día			T-2 ^o día			T-3 ^{er} día		
		5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C	5°C	25°C	40°C
ensayo 2-IB (mg/g)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
pH	4.2	4.2	4.2	4.2	4.2	4.1	4.2	4.1	4.2	4.2
Apariencia	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente	Solución transparente

Tabla 20: Composición de formulaciones de 2-IB (0, 0.6, 0.75 y 1.0 mg/g) en solución reguladora de citrato (pH = 4.0±0.2), y valores de apariencia y pH para cada formulación en puntos de tiempo. T=0, 1, 2, y 3 días almacenados en cámaras de temperatura a 5 °C±3 °C y 25 °C±2 °C.

	01-1	01-2	01-3	01-4	01-5	01-6	01-7	01-8	01-9	01-10	01-11	01-12
Conc. de 2-IB (mg/g)	0	0	0	0.6	0.6	0.6	0.75	0.75	0.75	1.0	1.0	1.0
2-IB (95.8%), g	0	0	0	0-01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
Solución 0.1 M de ácido cítrico (g)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Solución 0.1 M de citrato de sodio dihidrato (g)	1.21	1.50	1.82	0.94	1.45	1.69	1.03	1.27	1.58	1.01	1.30	1.49
Agua para inyección	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g
Molaridad total, mM	16.0	17.4	19.0	14.6	17.2	18.4	15.1	16.3	17.9	15.0	16.4	17.4
pH óptima	3.8	4.0	4.2	3.8	4.0	4.2	3.8	4.0	4.2	3.8	4.0	4.2
pH obtenido después de la titulación (T-0)	3.81	4.00	4.20	3.78	3.99	4.19	3.81	3.99	4.19	3.80	4.00	4.20
STS: 1er día, pH	3.99	4.19	4.43	4.08	4.28	4.41	4.07	4.12	.1	3.72	.2	.2
STS: 3er día, pH	3.83	4.02	4.22	3.79	4.08	4.22	3.80	4.03	.2	3.82	.2	.2
STS: 1er día, pH	4.00	4.00	4.27	3.91	4.23	4.21	3.98	4.14	4.29	4.02	4.25	4.21
STS: 3er día, pH	3.81	4.02	4.22	3.91	4.08	4.28	3.80	4.11	4.13	3.92	4.08	4.15
STS: 1er día, apariencia	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	ppt ²	transp arenle	ppt ³	ppt ³
STS: 2º día, apariencia	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	ppt ³	transp arenle	ppt ³	ppt ³
STS: 3er día, apariencia	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	transp arenle	ppt ³	transp arenle	ppt ³	ppt ³

(continuación)

		01-1	01-2	01-3	01-4	01-5	01-6	01-7	01-8	01-9	01-10	01-11	01-12	
STS: 1er día, apariciencia	25°C	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	
		transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	
		transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	transp arente	
¹ pH 1PH en viales con precipitación no se midió														
² ppt – precipitado de tipo aguja														

ES 2 759 605 T3

Tabla 21: Cantidades de ingredientes usados para preparar formulaciones de 2-IB (0 (placebo), 0.75 y 1.0 mg/g) en solución reguladora de citrato (pH = 4.0±0.2), y valores de apariencia y pH para cada formulación en puntos de tiempo T = 0, 1, 2 y 3 días almacenados en cámaras de temperatura a 15 °C±3 °C y 25 °C± 2 °C.

		02-1	02-2	02-8	02-4	02-5	02-6	02-7	02-8	02-9
Conc. de 2-IB (mg/g)		0	0	0	0.75	0.75	0.75	1.0	1.0	1.0
2-IB (95.8%), g		0	0	0	0.0157	0.0157	0.0157	0.0209	0.0209	0.0209
Solución de ácido cítrico 0.1 M (g)		2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Solución 0.1 M de citrato de sodio dihidrato (g)		1.07	1.26	1.56	0.82	1.03	1.34	0.73	0.96	1.33
Agua para inyección		Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g	Hasta 20g
Molaridad total, mM		15.35	16.30	17.80	14.10	15.15	16.70	13.65	14.80	16.65
pH diana		3.8	4.0	4.2	3.8	4.0	4.2	3.8	4.0	4.2
pH obtenido después de la titulación (T-0)		3.79	3.97	4.21	3.82	4.03	4.23	3.80	4.03	4.24
STS: 1 ^{er} día, pH	15°C	3.81	4.04	4.23	3.81	4.07	4.22	3.82	4.05	4.29
STS: 2 ^o día, pH		3.84	4.02	4.25	3.87	4.05	4.27	3.82	4.04	4.27
STS: 3 ^{er} día, pH		3.81	4.02	4.27	3.83	4.04	4.24	3.83	4.05	4.28
STS: 1 ^{er} día, pH	25°C	3.80	3.97	4.19	3.82	4.03	4.20	3.81	4.05	4.29
STS: 2 ^o día, pH		3.83	4.05	4.25	3.84	4.04	4.27	3.85	4.02	4.25
STS: 3 ^{er} día, pH		3.80	4.00	4.22	3.81	4.04	4.27	3.82	4.06	4.33
STS: 1 ^{er} día, apariencia	15°C	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	ppt
STS: 2 ^o día, apariencia		transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	ppt
STS: 3 ^{er} día, apariencia		transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	ppt
STS: 1 ^{er} día,		transpa	transpa	transpa	transpar	transpar	transpar	transpar	transpar	transpar

ES 2 759 605 T3

apariencia	25°C	rente	rente	rente	ente	ente	ente	ente	ente	ente
STS: 2º día, apariencia		transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente
STS: 3er día, apariencia		transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente	transpar ente

Tabla 22: Composición de formulaciones isotónicas 2-IB (0.75, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/g) en tampón de citrato (pH = 4.0-6.2), y valores de apariencia y pH para cada formulación en los puntos de tiempo T = 0, 1, 2, y 3 días almacenados a 5 °C±3 °C y 25 °C±2 °C

	03-1	03-2	03-3	03-4	03-5	03-6	03-7	03-8	03-9	10-03	03-11	03-12	13-03	03-14	15-03	16-03
Conc. de 2-IB (mg/g)	4.0	4.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.75	0.75	0.75
2-IB (95.8%), g	0.084	0.084	0.084	0.042	0.042	0.042	0.042	0.042	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021	0.016	0.016	0.016
Solución 0.1 M de ácido cítrico (g)	2.3126	1.9184	1.4089	1.906	1.3898	0.9029	0.5036	0.2966	1.915	1.4181	0.9071	0.5216	0.3167	0.8936	0.5131	0.3133
solución de reserva 25% de captsol /2.45% de NaCl, (g)	4.1625	3.9998	3.9897	4.0215	3.9907	3.9945	4.0165	3.9808	4.0079	4.0274	4.1164	4.0249	4.0381	3.9893	4.0238	4.0385
Solución de citrato de sodio dihidrato 0.1M (g)	0	0.4639	ppt	1.375	2.1573	2.4214	3.6295	ppt	2.0182	2.4845	3.0597	4.1459	3.6235	3.242	4.474	3.9582
Agua para inyección (g)	2.5201	1.7929	Ppt	1.7143	1.5042	1.7132	0.8506	ppt	1.1265	1.1116	0.9796	0.3312	1.0627	0.8159	0	0.8276
Molaridad total, mM	11.26	11.91	7.04	16.41	17.74	16.62	20.67	1.48	19.67	19.51	19.83	23.34	19.70	20.68	24.94	21.36
pH diana	4.0	4.5	5.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.2	4.5	5.0	5.5	6.0	6.2	5.5	6.0	6.2
pH obtenido después de la titulación (T-0)	3.93	4.50	ppt	4.49	5.09	5.52	ppt	ppt	4.53	5.01	5.52	6.01	6.23	5.52	6.02	6.23
STS: 1 ^{er} día, pH	4.04	ppt	ppt	4.52	5.14	ppt	ppt	ppt	4.59	5.05	5.53	6.02	ppt	5.55	6.02	6.21
STS: 2 ^o día, pH	4.03	ppt	ppt	4.54	5.11	ppt	ppt	ppt	4.55	5.00	5.50	5.96	ppt	5.49	5.98	6.19
STS: 3 ^{er} día, pH	4.10	ppt	ppt	4.57	ppt	ppt	ppt	ppt	4.58	5.04	5.50	5.95	ppt	5.52	5.99	6.17
STS: 1 ^{er} día, pH	4.02	4.53	ppt	4.52	5.10	5.51	ppt	ppt	4.54	5.03	5.48	5.97	6.20	5.51	5.97	6.17
STS: 2 ^o día, pH	4.06	4.58	ppt	4.58	5.15	ppt	ppt	ppt	4.53	5.03	5.52	5.98	6.20	5.52	5.99	6.18
STS: 3 ^{er} día, pH	4.08	4.58	ppt	4.57	5.13	ppt	ppt	ppt	4.57	5.02	5.49	5.95	6.14	5.51	5.93	6.18
Conc. de 2-IB (mg/g)	4.0	4.0	4.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.75	0.75	0.75

(continuación)

	03-1	03-2	03-3	03-4	03-5	03-6	03-7	03-8	03-9	10-03	03-11	03-12	13-03	03-14	15-03	16-03
Osmolalidad obtenida después de la titulación (T-0)	293	299	ppt	300	304	309	ppt	ppt	309	312	326	333	325	320	337	329
STS: 3 ^{er} día, osmolalidad mOsm	293	ppt	ppt	300	ppt	ppt	ppt	ppt	308	312	328	332	ppt	321	337	330
STS: 3 ^{er} día, osmolalidad mOsm	290	297	ppt	300	302	ppt	ppt	ppt	308	313	327	335	328	317	336	329
Apariencia obtenida después de la titulación (T-0)	transpa rente	transpa rente	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente
STS: 1 ^{er} día, apariencia	transpa rente	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	ppt	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente
STS: 2 ^o día, apariencia	transpa rente	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	ppt	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente
STS: 3 ^{er} día, apariencia	transpa rente	ppt	ppt	transpa rente	ppt	ppt	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente
STS: 1 ^{er} día, apariencia	transpa rente	transpa rente	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	clear	transpa rente	transpa rente	transpa rente
STS: 2 ^o día, apariencia	transpa rente	transpa rente	ppt	transpa rente	transpa rente	ppt	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	clear	transpa rente	transpa rente	transpa rente
STS: 3 ^{er} día, apariencia	transpa rente	transpa rente	ppt	transpa rente	transpa rente	ppt	ppt	ppt	transpa rente	transpa rente	transpa rente	transpa rente	clear	transpa rente	transpa rente	transpa rente

ES 2 759 605 T3

Tabla 23: Composición de formulaciones isotónicas de placebo 2-IB en tampón citrato (pH = 4.0-6.2) con Captisol, y valores de apariencia y pH para cada formulación en los puntos de tiempo T = 0, 1, 2 y 3 días almacenados a 5 °C±3 °C y 25 °C ± 2 °C.

		03-1	03-2	03-3	03-4	03-5	03-6
Conc. de 2-IB, mg/g		0	0	0	0	0	0
2-IB (95.8%), g		0	0	0	0	0	0
Solución de ácido cítrico 0.1 M (g)		2.3681	1.8622	1.4556	0.8859	0.5515	0.3351
Solución de reserva Captisol al 2.5%/NaCl al 2.45%, (g)		4.1152	3.9825	3.9939	3.9852	3.8414	3.9901
Solución de citrato de sodio dihidrato 0.1M (g)		1.8553	2.4737	3.5027	3.9749	5.6267	5.0957
Agua para inyección		1.6782	1.7153	1.1384	1.2175	0.0597	0.5445
Molaridad total, mM		21.12	21.6795	24.7915	24.304	30.891	27.154
pH diana		4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.2
pH obtenido después de la titulación (T- 0)		4.04	4.51	5.03	5.48	5.95	6.16
STS: 1 ^{er} día, pH	5°C	4.02	4.52	5.04	5.50	5.97	6.18
STS: 2° día, pH		4.11	4.59	5.09	5.52	5.97	6.17
STS: 3 ^{er} día, pH		4.10	4.56	5.08	5.51	5.97	6.18
STS: 1 ^{er} día, pH	25°C	4.06	4.54	5.06	5.53	6.02	6.21
STS: 2° día, pH		4.11	4.58	5.09	5.52	5.99	6.16
STS: 3 ^{er} día, pH		4.12	4.58	5.08	5.52	5.98	6.19
Osmolalidad obtenida después de la titulación (T-0)	RT	316	312	326	331	342	347
STS: 3er día, osmolalidad, mOsm	5°C	314	312	326	331	341	342
STS: 3er día, osmolalidad, mOsm	25°C	314	313	328	331	344	345
Conc. de 2-IB, mg/g		0	0	0	0	0	0
Apariencia obtenida después de la titulación(T-0)	RT	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
STS: 1er día, apariencia		transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente

STS: 2º día, apariencia	5°C	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
STS: 3er día, apariencia		transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
STS: 1er día, apariencia	25°C	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
STS: 2º día, apariencia		transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente
STS: 3er día, apariencia		transparente	transparente	transparente	transparente	transparente	transparente

Tabla 24: Materiales y sus cantidades usados para la preparación de cada una de las 4 formulaciones 08-1, 08-2, 08-1P y 08-2P, capacidad reguladora de citrato, apariencia visual, pH y análisis antes y después de la esterilización final. El agua para riego es un fluido de riego estéril, hipotónico, no pirogénico, completamente compuesto de agua estéril para inyección USP.

	08-1	08-1P	08-2	08-2P
Conc. de 2-IB	0.75 mg/ml	0.75 mg/ml	0.75 mg/ml	0.75 mg/ml
Cantidad teórica de 2-IB (g)	0.0345		0.0345	
Contenido de agua, %	14.57		14.57	
Cantidad de 2-IB (real, g)	0.0402		0.0404	
Solución 0.1M de ácido cítrico (teórico, g)	4.4	4.05	0.679	0.590
Solución 0.1M de ácido cítrico real (g)	4.4117	4.0468	0.6927	0.5916
Solución 0.1M de citrato de sodio dihidrato (teórico, g)	2.2~	2.2~	~ 5.3	~ 5.0
Solución 0.1M de citrato de sodio dihidrato real (g)	2.8465	3.1900	6.6017	6.9156
Solución de reserva de NaCl al 4.5%, (teórico, g)	8.8	8.8		
Solución de reserva de NaCl al 4.5%, (real, g)	8.794	8.8272		
Solución de reserva de Captisol al 25%/NaCl al 2.45% (teórico, g)			8.8	8.8
Solución de reserva de Captisol al 25%/NaCl al 2.45% (real, g)			8.8090	8.8511
Agua para riego (g)	Hasta 44g	Hasta 44g	Hasta 44g	Hasta 44g
Agua para riego real agregada (g)	17.6077	18.7046	18.7120	17.6075
Formulación total (g)	43.9392	44.0253	44.0012	43.9909
Capacidad reguladora teórica, mM	15.15	15.15	15.00	15.00
Capacidad reguladora real, mM	16.50	16.45	16.58	17.06

ES 2 759 605 T3

pH diana	4.0	4.0	6.0	6.0
pH obtenido después de la titulación (T-0)	4.0	4.0	6.0	6.0
Apariencia antes de la esterilización	Transparente e incolora			
Apariencia después de la esterilización	Transparente e incolora			
pH antes de la esterilización	4.01	4.01	6.04	6.05
pH después de la esterilización	4.05	4.06	6.09	6.12
Osmolalidad antes de la esterilización	310	313	309	308
Osmolalidad después de la esterilización	314	311	306	306
Análisis antes de la esterilización	99.6%	ND	99.1%	ND
Análisis después de la esterilización	96.6%	ND	98.8%	ND

Tabla 25: Cantidades de ingredientes usadas para preparar las soluciones de formulaciones 09-1 y 09-1V (vehículo (placebo) de 09-1), 09-2 y 09-2v (vehículo (placebo) de 09-2) (incluidas las capacidades de regulación, y pH y apariencia después de la titulación de la solución de ácido cítrico 2-IB con citrato de sodio.

Formulación No.	09-1	09-1V (Placebo)	09-2	09-2V (Placebo)
Conc. de 2-IB	0.75 mg/g	0.00	0.75 mg/g	0.00
Cantidad teórica de 2-IB (g)	0.0345	0.00	0.0345	0.00
Cantidad pesada de 2- IB (g)	0.0347	-	0.0346	-
Contenido de agua, %	6.072	-	6.072	-
Contenido de agua, g	0.0021	-	0.0021	-
Cantidad de 2-IB (real, g)	0.0326		0.0325	-
Solución 0.1M de ácido cítrico (teórico, g)	4.4	20.44	0.679	2.946
Solución 0.1M de ácido cítrico real (g)	4.4408	20.47	0.6843	2.947
Solución de reserva de NaCl al 4.50%, (teórico, g)	8.8	44.00	-	-

ES 2 759 605 T3

Solución de reserva de NaCl al 4.50%, (real, g)	8.8102	44.00	-	-
Solución de reserva de Captisol al 25%/NaCl al 2.45% (teórico, g)	-	-	8.8	44.00
Solución de reserva de Captisol al 25%/NaCl al 2.45% (real, g)	-	-	8.8629	44.022
Solución 0.1M de citrato de sodio dihidrato (teórico, g)	1.80~	11.00~	~ 4.0	~17.00
Solución 0.1M de citrato de sodio dihidrato real (g)	3.5734	17.8140	9.5472	31.8830
Agua para inyección (g)	Hasta 44.00	Hasta 220.00	Hasta 44.00	Hasta 220.00
Agua para inyección (real, g)	43.9591	220.02	44.029	220.042
Capacidad reguladora teórica, mM	15.15	15.15	15.00	15.00
Capacidad reguladora real molaridad, mM	18.23	17.40	23.24	15.83
pH diana	4.0	4.0	6.0	6.0
pH obtenido después de la titulación	4.17	4.06	6.17	6.09
Apariencia después de la titulación	Transparente sin precipitación	Transparente sin precipitación	Transparente sin precipitación	Transparente sin precipitación

Tabla 26: Apariencia y pH de formulaciones 09-1 y diluciones 09-1V con ISPB y con el vehículo.

Agente diluyente	Formulación que se van a diluir	Dilución No.	Veces de dilución	Apariencia justo después de la mezcla	Apariencia después del baño de agua	Apariencia después de la centrifugación	pH
		1	0.5				6.78
							6.81
		2	0.25				7.20
							7.19
		3	0.125				7.33
							7.30

	09-1	4	0.0625	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	7.34
							7.42
		5	0.03125				7.40
							7.43
		6	0.01563				7.44
							7.45
		7	0.007875				7.47
							7.45
ISPB	09-1V	1	0.5	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	
							6.84
		2	0.25				7.17
							7.14
		3	0.125				7.36
							7.33
		4	0.0625				7.39
							7.41
		5	0.03125				7.42
							7.45
		6	0.01563				7.46
							ND
		7	0.007875				7.43
							ND
		1	0.5				4.17
							4.13
		2	0.25				4.13
							4.11
		3	0.125				4.09
							4.11
		4	0.0625				4.11
							4.11

ES 2 759 605 T3

Vehículo	09-1	5	0.03125	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	4.09
							4.07
		6	0.01563				4.13
							4.13
		7	0.007875				4.12
							4.09

Tabla 27: Aspecto y pH de las diluciones 09-2 y 09-1V con ISPB y de 09-2 con el vehículo.

Agente diluyente	Formulación que se van a diluir	Dilución No.	Veces de dilución	Apariencia justo después de la mezcla	Apariencia después del baño de agua	Apariencia después de la centrifugación	pH
ISPB	09-2	1	0.5	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	7.33
							7.33
		2	0.25				7.32
							7.39
		3	0.125				7.46
							7.39
		4	0.0625				7.46
							7.43
		5	0.03125				7.47
							7.46
		6	0.01563				7.42
							7.43
		7	0.007875				7.45
							ND
	09-2V	1	0.5	Transparente sin precipitación	Transparente sin precipitación	Transparente sin precipitación	7.31
							7.34
		2	0.25				7.43
							7.41
		3	0.125				7.41
							7.40

ES 2 759 605 T3

		4	0.0625	Incolora	Incolora	Incolora	7.44
							7.43
		5	0.03125				7.47
							7.43
		6	0.01563				7.45
							7.39
		7	0.007875				7.43
							7.40
		1	0.5				6.23
							6.25
		2	0.25				6.21
							6.16
		3	0.125				6.10
							6.14
		4	0.0625	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	Transparente sin precipitación Incolora	6.18
							6.16
		5	0.03125				6.16
							6.17
		6	0.01563				6.16
							6.17
		7	0.007875				6.09
							6.10
Vehículo	09-2						

REIVINDICACIONES

1. Una formulación acuosa, soluble de 2-iminobiotina, que tiene un pH entre 3 y 7, y que comprende 0.5 mg/ml o más de 2-iminobiotina y entre 2.5 y 40% en peso de una beta-ciclodextrina sustituida.
- 5 2. La formulación según la reivindicación 1, que tiene un pH entre 4 y 7, y que comprende 2 mg/ml o más de 2-iminobiotina y 2.5 a 20% en peso de una beta-ciclodextrina sustituida.
3. La formulación según la reivindicación 1, que tiene un pH entre 4 y 6.5, y que comprende de 0.5 a 3.5 mg/ml de 2-iminobiotina y entre 5 y 40, preferiblemente entre 5 y 10% en peso de beta-ciclodextrina sustituida.
- 10 4. La formulación según la reivindicación 1, que tiene un pH de 4 y que comprende 3.5 mg/ml o más de 2-iminobiotina y entre 2.5 y 40% en peso, preferiblemente entre 2.5 y 10% en peso de sulfobutil-éter-beta ciclodextrina (SBE-CD).
5. La formulación según la reivindicación 1, que tiene un pH entre 4 y 5 y que comprende entre 0.5 y 5 mg/ml, preferiblemente entre 4 y 5 mg/ml de 2-iminobiotina y 2.5 a 5% en peso de sulfobutil-éter-beta ciclodextrina (SBE-CD).
- 15 6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además ácido cítrico, una versión desprotonada del mismo o una mezcla de los mismos.
7. Una formulación acuosa, soluble de 2-iminobiotina, que tiene un pH entre 3 y 7, que comprende entre 0.5 mg/ml y 10 mg/ml de 2-iminobiotina y ácido cítrico, una versión desprotonada de la misma o una mezcla de los mismos.
8. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de la asfixia perinatal en un neonato.
- 20 9. La formulación para uso según la reivindicación 8, en la que la formulación se administra al neonato.
10. La formulación para uso según la reivindicación 8, en la que la formulación se administra a la madre del neonato antes y/o durante el parto.
11. La formulación para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en la que el tratamiento se combina con someter al neonato a hipotermia.
- 25 12. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento de los efectos de las complicaciones durante el parto.
13. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en terapia.
14. La formulación según la reivindicación 7, que tiene un pH entre 3 y 6, y que comprende entre 0.5 mg/ml y 5 mg/ml de 2-iminobiotina y ácido cítrico, una versión desprotonada de la misma o una mezcla de los mismos.
- 30 15. La formulación según la reivindicación 14, en la que dicho ácido cítrico, una versión desprotonada del mismo, o una mezcla de los mismos está presente a una concentración de 10 mM a 20 mM.

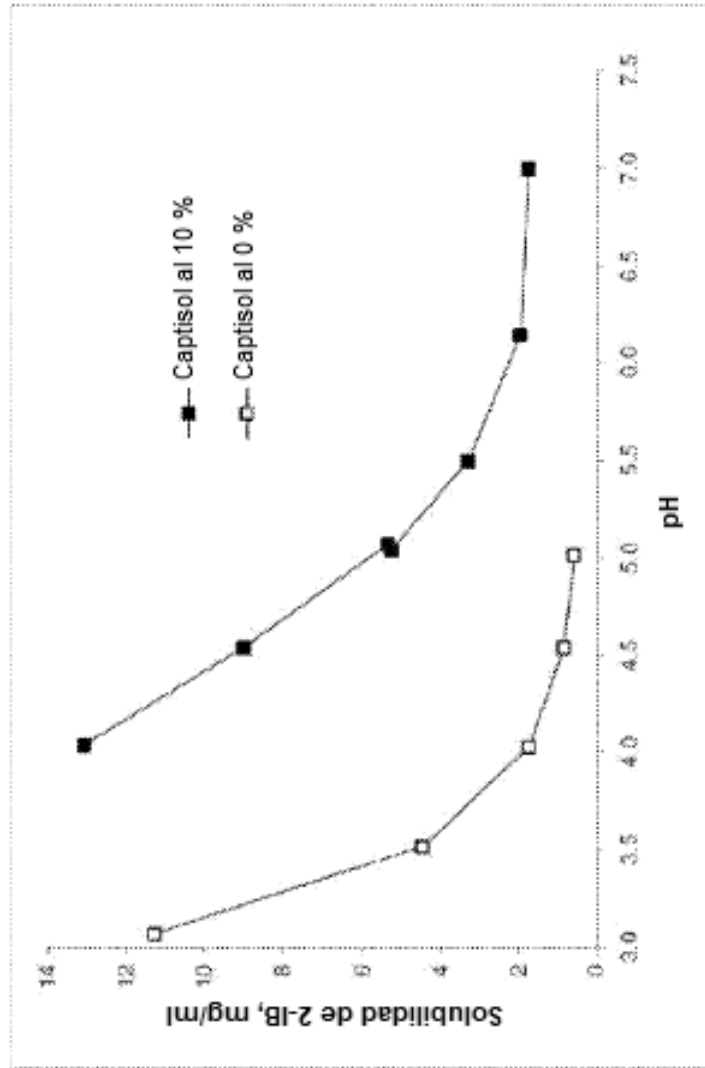


Figura 1