

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 932**

51 Int. Cl.:

C07D 307/06 (2006.01)

C07D 307/33 (2006.01)

C07C 59/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2013 PCT/US2013/065916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14078014**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2013 E 13802137 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 2961738**

54 Título: **Producción de sales de 4-hidroxitbutirato utilizando materias primas de base biológica**

30 Prioridad:

14.11.2012 US 201261726294 P

05.03.2013 US 201361772602 P

15.05.2013 US 201361823518 P

14.06.2013 US 201361834974 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.07.2020

73 Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ CheilJedang Center, 330 Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 04560, KR

72 Inventor/es:

PEOPLES, OLIVER;
SAMUELSON, DEREK;
SENECHAL, MAX;
PARK, SUNG, MIN;
GREDDER, JOSEPH y
MIRLEY, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 774 932 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

Producción de sales de 4-hidroxi butirato utilizando materias primas de base biológica

5 Antecedentes de la invención

10 El ácido γ -hidroxi butírico (GHB), también conocido como ácido 4-hidroxi butanoico y oxibato de sodio (INN), es una sustancia de origen natural que se encuentra en el sistema nervioso central humano, así como en el vino, en la carne de vacuno, en frutos cítricos pequeños y en casi todos los animales en pequeñas cantidades. El GHB se produce de forma natural en las células del cuerpo humano y está estructuralmente relacionado con el beta-hidroxi butirato de cuerpo de cetona.

15 El ácido hidroxi butírico (HB) se ha utilizado en entornos médicos como anestésico general, para tratar afecciones tales como insomnio, depresión clínica, narcolepsia y alcoholismo. El GHB en forma de su sal de sodio, conocido como oxibato de sodio, se comercializa por Jazz Pharmaceuticals con la denominación Xyrem para tratar la cataplexia y la somnolencia diurna excesiva en pacientes con narcolepsia.

20 Sin embargo, el GHB es más conocido por su potencial para un uso indebido. El GHB se utiliza ilegalmente como estupefaciente o como droga para la violación en citas. Sus efectos, tales como euforia, desinhibición, mayor sensualidad y empatogénesis, se han descrito anecdóticamente como comparables al uso de alcohol y de éxtasis. A dosis superiores, el GHB puede provocar náuseas, mareos, somnolencia, agitación, trastornos visuales, respiración deprimida, amnesia, pérdida del conocimiento y la muerte. Los efectos de GHB pueden durar de 1,5 a 3 horas, o incluso más si se han consumido grandes dosis. El consumo de GHB con alcohol es peligroso, ya que puede provocar vómitos en combinación con un sueño del que no se le puede despertar, una combinación potencialmente letal. Cuando se utiliza como droga recreativa, el GHB se puede encontrar en forma de su sal de sodio o de potasio, que es un polvo cristalino blanco, o como sal de GHB disuelta en agua formando una solución transparente. La sal de sodio de GHB tiene un sabor salado. También se ha informado de otras formas de sal tales como GHB cálcico y GHB magnésico, pero la sal de sodio es, con mucho, la más común.

30 Al igual que el alcohol y las benzodiazepinas potentes tales como el Rohypnol (la denominación comercial de una benzodiazepina hipnótica potente, flunitrazepam), el GHB ha sido etiquetado como una droga para la violación en citas. La forma de sodio del GHB tiene un sabor extremadamente salado, pero, como es incoloro e inodoro, se ha descrito como "muy fácil de añadir a bebidas" que enmascaran el sabor. Presuntamente, el GHB se ha utilizado en casos de agresión sexual relacionada con drogas, generalmente cuando la víctima es vulnerable debido a intoxicación con un sedante, generalmente alcohol. Es difícil establecer con qué frecuencia se utiliza GHB para facilitar la violación, ya que es difícil de detectar en una muestra de orina después de un día, y muchas víctimas pueden no recordar la violación hasta algún tiempo después de haber sucedido, aunque se puede detectar GHB en el cabello.

40 Ha habido varios casos de alto perfil de GHB como droga para la violación en citas que recibieron atención nacional en los Estados Unidos. A principios de 1999, una niña de 15 años, Samantha Reid, de Rockwood, MI, murió por envenenamiento con GHB. La muerte de Reid inspiró la legislación titulada "Hillory J. Farias and Samantha Reid Date-Rape Drug Prohibition Act of 2000". Esta es la ley que convirtió el GHB en una sustancia controlada de la lista 1.

45 El GHB también se ha utilizado ilegalmente para potenciar o mejorar el rendimiento deportivo. Se ha demostrado que el GHB eleva la hormona del crecimiento humano *in vivo*. Los efectos elevadores de la hormona del crecimiento del GHB están mediados por receptores de acetilcolina muscarínicos y pueden prevenirse mediante la administración previa de pirenzepina, un agente bloqueante del receptor de acetilcolina muscarínico.

50 El GHB se puede producir fácilmente en el hogar con muy poco conocimiento de química, ya que solo implica la mezcla de sus dos precursores, GBL y un hidróxido alcalino (tal como hidróxido de sodio) para formar la sal de GHB resultante. Debido a su facilidad de fabricación y a la disponibilidad de sus precursores, su producción no se realiza en relativamente pocos laboratorios ilícitos como la mayor parte de las otras drogas sintéticas, sino en hogares privados de productores de bajo nivel.

55 En vista de su alto potencial de uso indebido y su facilidad de fabricación descritos anteriormente, el GHB está clasificado como una droga ilegal en muchos países. Actualmente está regulado en Australia y Nueva Zelanda, Canadá, la mayor parte de Europa y en Estados Unidos. Por lo tanto, existe la necesidad de rastrear el origen o la fuente de GHB para que las agencias de orden público locales, estatales y/o federales y/o los departamentos de salud puedan determinar si el GHB que se utiliza ilegalmente está siendo producido por una fuente legítima y autorizada o por un fabricante ilegal. La capacidad de producir GHB que posea una huella única puede permitir a las fuerzas del orden público determinar fácilmente la fuente de una muestra particular de GHB.

Sumario de la invención

65 La invención se refiere al procedimiento, al polímero y a composiciones tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas. También se divulga en el presente documento gamma-butirolactona ("GBL") y gamma-hidroxi butirato

("GHB") que tienen una huella de carbono única definida por el porcentaje de carbono moderno (pmc). El porcentaje de carbono moderno se puede controlar variando las cantidades de materiales de partida renovables de base biológica y de materiales de partida derivados del petróleo para preparar GBL o GHB que tengan un pmc definido o preparando mezclas de GBL o GHB preparados a partir de materiales de partida renovables de base biológica y GBL o GHB preparados a partir de materiales de partida derivados del petróleo.

En una divulgación, el gamma-hidroxi-butilato tiene un pmc de al menos aproximadamente el 1% a al menos aproximadamente el 99%, por ejemplo, aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. En divulgaciones particulares, el gamma-hidroxi-butilato tiene un pmc de al menos aproximadamente el 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95, 97, 98 o 99. En divulgaciones particulares, el gamma-hidroxi-butilato tiene un pmc de al menos aproximadamente el 99%. En otras divulgaciones, el gamma-hidroxi-butilato puede encontrarse en forma de una mezcla de gamma-hidroxi-butilato preparado a partir de materias primas renovables de base biológica y gamma-hidroxi-butilato preparado a partir de materiales derivados del petróleo, en la que la relación entre los dos está controlada de forma que proporcione una huella de carbono única. El pmc de la mezcla puede ser tal como se ha descrito anteriormente.

El gamma-hidroxi-butilato se puede formular como el ácido carboxílico libre, una o más sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, oligómeros de gamma-hidroxi-butilato y sales farmacéuticas de los oligómeros. El gamma-hidroxi-butilato y sus oligómeros, polímeros o sus sales (por ejemplo, oxibato de sodio) también se pueden modificar mediante la sustitución de todos o algunos de sus átomos de hidrógeno por átomos de deuterio o de flúor. El gamma-hidroxi-butilato deuterado se denomina DGHB y la gamma-butilolactona deuterada se denomina DGBL. Según se informa, las moléculas de fármaco modificadas de este modo mejoran el metabolismo de un fármaco (como es el caso de los isotopólogos de deuterio) o la afinidad de unión del fármaco a los receptores diana (como es el caso de los fármacos modificados con flúor).

La gamma-butilolactona o la gamma-butilolactona deuterada pueden convertirse en gamma-hidroxi-butilato o gamma-hidroxi-butilato deuterado por saponificación (por ejemplo, apertura del anillo catalizada con base) del anillo de lactona, que incluye procedimientos en continuo para efectuar la apertura de anillo de gamma-butilolactona o gamma-butilolactona deuterada para formar gamma-hidroxi-butilato o gamma-hidroxi-butilato deuterado. Otros procedimientos para producir gamma-hidroxi-butilato o gamma-hidroxi-butilato deuterado incluyen la hidrogenación parcial de ácido succínico o sus formas deuteradas que tienen una huella de carbono única y la oxidación parcial de butanodiol o sus formas deuteradas que tienen una huella de carbono única.

En una divulgación, la gamma-butilolactona o la gamma-butilolactona deuterada de base biológica que tienen una huella de carbono única se producen a partir de la conversión a GHB o DGHB de base biológica que tienen una huella de carbono única mediante pirólisis de poli(4-hidroxi-butilato) o poli(4-hidroxi-butilato) deuterado.

El P4HB o sus formas deuteradas ("DP4HB") se pueden producir a partir de una diversidad de materias primas renovables de base biológica, tales como jarabe de glucosa o de glucosa deuterada utilizando procedimientos de fermentación. El P4HB o el DP4HB también se pueden preparar a partir de una mezcla de materias primas renovables de base biológica y materias primas derivadas del petróleo utilizando los mismos procedimientos de fermentación. En el procedimiento descrito en las reivindicaciones adjuntas para producir DP4HB, se utiliza glucosa deuterada y/o agua deuterada como fuente de deuterio.

El P4HB o el DP4HB se pueden pirolizar en presencia de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para producir GBL o DGBL, que pueden saponificarse para formar GHB o DGHB. El P4HB o el DP4HB también pueden convertirse en GHB o DGHB disolviendo P4HB o DP4HB purificados en un disolvente orgánico, tal como tetrahidrofurano (THF), y haciéndolos reaccionar con una base, tal como metóxido de sodio, para convertir P4HB o DP4HB directamente en GHB o DGHB. También puede utilizarse el mismo procedimiento para preparar oligómeros de 4HB o de D4HB de un peso molecular deseado. La GBL o la DGBL de base biológica o una mezcla de GBL o DGBL de base biológica y GBL o DGBL derivadas del petróleo se pueden convertir en GHB o DGHB haciendo reaccionar la GBL o la DGBL con una base, tal como hidróxido de sodio, para formar la sal de sodio del ácido gamma-hidroxi-butilato, gamma-hidroxi-butilato de sodio o gamma-hidroxi-butilato de sodio deuterado.

La GBL o el GBH o sus formas deuteradas que tienen una huella de carbono única pueden prepararse a partir de ácido succínico o sus formas deuteradas. El ácido succínico que tiene una huella de carbono particular puede prepararse por fermentación de biomasa microbiana, aislamiento del ácido succínico e hidrogenación catalítica del ácido succínico para formar GHB.

El GHB que tiene una huella única también puede prepararse a partir de 1,4-butanodiol o sus formas deuteradas que tienen una huella de carbono única. El 1,4-butanodiol que tiene una huella de carbono particular se puede preparar por fermentación de biomasa microbiana, aislamiento del 1,4-butanodiol y oxidación catalítica del 1,4-butanodiol para formar GHB.

Los compuestos divulgados en el presente documento pueden formularse para su administración enteral, parenteral, tópica o pulmonar. Los compuestos se pueden combinar con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente

aceptables que se consideran seguros y eficaces y se pueden administrar a un individuo sin causar efectos secundarios biológicos no deseados ni interacciones no deseadas. El vehículo los constituye todos los componentes presentes en la formulación farmacéutica distintos del o de los ingredientes activos.

5 Mediante la producción de GBL o GHB o sus formas deuteradas que tienen una huella de carbono única definida por el pmc, las agencias de orden público pueden identificar la fuente de GBL o GHB, así como rastrear los envíos de los materiales desde el sitio de fabricación hasta el usuario final. La huella puede utilizarse para confirmar si una muestra la ha preparado un fabricante legítimo o un laboratorio de drogas ilegal.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo que muestra las etapas para la síntesis de P4HB deuterado utilizando D₂O o glucosa deuterada como fuente de deuterio.

15 Descripción detallada de la divulgación y la invención

I. Definiciones

20 "Contenido de base biológica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad de carbono derivado de biomasa en una muestra de gamma-hidroxibutirato ("GHB"). El contenido de base biológica se puede determinar utilizando técnicas conocidas en la técnica, tales como la norma ASTM-D6888. El contenido de base biológica se puede determinar relacionando la proporción de la cantidad de ¹⁴C en una muestra desconocida con la de un patrón de referencia moderno. Esta proporción se calcula como un porcentaje con las unidades "pmc" (porcentaje de carbono moderno). Si el material que se analiza es una mezcla de radiocarbono actual y carbono fósil (que no contiene radiocarbono), entonces el valor de pmc se correlaciona directamente con la cantidad de carbono derivado de biomasa de la muestra.

30 El patrón de referencia moderno utilizado en la datación por radiocarbono es un patrón del NIST (National Institute of Standards and Technology) con un contenido conocido de radiocarbono equivalente aproximadamente al año 1950. Se eligió el año 1950 porque representaba un momento anterior a las pruebas con armas termonucleares, que introdujeron grandes cantidades de radiocarbono en exceso en la atmósfera con cada explosión (denominado "carbono de bombas"). Para un arqueólogo o un geólogo que utiliza fechas de radiocarbono, el año 1950 equivale a "al año cero". También representa 100 pMC.

35 El "carbono de bombas" en la atmósfera alcanzó casi el doble de los niveles normales en 1963 en el momento álgido de las pruebas y antes del tratado que supuso el cese de las pruebas. Su distribución dentro de la atmósfera se ha aproximado desde su aparición, mostrando valores superiores a 100 pMC para plantas y animales que viven desde el año 1950. Ha disminuido gradualmente a lo largo del tiempo, presentando un valor actual cercano a 105 pMC. Esto significa que un material de biomasa reciente tal como el maíz, la caña de azúcar o la soja proporcionarían una firma de radiocarbono cercana a 105 pMC. La combinación de carbono fósil con carbono actual en un material dará como resultado una dilución del contenido actual de pMC. Asumiendo que ~105 pMC representa materiales de biomasa actuales y 0 pMC representa derivados del petróleo, el valor medido de pMC para ese material reflejará las proporciones de los dos tipos de componentes. Por ejemplo, un material derivado al 100% de soja actual proporcionarían una firma de radiocarbono cercana a 105 pMC. Pero si se diluye con el 50% de carbono procedente de petróleo, proporcionarían una firma de radiocarbono cercana a 53 pMC.

50 El "contenido de base biológica" de un material se comunica como un valor porcentual que relaciona el carbono orgánico renovable total con el carbono orgánico total. El resultado final se calcula multiplicando el valor de pMC medido para el material por 0,95 (para ajustar el efecto de carbono de bombas). El valor final se indica como el RESULTADO DE BASE BIOLÓGICA MEDIO y supone que todos los componentes dentro del material analizado estaban vivos en la actualidad (en la última década) o son de origen fósil.

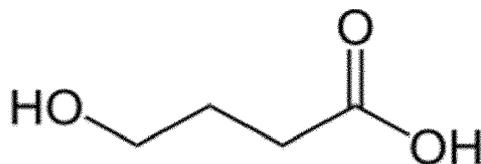
55 "Cantidad eficaz", tal como se utiliza generalmente en el presente documento se refiere a una cantidad, o dosis, dentro del intervalo dado o prescrito normalmente para demostrar un efecto, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*. El intervalo de una cantidad eficaz puede variar de un individuo a otro; sin embargo, la dosis óptima la pueden determinar fácilmente los expertos en la técnica dependiendo de su uso. Dichos intervalos están bien establecidos en la práctica clínica habitual y, por lo tanto, se pueden determinar fácilmente por los expertos en la técnica. Las dosis pueden medirse mediante la cantidad total administrada (por ejemplo, por dosis o por día) o por concentración. Dosis de 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 500 y 1000 mg/kg/día pueden ser apropiadas para el tratamiento.

60 "Farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza generalmente en el presente documento, se refiere a los compuestos, los materiales, las composiciones y/o las formas farmacéuticas que, dentro del ámbito del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin presentar una toxicidad excesiva, irritación, una respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones de forma acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

65

II Gamma-hidroxitirato

El gamma-hidroxitirato tiene la estructura química siguiente:



5

Se divulgan en el presente documento gamma-hidroxitirato o sus formas deuteradas producidos a partir de materias primas de base biológica, solas o en combinación con materias primas derivadas de combustibles fósiles o derivadas del petróleo. Variando las cantidades de materia prima de base biológica y material derivado de combustibles fósiles se puede producir gamma-hidroxitirato con una huella o firma de carbono única, que se puede utilizar como un medio para identificar la fuente del gamma-hidroxitirato (es decir, el fabricante) así como para realizar un seguimiento de su transporte y su uso. Esta huella se deriva de la proporción de carbono moderno, que se incorpora desde materias primas de base biológica, con respecto al carbono fósil, que se deriva de materias primas derivadas del petróleo, y se expresa como el porcentaje de carbono moderno o pmc.

En una divulgación, el gamma-hidroxitirato tiene un pmc de al menos aproximadamente el 1% a al menos aproximadamente el 99%, por ejemplo, aproximadamente el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95%. En divulgaciones particulares, el gamma-hidroxitirato tiene un pmc de al menos aproximadamente 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95, 97, 98 o 99. En divulgaciones particulares, el gamma-hidroxitirato tiene un pmc de al menos aproximadamente el 99%. En otras divulgaciones, el gamma-hidroxitirato puede encontrarse en forma de una mezcla de gamma-hidroxitirato preparado a partir de materias primas renovables de base biológica y gamma-hidroxitirato preparado a partir de materiales derivados del petróleo, en la que la relación entre los dos está controlada de forma que proporcione una huella de carbono única. El pmc de la mezcla puede ser tal como se ha descrito anteriormente.

El gamma-hidroxitirato se puede formular como el ácido carboxílico libre, una o más sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables, oligómeros de gamma-hidroxitirato y sales farmacéuticas de los oligómeros.

"Sales farmacéuticamente aceptables", tal como se utiliza generalmente en el presente documento, se refiere a derivados de los compuestos descritos en los que el compuesto original se modifica para producir la sal básica del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos. Las sales adecuadas incluyen, pero sin limitación, metales del grupo I, tales como sodio y potasio, y metales del grupo II, tales como magnesio y calcio.

El gamma-hidroxitirato también se puede formular como un oligómero o un polímero de gamma-hidroxitirato. "Oligómero", tal como se utiliza en el presente documento, generalmente se refiere a polímeros que tienen 2-10 unidades de repetición, mientras que "polímero", tal como se utiliza en el presente documento, generalmente se refiere a polímeros que tienen más de 10 unidades de repetición. Las composiciones pueden contener GHB solo, como en un homopolímero (u oligómero) de gamma-hidroxitirato, o pueden comprender GHB en un polímero u oligómero junto con otros monómeros. Por ejemplo, el GHB puede copolimerizarse con β -hidroxibutirato, como en poli- β -hidroxibutirato-co- γ -hidroxibutirato, o copolimerizarse con dos o más monómeros diferentes, incluidos otros hidroxialcanoatos o hidroxiaácidos. Los ejemplos de monómeros que pueden incorporarse en polímeros y oligómeros de GHB están identificados por Williams, et. al., *Int. J. Biol. Macromol.*, 25: 111-21 (1999).

Además de oligómeros lineales que comprenden GHB, pueden ser especialmente útiles oligómeros cíclicos que comprenden GHB para la administración de GHB *in vivo*. Estos pueden prepararse, por ejemplo, según los procedimientos descritos por Müller y Seebach, *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 32: 477-502 (1993).

En una divulgación adicional, se pueden preparar polímeros y oligómeros que no contienen GHB, pero que se descomponen *in vivo* dando GHB. Un ejemplo de dicho polímero es el poliortoéster bioerosionable descrito por Sendelbeck y Girdis, *Drug Metabolism & Disposition*, 13: 291-95 (1985).

Los oligómeros y los polímeros pueden formularse como una sal del oligómero o del polímero o pueden estar virtualmente o completamente desprovistos de sal. Los oligómeros y/o los polímeros pueden suministrar GHB con un intervalo de farmacocinética diferente y deseable. Esto incluye la liberación prolongada, la liberación en estado estacionario y las dosis controladas, tanto bajas como altas.

El gamma-hidroxitirato y/o sus oligómeros y/o polímeros y/o sus formas deuteradas pueden formularse para liberación controlada, tal como liberación inmediata, liberación prolongada, liberación retardada, liberación pulsátil o combinaciones de las mismas. En algunas divulgaciones, el intervalo de peso molecular del oligómero o del polímero es de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 50.000 daltons, preferentemente de aproximadamente 500

daltons a aproximadamente 25.000 daltons, de forma más preferida de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 15.000 daltons, de la forma más preferida de aproximadamente 500 daltons a aproximadamente 10.000 daltons. En algunas divulgaciones, la composición puede contener dos o más oligómeros o polímeros que tienen pesos moleculares promedio en peso diferentes. Por ejemplo, en una divulgación, la composición contiene un primer oligómero/polímero que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 500 a aproximadamente 2.000 daltons y un segundo oligómero/polímero que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 10.000 daltons.

En otras divulgaciones, la composición puede contener oligómeros saturados con una sal de 4HB o GBL, de tal forma que la dosificación de 4HB sea bifásica con una primera liberación rápida seguida de una liberación lenta de los oligómeros para lograr una dosis única cuando se administra por la noche (por ejemplo, antes de ir a la cama).

El uso de oligómeros y polímeros puede superar algunas limitaciones a veces asociadas con el uso del monómero. Por ejemplo, se ha informado del desarrollo de hipernatremia y alcalosis metabólica como resultado de la administración de grandes dosis de GHB cuando se administra como la sal de sodio en lugar de un ácido libre, especialmente a lo largo de periodos prolongados. Se ha informado que estas afecciones se desarrollaron en pacientes sometidos a hemodiálisis. El uso de oligómeros o polímeros de GHB puede reducir la cantidad de iones sodio administrados y, por lo tanto, evitar los efectos secundarios asociados con altas concentraciones de iones sodio.

Además de los problemas asociados con la administración de la forma de sal de sodio de GHB, la semivida de GHB es relativamente corta (35 minutos, con una concentración en plasma máxima de 20-60 minutos después de la administración oral), lo que requiere una administración más frecuente de GHB para mantener sus efectos terapéuticos. Por ejemplo, se ha informado de que el aumento de la dosis de GHB de tres veces al día a seis veces al día fue beneficioso en el tratamiento del alcoholismo, en particular para una población de pacientes que no respondía bien a dosis menos frecuentes. Además, en el tratamiento de pacientes narcolépticos, se encontró que para los pacientes eran beneficiosas dos o incluso tres dosis de GHB durante la noche en lugar de una dosis única que dejaba a los pacientes completamente despiertos antes de su hora de despertar planificada (Scharf, *Sleep*, 21: 507-14 (1998))). Además, los oligómeros/polímeros no se disuelven fácilmente en bebidas tales como refrescos, zumos de frutas o bebidas alcohólicas, lo que debería reducir su potencial de uso indebido.

En otra divulgación, el GHB y sus oligómeros, sus polímeros y sus formas de sal pueden modificarse sustituyendo algunos o todos sus átomos de hidrógeno por deuterio o flúor. Se ha demostrado que la sustitución completa o parcial de los átomos de hidrógeno por deuterio en las moléculas del fármaco afecta positivamente a las propiedades medicinales de los fármacos. En particular, se ha demostrado que las tasas metabólicas de las moléculas del fármaco cambian, ya que los enlaces C-H son más débiles que los enlaces C-D (el átomo de deuterio es el doble de pesado), las reacciones metabólicas que dependen de la rotura de dichos enlaces en su etapa limitante en su velocidad se ralentizan, aunque en otros aspectos químicos y farmacológicos no se observan diferencias significativas. Varias empresas se dedican a este sector de investigación, y estas incluyen Concert Pharmaceuticals, Protia y Auspex.

Los procedimientos para crear análogos deuterados de compuestos orgánicos se describen en las patentes siguientes: la patente de Estados Unidos N° 5.221.768 describe cómo deuterar hidroxiaácidos utilizando agua pesada (D₂O) con un catalizador de cloruro de rodio (III). La mezcla se calienta después moderadamente a presión para iniciar el intercambio de hidrógeno-deuterio. La patente de Estados Unidos N° 4.421.865 describe el uso de columnas de intercambio iónico para deuterar moléculas orgánicas. La solicitud de patente N° US2012/122.952 describe cómo producir un análogo deuterado de GHB comenzando en primer lugar con el éster t-butílico de 4-hidroxibutirato (preparado a partir de ácido succínico) y después haciéndolo reaccionar en metanol deuterado en presencia de carbonato de potasio. Después de que se completa el intercambio de hidrógeno-deuterio, el compuesto se saponifica con hidróxido de sodio para formar oxiato de sodio deuterado. La presente invención proporciona un procedimiento para producir un poli(4-hidroxibutirato) deuterado tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, comprendiendo dicho procedimiento alimentar con glucosa deuterada (d-glucosa) microbios manipulados genéticamente que producen polímero P4HB, o llevar a cabo la fermentación en D₂O con o sin d-glucosa como alimento. El polímero así producido tendría deuterio reemplazando la mayor parte de los átomos de hidrógeno, si no todos. Puede prepararse GBL deuterada (d-GBL) a partir del poli(4-hidroxibutirato) deuterado tal como se ha descrito previamente (mediante pirólisis) y la d-GBL se convierte en d-oxiato de sodio por saponificación. Los procedimientos para crear análogos fluorados de compuestos orgánicos se describen en la patente internacional N° WO2012/214162.

A. Otros compuestos derivados de GBL o GBL deuterada

Otros compuestos que tienen una huella de carbono única pueden prepararse a partir de GBL o GBL deuterada. Los compuestos que tienen una huella única que puede prepararse a partir de GBL o GBL deuterada incluyen, pero sin limitación, poli(4-hidroxibutirato) o poli(4-hidroxibutirato) deuterado, 2-pirrolidona o 2-pirrolidona deuterada, 1,4-butanodiol o 1,4-butanodiol deuterado, tetrahidrofurano (THF) o THF deuterado, n-metilpirrolidona (NMP) o NMP deuterada, n-etilpirrolidona (NEP) o NEP deuterada, n-vinilpirrolidona (NVP) o NVP deuterada y polivinilpirrol (PVP) o PVP deuterado. Estos compuestos pueden utilizarse como agentes activos, excipientes y/o disolventes en formulaciones farmacéuticas tal como se describe a continuación. En otras divulgaciones, uno o más de estos

compuestos son precursores de uno o más agentes activos. Por ejemplo, la 2-pirrolidona es un precursor de los agentes activos Cotinina, Doxapram, Piracetam, Povidona y Etosuximida.

B. Derivados de 4-hidroxiutirato (4HB)

También se pueden preparar derivados de 4HB que tengan una huella de carbono única. Ejemplos de derivados se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 8.461.197 de Tung, que incluye compuestos representados por las fórmulas B, B-II, B-III, I, II, S-II y III. Los compuestos que tienen una huella de carbono única pueden no contener deuterio o contener un deuterio o más de un deuterio.

Los polímeros de P4HB deuterados producidos utilizando los procedimientos descritos en el presente documento son útiles en una serie de aplicaciones biomédicas que incluyen fibras que se utilizan para suturas y mallas tal como se describe en las patentes de Estados Unidos N° 6.245.537; 6.610.764, 6.548.569, 6.623.730, 8.034.270, así como otras patentes asignadas a Tephra, Inc.

III. Formulaciones

Los compuestos divulgados en el presente documento pueden formularse para administración enteral, parenteral, tópica o pulmonar. Los compuestos se pueden combinar con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables que se consideran seguros y eficaces y se pueden administrar a un individuo sin causar efectos secundarios biológicos no deseados ni interacciones no deseadas. El vehículo lo constituyen todos los componentes presentes en la formulación farmacéutica distintos del o de los ingredientes activos.

A. Formulaciones de administración parenteral

Los compuestos divulgados en el presente documento pueden formularse para administración parenteral. "Administración parenteral", tal como se utiliza en el presente documento, significa la administración por cualquier procedimiento que no sea a través del sistema digestivo ni a través de vías tópicas o regionales no invasivas. Por ejemplo, la administración parenteral puede incluir la administración a un paciente por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intravítrea, intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, intrapericárdica, intraumbilical, por inyección y por infusión.

Las formulaciones de administración parenteral se pueden preparar en forma de composiciones acuosas utilizando técnicas conocidas en la técnica. Típicamente, dichas composiciones pueden prepararse como formulaciones inyectables, por ejemplo, soluciones o suspensiones; formas sólidas que son adecuadas para usarlas para preparar soluciones o suspensiones tras la adición de un medio de reconstitución antes de la inyección; emulsiones, tales como emulsiones de agua en aceite (w/o), emulsiones de aceite en agua (o/w) y microemulsiones de las mismas, liposomas o emulsomas.

El vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, uno o más polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), aceites, tales como aceites vegetales (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de sésamo, etc.) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio.

Las soluciones y las dispersiones de los compuestos activos en forma de su ácido o su base libre o sus sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua u otro disolvente o medio dispersante mezclados de forma adecuada con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen, entre otros, tensioactivos, dispersantes, emulsionantes, agentes modificadores del pH, agentes modificadores de la viscosidad y combinaciones de los mismos.

Los tensioactivos adecuados pueden ser agentes tensioactivos aniónicos, catiónicos, anfóteros o no iónicos. Los tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, aquellos que contienen iones carboxilato, sulfonato y sulfato. Los ejemplos de tensioactivos aniónicos incluyen alquilsulfonatos y alquilarilsulfonatos de cadena larga de sodio, potasio, amonio tales como dodecilsulfonatos de sodio; dialquilsulfosuccinatos de sodio, tales como bis-(2-etiltioxil)-sulfosuccinato de sodio; y alquilsulfatos tales como laurilsulfato de sodio. Los tensioactivos catiónicos incluyen, pero sin limitación, compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bromuro de cetrimonio, cloruro de estearildimetilbencilamonio, polioxietileno y amina de coco. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos incluyen monoestearato de etilenglicol, miristato de propilenglicol, monoestearato de glicerilo, estearato de glicerilo, 4-oleato de poliglicerilo, acilato de sorbitán, acilato de sacarosa, laurato de PEG-150, monolaurato de PEG-400, monolaurato de polioxietileno, polisorbatos, polioxietileno-octilfeniléter, PEG-1000-cetiléter, polioxietilendeciléter, polipropilenglicolbutiléter, Poloxamer® 401, estearoil-monoisopropanolamida y amida de polioxietileno-sebo

hidrogenado. Los ejemplos de tensioactivos anfóteros incluyen N-dodecil- β -alanina sódica, N-lauril- β -iminodipropionato de sodio, miristoanfoacetato, lauril-betaína y lauril-sulfobetaína.

5 La formulación puede contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Los conservantes adecuados incluyen, pero sin limitación, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y timerosal. La formulación también puede contener un antioxidante para evitar la degradación del o de los agentes activos.

10 La formulación se tampona típicamente a un pH de 3-8 para administración parenteral tras la reconstitución. Los tampones adecuados incluyen, entre otros, tampones de fosfato, tampones de acetato y tampones de citrato.

Se utilizan a menudo polímeros hidrosolubles en formulaciones para la administración parenteral. Los polímeros hidrosolubles adecuados incluyen, pero sin limitación, polivinilpirrolidona, dextrano, carboximetilcelulosa y polietilenglicol.

15 Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente o el medio de dispersión apropiado con uno o más de los excipientes enumerados anteriormente, según sea necesario, operación seguida de esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de
20 soluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y liofilización que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada de forma estéril del mismo. Los polvos pueden prepararse de forma que las partículas sean de naturaleza porosa, lo que puede aumentar la disolución de las partículas. Los procedimientos para producir partículas porosas son bien conocidos en la técnica.

25 Xyrem®, comercializado por Jazz Pharmaceuticals, es una solución de GHB para administración oral. El pH de la solución se controla cuidadosamente para resistir el crecimiento microbiano y evitar la degradación de GHB dando GBL u otras sustancias.

30 El pH puede ser de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 10,3, o aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,2, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,5, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,7, aproximadamente 5,8, aproximadamente 5,9, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,6, aproximadamente 8,7, aproximadamente 8,8, aproximadamente 8,9, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,1, aproximadamente 9,2, aproximadamente 9,3, aproximadamente 9,4, aproximadamente 9,5, aproximadamente 9,6, aproximadamente 9,7, aproximadamente 9,8, aproximadamente 9,9, aproximadamente 10,0, aproximadamente 10,1, aproximadamente 10,2 o aproximadamente 10,3, y todos los valores de pH entre cada uno de los valores de pH enumerados, de los medios acuosos. En algunas divulgaciones, el pH se encuentra entre aproximadamente 6 y 8,5, siendo, por ejemplo, de 7,5 a 8,5. Esto producirá una composición de GHB que es resistente al crecimiento microbiano tal como se define en el ensayo divulgado en el presente documento.

50 Estos valores de pH producirán composiciones resistentes al crecimiento microbiano en un medio acuoso si la cantidad de GHB añadida, mezclada o disuelta es de más de aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 450 mg/ml, es decir, de más de aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml, aproximadamente 230 mg/ml, aproximadamente 240 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 260 mg/ml, aproximadamente 270 mg/ml, aproximadamente 280 mg/ml, aproximadamente 290 mg/ml, aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 310 mg/ml, aproximadamente 320 mg/ml, aproximadamente 330 mg/ml, aproximadamente 340 mg/ml, aproximadamente 350 mg/ml, aproximadamente 360 mg/ml, aproximadamente 370 mg/ml, aproximadamente 380 mg/ml, aproximadamente 390 mg/ml, aproximadamente 400 mg/ml, aproximadamente 410 mg/ml, aproximadamente 420 mg/ml, aproximadamente 430 mg/ml, aproximadamente 440 mg/ml, a aproximadamente 450 mg/ml, y todas las cantidades de GHB que se encuentren entre los valores enumerados.

65 La composición también puede contener un agente de ajuste del pH o tampón. Dichos agentes pueden ser ácidos, bases o combinaciones de los mismos. En determinadas divulgaciones, el ácido puede ser un ácido orgánico, preferentemente un ácido carboxílico o un ácido alfa-hidroxicarboxílico. En otras determinadas divulgaciones, el ácido se selecciona del grupo que incluye, pero sin limitación, ácido acético, ácido acetilsalicílico, barbital, ácido barbitúrico,

ácido benzoico, bencilpenicilina, ácido bórico, cafeína, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido dicloroacético, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido fórmico, ácido glicerofosfórico, glicina, ácido láctico, ácido málico, ácido mandélico, ácido monocloroacético, ácido oxálico, fenobarbital, fenol, ácido pícrico, ácido propiónico, sacarina, ácido salicílico, hidrogenofosfato de sodio, ácido succínico, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfapiridina, sulfatiazol, ácido tartárico, ácido tricloroacético, y similares, o ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico, y similares. En una divulgación particular, el ácido es ácido málico o ácido clorhídrico. En otras determinadas divulgaciones, el agente de ajuste del pH puede ser una base seleccionada del grupo que incluye, sin limitación, acetanilida, amoniaco, apomorfina, atropina, benzocaína, cafeína, hidróxido de calcio, cocaína, codeína, efedrina, morfina, papaverina, fisostigmina, pilocarpina, bicarbonato de potasio, hidróxido de potasio, procaína, quinina, reserpina, bicarbonato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio, citrato de sodio, tartrato de sodio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, teobromina, tiourea o urea. En otras determinadas divulgaciones, el agente de ajuste del pH puede ser una mezcla de más de un ácido y/o más de una base. En otras divulgaciones particulares, se utilizan un ácido débil y su base conjugada para formar un agente tampón para ayudar a estabilizar el pH de la composición.

En determinadas divulgaciones, la composición puede contener una o más sales. Se entiende que una "sal" en el presente documento significa un compuesto formado por la interacción de un ácido y una base, siendo reemplazados los átomos de hidrógeno del ácido por el ion positivo de la base. Se contemplan diversas sales, incluidas sales de GHB, particularmente como agentes de ajuste del pH o tampón. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como los ácidos málico, acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, silicatos, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Se pueden utilizar sales de metales alcalinos tales como litio, potasio, sodio y similares, preferentemente con un ácido para formar un agente de ajuste del pH. Otras sales incluyen amonio, calcio, magnesio y similares. En una divulgación, una sal de GHB que contiene un metal alcalino se puede combinar con un ácido para crear una composición que presente el pH deseado cuando se mezcla con un medio acuoso. En otra divulgación, se puede combinar una base débil con GHB para crear una composición que presente el pH deseado cuando se mezcla con una solución acuosa. Por supuesto, se pueden formar otras sales a partir de los compuestos descritos en el presente documento, o tal como conocerá un experto en la técnica, y se contemplan todas esas sales.

En determinadas divulgaciones, se pueden añadir excipientes a la composición. Un "excipiente", tal como se utiliza en el presente documento, significará sustancias más o menos inertes añadidas como diluyentes o vehículos o para dar forma o consistencia cuando el remedio se encuentra en forma sólida, aunque pueden estar contenidos en preparaciones que presentan una forma líquida, por ejemplo jarabes, polvos aromáticos, miel y varios elixires. Los excipientes también pueden potenciar la resistencia al crecimiento microbiano y, por lo tanto, actuar como conservante. Dichos excipientes incluyen, pero sin limitación, xilitol, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, derivados de celulosa, carbonato de magnesio y similares.

En determinadas divulgaciones, la composición farmacéutica puede contener un conservante. Se entiende que un "conservante" en el presente documento significa una sustancia añadida para inhibir un cambio químico o una acción microbiana. Dichos conservantes pueden incluir, pero sin limitación, xilitol, benzoato de sodio, metilparabeno, galato de propilo BP, ácido sórbico, clorobutanol, ácido dihidroacético, monotioglicerol, benzoato de potasio, propilparabeno, ácido benzoico, cloruro de benzalconio, alcohol, ácido benzoico, cloruro de benzalconio, cloruro de benconio, alcohol bencílico, butilparabeno, cloruro de cetilpiridinio, etilendiamina, etilparabeno, etilvainillina, glicerina, ácido hipofosforoso, metilparabeno, fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, propilparabeno, aceite de sasafrás, benzoato de sodio, propionato de sodio, timerosal y sorbato de potasio. Los conservantes pueden seleccionarse del grupo que comprende, pero sin limitación, xilitol, benzoato de sodio, metilparabeno, propilparabeno y sorbato de potasio. El xilitol actúa como conservante y edulcorante, es un agente preventivo de la caries, es menos laxante que otros edulcorantes y está recomendado para diabéticos.

En determinadas divulgaciones, la composición farmacéutica también puede contener un antioxidante. Se entiende que un "antioxidante" en el presente documento significa una sustancia que inhibe la oxidación. Dichos antioxidantes incluyen, pero sin limitación, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, metabisulfito de potasio, metabisulfito de sodio, anoxómero y ácido maleico BP.

En determinadas divulgaciones, la composición farmacéutica también puede contener un agente aromatizante. Se entiende que un "agente aromatizante" en el presente documento significa una sustancia que altera el sabor de la composición durante su consumo oral. Un tipo de "agente aromatizante" sería un edulcorante. Los edulcorantes o agentes aromatizantes pueden ser no metabolizables por vía microbiana. Los edulcorantes o agentes aromatizantes incluyen carbohidratos tales como xilitol y sorbitol. Dichos agentes aromatizantes incluyen, pero sin limitación, jarabe de acacia, anetol, aceite de anís, elixir aromático, benzaldehído, elixir compuesto de benzaldehído, comino, aceite de comino, aceite de cardamomo, semillas de cardamomo, licor de cardamomo, tintura compuesta de cardamomo, zumo de cereza, jarabe de cereza, canela, aceite de canela, agua de canela, ácido cítrico, jarabe de ácido cítrico, aceite de clavo, coca, jarabe de coca, aceite de cilantro, dextrosa, Eriodyction, extracto de fluido de Eriodyction, jarabe de Eriodyction aromático, acetato de etilo, etilo, vainillina, aceite de hinojo, jengibre, extracto de fluido de jengibre, oleorresina de jengibre, glucosa, glicerina, Glycyrrhiza, elixir de Glycyrrhiza, extracto de Glycyrrhiza, extracto puro de

5 Glycyrrhiza, extracto de fluido de Glycyrrhiza, jarabe de Glycyrrhiza, miel, elixir no alcohólico, aceite de lavanda, extracto o aceite de cítricos, aceite de limón, tintura de limón, manitol, salicilato de metilo, aceite de nuez moscada, elixir de naranja amarga, aceite de naranja amarga, aceite de flor de naranjo, agua de flor de naranjo, aceite de naranja, cáscara de naranja amarga, tintura de cáscara de naranja dulce, licor compuesto de naranja, compuesto, jarabe de

10 En las patentes de Estados Unidos Nº 6.780.889, 7.262.219, 7.851.506 y 8.263.650 de Cook et al. se describen formulaciones específicas.

1. Formulaciones de liberación controlada

15 Las formulaciones de administración parenteral descritas en el presente documento pueden formularse para liberación controlada, que incluye liberación inmediata, liberación retardada, liberación prolongada, liberación pulsátil y combinaciones de las mismas.

20 i. Nanopartículas y micropartículas

25 Para administración parenteral, pueden incorporarse el gamma-hidroxibutirato, y uno o más agentes activos adicionales opcionales, en micropartículas, nanopartículas o combinaciones de las mismas que proporcionan una liberación controlada del gamma-hidroxibutirato y/o uno o más agentes activos adicionales. En divulgaciones en las que las formulaciones contienen dos o más fármacos, los fármacos pueden formularse para el mismo tipo de liberación controlada (por ejemplo, retardada, prolongada, inmediata o pulsátil) o los fármacos pueden formularse independientemente para diferentes tipos de liberación (por ejemplo, inmediata y retardada, inmediata y prolongada, retardada y prolongada, retardada y pulsátil, etc.).

30 Por ejemplo, el gamma-hidroxibutirato y/o uno o más agentes activos adicionales pueden incorporarse en micropartículas poliméricas que proporcionan una liberación controlada del o de los fármacos. La liberación de los fármacos se controla mediante la difusión del o de los fármacos al exterior de las micropartículas y/o la degradación de las partículas poliméricas por hidrólisis y/o degradación enzimática. Los polímeros adecuados incluyen etilcelulosa y otros derivados de celulosa naturales o sintéticos.

35 Los polímeros que son lentamente solubles y forman un gel en un entorno acuoso, tales como hidroxipropilmetilcelulosa u poli(óxido de etileno), también pueden ser adecuados como materiales para micropartículas que contienen fármacos. Otros polímeros incluyen, pero sin limitación, polianhídridos, poli(anhídridos de éster), polihidroxiácidos, tales como poliláctido (PLA), poliglicólido (PGA), poli(láctido-co-glicólido) (PLGA), poli-3-hidroxibutirato (PHB) y sus copolímeros, poli-4-hidroxibutirato (P4HB) y sus copolímeros, policaprolactona y sus copolímeros, y combinaciones de los mismos. Alternativamente, el o los fármacos pueden incorporarse en micropartículas preparadas a partir de materiales que son insolubles en solución acuosa o lentamente solubles en solución acuosa, pero que son capaces de degradarse dentro del sistema GI por medios que incluyen degradación enzimática, acción tensioactiva de los ácidos biliares y/o erosión mecánica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "lentamente soluble en agua" se refiere a materiales que no se disuelven en agua dentro de un periodo de 30 minutos. Los ejemplos incluyen grasas, sustancias grasas, ceras, sustancias cerosas y sus mezclas. Las grasas y las sustancias grasas adecuadas incluyen alcoholes grasos (tales como alcohol laurílico, miristilsteárico, cetílico o cetosteárico), ácidos grasos y derivados, incluidos, pero sin limitación, ésteres de ácidos grasos, glicéridos (monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos) de ácidos grasos y grasas hidrogenadas. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, aceite vegetal hidrogenado, aceite de semilla de algodón hidrogenado, aceite de ricino hidrogenado, aceites hidrogenados disponibles con la denominación comercial Sterotex®, ácido esteárico, manteca de cacao y alcohol estearílico. Las ceras y los materiales cerosos adecuados incluyen ceras naturales o sintéticas, hidrocarburos y ceras normales. Los ejemplos específicos de ceras incluyen cera de abejas, Glycowax, cera de ricino, cera de carnauba, parafinas y cera de candelilla. Tal como se utiliza en el presente documento, un material ceroso se define como cualquier material que normalmente es sólido a temperatura ambiente y tiene un punto de fusión de aproximadamente 30 a 300 °C.

60 En algunos casos, puede ser deseable alterar la tasa de penetración del agua en las micropartículas. Para este fin, se pueden formular agentes (de mecha) que controlan la tasa junto con las grasas o ceras enumeradas anteriormente. Los ejemplos de materiales que controlan la tasa incluyen determinados derivados de almidón (por ejemplo, maltodextrina cerosa y almidón de maíz secado en tambor), derivados de celulosa (por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa), ácido algínico, lactosa y talco. Además, se puede añadir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, lecitina) para facilitar la degradación de dichas micropartículas.

65 También se pueden utilizar proteínas que son insolubles en agua, tales como la zeína, como materiales para la formación de micropartículas que contienen fármacos. Además, pueden formularse proteínas, polisacáridos y

combinaciones de los mismos que son hidrosolubles con el fármaco en micropartículas y posteriormente reticularse para formar una red insoluble. Por ejemplo, las ciclodextrinas pueden complejarse con moléculas de fármacos individuales y subsiguientemente reticularse.

5 La encapsulación o incorporación de fármaco en materiales vehículo para producir micropartículas que contienen fármacos se puede lograr por medio de técnicas de formulación farmacéutica conocidas. En el caso de la formulación en grasas, ceras o materiales cerosos, el material de vehículo se calienta típicamente por encima de su temperatura de fusión y se añade el fármaco para formar una mezcla que comprende partículas de fármaco suspendidas en el material vehículo, fármaco disuelto en el material vehículo, o una mezcla de los mismos. Las micropartículas se pueden formular posteriormente a través de varios procedimientos que incluyen, pero sin limitación, los procesos de congelación, extrusión, enfriamiento por pulverización o dispersión acuosa. En un proceso, la cera se calienta por encima de su temperatura de fusión, se añade el fármaco y la mezcla de cera fundida-fármaco se solidifica con agitación constante a medida que la mezcla se enfría. Alternativamente, la mezcla de cera fundida-fármaco puede extrudirse y esferonizarse para formar gránulos o perlas. Estos procesos son conocidos en la técnica.

15 Para algunos materiales vehículo puede ser deseable utilizar una técnica de evaporación de disolvente para producir micropartículas que contengan fármacos. En este caso, el fármaco y el material vehículo se disuelven conjuntamente en un disolvente mutuo y posteriormente pueden producirse micropartículas mediante varias técnicas que incluyen, pero sin limitación, formar una emulsión en agua u otro medio apropiado, secar por pulverización o evaporar el disolvente de la solución masiva y moler el material resultante.

25 En algunas divulgaciones, el fármaco en forma de partículas se dispersa homogéneamente en un material insoluble en agua o lentamente soluble en agua. Para minimizar el tamaño de las partículas del fármaco dentro de la composición, el polvo del fármaco en sí puede molerse para generar partículas finas antes de la formulación. Puede utilizarse para este propósito el proceso de molido por chorro, conocido en la técnica farmacéutica. En algunas divulgaciones, el fármaco en forma de partículas se dispersa homogéneamente en una cera o una sustancia cerosa calentando la cera o la sustancia cerosa por encima de su punto de fusión y añadiendo las partículas del fármaco mientras se agita la mezcla. En este caso, se puede añadir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a la mezcla para facilitar la dispersión de las partículas del fármaco.

30 Las partículas también pueden recubrirse con uno o más recubrimientos de liberación modificada. Se pueden aplicar por pulverización ésteres sólidos de ácidos grasos, que son hidrolizados por lipasas, para formar un recubrimiento sobre micropartículas o partículas de fármacos. La zeína es un ejemplo de una proteína naturalmente insoluble en agua. La aplicación para formar un recubrimiento sobre micropartículas que contienen fármacos o partículas de fármacos se puede realizar mediante recubrimiento por pulverización o mediante técnicas de granulación en húmedo. Además de materiales naturalmente insolubles en agua, algunos sustratos de enzimas digestivas se pueden tratar con procedimientos de reticulación, lo que da como resultado la formación de redes no solubles. Se ha informado de muchos procedimientos de reticulación de proteínas, iniciados tanto por medios químicos como físicos. Uno de los procedimientos más comunes para obtener una reticulación es el uso de agentes químicos de reticulación. Los ejemplos de agentes químicos de reticulación incluyen aldehídos (gluteraldehído y formaldehído), compuestos epoxídicos, carbodiimidas y genipina. Además de estos agentes de reticulación, se han utilizado azúcares oxidados y nativos para reticular la gelatina. La reticulación también se puede realizar utilizando medios enzimáticos; Por ejemplo, la transglutaminasa ha sido aprobada como una sustancia GRAS para la reticulación de productos de marisco. Finalmente, la reticulación puede iniciarse por medios físicos tales como tratamiento térmico, irradiación UV e irradiación gamma.

45 Para producir una capa de recubrimiento de proteína reticulada que rodee micropartículas que contienen fármaco o partículas de fármaco, se puede aplicar por pulverización para formar un recubrimiento una proteína hidrosoluble sobre las micropartículas y posteriormente reticularla mediante uno de los procedimientos descritos anteriormente. Alternativamente, las micropartículas que contienen fármacos pueden microencapsularse dentro de la proteína mediante coacervación-separación de fase (por ejemplo, mediante la adición de sales) y posteriormente reticularla. Algunas proteínas adecuadas para este propósito incluyen gelatina, albúmina, caseína y gluten.

50 Los polisacáridos también pueden reticularse para formar una red insoluble en agua. Para muchos polisacáridos, esto se puede realizar mediante reacción con sales de calcio o cationes multivalentes que reticulan las cadenas principales de polímeros. La pectina, el alginato, el dextrano, la amilosa y la goma guar se someten a reticulación en presencia de cationes multivalentes. También se pueden formar complejos entre polisacáridos con carga opuesta; la pectina y el quitosano, por ejemplo, pueden formar complejos mediante interacciones electrostáticas.

55 En determinadas divulgaciones, puede ser deseable proporcionar un suministro continuo del gamma-hidroxibutirato a un paciente con necesidad de ello. Para las vías intravenosas o intraarteriales, esto se puede lograr utilizando sistemas de goteo, tales como la administración intravenosa. Para aplicaciones tópicas, se puede realizar una aplicación repetida o se puede utilizar un parche para proporcionar la administración continua del gamma-hidroxibutirato durante un periodo prolongado de tiempo.

65

2. Implantes sólidos inyectables/implantables

El gamma-hidroxi-butilato divulgado en el presente documento puede incorporarse en implantes sólidos o semisólidos inyectables/implantables, tales como implantes poliméricos. En una divulgación, el gamma-hidroxi-butilato se incorpora a un polímero que es un líquido o una pasta a temperatura ambiente, pero que después de entrar en contacto con un medio acuoso, tal como fluidos fisiológicos, muestra un aumento de la viscosidad para formar un material semisólido o sólido. Los ejemplos de polímeros incluyen, pero sin limitación, poliésteres de ácido hidroxi-alcanoico derivados de la copolimerización de al menos un ácido hidroxi-graso insaturado copolimerizado con ácidos hidroxi-alcanoicos. El polímero se puede fundir, mezclar con el principio activo y colar o moldear por inyección en un dispositivo. Dicha fabricación en estado fundido requiere polímeros que tengan un punto de fusión que sea inferior a la temperatura a la que la sustancia que se va a suministrar y el polímero se degraden o se vuelvan reactivos. El dispositivo también se puede preparar mediante colada con disolvente, en la que el polímero se disuelve en un disolvente y el fármaco se disuelve o se dispersa en la solución de polímero y el disolvente se evapora. Los procesos disolventes requieren que el polímero sea soluble en disolventes orgánicos. Otro procedimiento es el moldeo por compresión de un polvo mixto del polímero y el fármaco o partículas de polímero cargadas con el agente activo.

Alternativamente, el gamma-hidroxi-butilato puede incorporarse a una matriz polimérica y moldearse, comprimirse o extrudirse en un dispositivo que sea sólido a temperatura ambiente. Por ejemplo, el gamma-hidroxi-butilato se puede incorporar a un polímero biodegradable, tal como polianhídridos, ácidos polihidroalcanoicos (PHA), PLA, PGA, PLGA, policaprolactona, poliésteres, poliamidas, poliortoésteres, polifosfacenos, proteínas y polisacáridos tales como colágeno, ácido hialurónico, albúmina y gelatina, y combinaciones de los mismos y comprimirse en un dispositivo sólido, tal como discos, o extrudirse en un dispositivo, tal como varillas.

La liberación de los, uno o más, gamma-hidroxi-butilatos del implante se puede variar mediante la selección del polímero, el peso molecular del polímero y/o la modificación del polímero para aumentar la degradación, tal como la formación de poros y/o la incorporación de enlaces hidrolizables. Los procedimientos para modificar las propiedades de los polímeros biodegradables para variar el perfil de liberación del gamma-hidroxi-butilato desde el implante son bien conocidos en la técnica.

B. Formulaciones de administración enteral

Las formas farmacéuticas de administración oral adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, jarabes y pastillas masticables. Los comprimidos se pueden producir utilizando técnicas de compresión o moldeo bien conocidas en la técnica. Las cápsulas de gelatina o no de gelatina pueden prepararse como cubiertas de cápsulas duras o blandas, que pueden encapsular materiales de relleno líquidos, sólidos y semisólidos, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Las formulaciones pueden prepararse utilizando un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en general en el presente documento, "vehículo" incluye, pero sin limitación, diluyentes, conservantes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, agentes de hinchamiento, materiales de carga, estabilizantes y combinaciones de los mismos.

El vehículo también incluye todos los componentes de la composición de recubrimiento que pueden incluir plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes estabilizantes y deslizantes. Las formulaciones farmacéuticas de liberación retardada pueden prepararse tal como se describe en referencias estándar. Estas referencias proporcionan información sobre vehículos, materiales, equipos y procesos para preparar comprimidos y cápsulas y formas farmacéuticas de liberación retardada de comprimidos, cápsulas y gránulos.

Los ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados incluyen, pero sin limitación, polímeros de celulosa tales como acetato-ftalato de celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa; acetato-ftalato de polivinilo, polímeros y copolímeros de ácido acrílico y resinas metacrílicas que están disponibles comercialmente con la denominación comercial EUDRAGIT® (Roth Pharma, Westerstadt, Alemania), zeína, goma laca y polisacáridos.

Adicionalmente, el material de recubrimiento puede contener vehículos convencionales tales como plastificantes, pigmentos, colorantes, deslizantes, agentes de estabilización, formadores de poros y tensioactivos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables opcionales incluyen, pero sin limitación, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, disgregantes, colorantes, estabilizantes y tensioactivos. Los diluyentes, también denominados "materiales de carga", son normalmente necesarios para aumentar el volumen de una forma farmacéutica sólida de modo que se proporcione un tamaño práctico para la compresión de comprimidos o la formación de perlas y gránulos. Los diluyentes adecuados incluyen, pero sin limitación, fosfato dicálcico dihidratado, sulfato de calcio, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, cloruro de sodio, almidón seco, almidones hidrolizados, almidón pregelatinizado, dióxido de silicón, óxido de titanio, silicato de aluminio y azúcar en polvo.

Los aglutinantes se utilizan para impartir cualidades cohesivas a una formulación farmacéutica sólida, y así asegurar que un comprimido o una perla o un gránulo permanezcan intactos después de la formación de las formas farmacéuticas. Los materiales aglutinantes adecuados incluyen, pero sin limitación, almidón, almidón pregelatinizado,

gelatina, azúcares (incluidos sacarosa, glucosa, dextrosa, lactosa y sorbitol), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto, alginato de sodio, celulosa, que incluye hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa y veegum, y polímeros sintéticos tales como copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de aminoalquilo y ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico y polivinilpirrolidona.

Los lubricantes se utilizan para facilitar la fabricación de comprimidos. Los ejemplos de lubricantes adecuados incluyen, pero sin limitación, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, behenato de glicerol, polietilenglicol, talco y aceite mineral.

Los disgregantes se utilizan para facilitar la disgregación o "degradación" de la forma farmacéutica después de su administración, y generalmente incluyen, pero sin limitación, almidón, almidonglicolato de sodio, carboximetilalmidón sódico, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, almidón pregelatinizado, arcillas, celulosa, alginina, gomas o polímeros reticulados, tales como PVP reticulado (Polyplasdone® XL de GAF Chemical Corp).

Los estabilizantes se utilizan para inhibir o retardar las reacciones de descomposición del fármaco que incluyen, a modo de ejemplo, reacciones oxidativas. Los estabilizantes adecuados incluyen, pero sin limitación, antioxidantes, hidroxitolueno butilado (BHT); ácido ascórbico, sus sales y ésteres; vitamina E, tocoferol y sus sales; sulfitos tales como metabisulfito de sodio; cisteína y sus derivados; ácido cítrico; galato de propilo e hidroxianisol butilado (BHA).

En algunas divulgaciones, la formulación se encuentra en forma de una forma farmacéutica sólida, tal como una cápsula o un comprimido, en la que la formulación es una forma farmacéutica de liberación inmediata que libera al menos el 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95% del gamma-hidroxi butirato en menos de una hora, realizándose la medición en agua desionizada utilizando el aparato USP 2 a $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con paletas a 50 rpm.

1. Formulaciones de liberación controlada

Las formas farmacéuticas de administración oral, tales como cápsulas, comprimidos, soluciones y suspensiones, pueden formularse para liberación controlada. Por ejemplo, el gamma-hidroxi butirato y uno o más agentes activos adicionales opcionales pueden formularse en nanopartículas, micropartículas y combinaciones de las mismas, y encapsularse en una cápsula de gelatina o no de gelatina blanda o dura o dispersarse en un medio dispersante para formar una suspensión de uso oral o un jarabe. Las partículas pueden estar formadas por el fármaco y un polímero o matriz de liberación controlada. Alternativamente, las partículas de fármaco pueden recubrirse con uno o más recubrimientos de liberación controlada antes de su incorporación a la forma farmacéutica terminada.

En otra divulgación, el gamma-hidroxi butirato y uno o más agentes activos adicionales opcionales se dispersan en un material de matriz, que se gelifica o se emulsiona al contacto con un medio acuoso, tal como fluidos fisiológicos. En el caso de los geles, la matriz se hincha atrapando los agentes activos, que se liberan lentamente a lo largo del tiempo por difusión y/o degradación del material de la matriz. Dichas matrices se pueden formular como comprimidos o como materiales de relleno para cápsulas duras y blandas.

En otra divulgación más, el gamma-hidroxi butirato, y uno o más agentes activos adicionales opcionales se formulan en una forma farmacéutica de administración oral vendida, tal como un comprimido o una cápsula, y la forma farmacéutica sólida se recubre con uno o más recubrimientos de liberación controlada, tales como recubrimientos de liberación retardada o recubrimientos de liberación prolongada. El recubrimiento o los recubrimientos también pueden contener el gamma-hidroxi butirato y/o agentes activos adicionales.

i. Formas farmacéuticas de liberación prolongada

Las formulaciones de liberación prolongada generalmente se preparan como sistemas de difusión u osmóticos, que son conocidos en la técnica. Un sistema de difusión consta típicamente de dos tipos de dispositivos, un depósito y una matriz, y es bien conocido y descrito en la técnica. Los dispositivos de matriz generalmente se preparan comprimiendo el fármaco con un vehículo polimérico de disolución lenta en forma de comprimido. Los tres tipos principales de materiales utilizados en la preparación de dispositivos de matriz son plásticos insolubles, polímeros hidrófilos y compuestos grasos. Las matrices de plástico incluyen, pero sin limitación, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, poli(cloruro de vinilo) y polietileno. Los polímeros hidrófilos incluyen, pero sin limitación, polímeros celulósicos tales como metilcelulosa y etilcelulosa, hidroxialquilcelulosas tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y Carbopol® 934, poli(óxidos de etileno) y mezclas de los mismos. Los compuestos grasos incluyen, pero sin limitación, varias ceras tales como cera de carnauba y triestearato de glicerilo y sustancias cerosas que incluyen aceite de ricino hidrogenado o aceite vegetal hidrogenado, o mezclas de los mismos.

En determinadas divulgaciones, el material plástico es un polímero acrílico farmacéuticamente aceptable, que incluye, pero sin limitación, copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de metilo, metacrilatos de etoxietilo, metacrilato de cianoetilo, copolímero de metacrilato de aminoalquilo, poli(ácido acrílico), poli(ácido metacrílico), copolímero de ácido metacrílico-alquilamina, poli(metacrilato de metilo), poli(anhidrido

de)(ácido metacrílico), polimetacrilato, poli(acrilamida), poli(anhídrido de ácido metacrílico) y copolímeros de metacrilato de glicidilo.

5 En determinadas divulgaciones, el polímero acrílico está compuesto por uno o más copolímeros de metacrilato de amonio. Los copolímeros de metacrilato de amonio son bien conocidos en la técnica, y se describen en NF XVII como copolímeros completamente polimerizados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico con un bajo contenido de grupos de amonio cuaternario.

10 En una divulgación, el polímero acrílico es una laca de resina acrílica tal como la que está disponible comercialmente de Rohm Pharma con la denominación comercial Eudragit®. En otras divulgaciones, el polímero acrílico comprende una mezcla de dos lacas de resina acrílica disponibles comercialmente de Rohm Pharma con las denominaciones comerciales Eudragit® RL30D y Eudragit® RS30D, respectivamente. Eudragit® RL30D y Eudragit® RS30D son copolímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos con un bajo contenido de grupos de amonio cuaternario, siendo la relación molar de grupos amonio con respecto a los ésteres (met)acrílicos neutros restantes de 1:20 en Eudragit® RL30D y de 1:40 en Eudragit® RS30D. El peso molecular medio es de aproximadamente 150.000. También se mencionan Eudragit® S-100 y Eudragit® L-100. Las designaciones de código RL (alta permeabilidad) y RS (baja permeabilidad) se refieren a las propiedades de permeabilidad de estos agentes. Las mezclas Eudragit® RL/RS son insolubles en agua y en fluidos digestivos. Sin embargo, los sistemas multiparticulados formados para incluir los mismos son hinchables y permeables en soluciones acuosas y fluidos digestivos. Los polímeros descritos anteriormente, tales como Eudragit® RL/RS, se pueden mezclar entre sí en cualquier proporción deseada para obtener finalmente una formulación de liberación mantenida que tenga un perfil de disolución deseable. Se pueden obtener sistemas multiparticulados de liberación mantenida deseables, por ejemplo, del 100% de Eudragit® RL, el 50% de Eudragit® RL y el 50% de Eudragit® RS, y el 10% de Eudragit® RL y el 90% de Eudragit® RS. Un experto en la técnica reconocerá que también se pueden utilizar otros polímeros acrílicos, tales como, por ejemplo, Eudragit® L.

25 Como alternativa, las formulaciones de liberación prolongada pueden prepararse utilizando sistemas osmóticos o aplicando un recubrimiento semipermeable a la forma farmacéutica. En el último caso, el perfil de liberación del fármaco deseado se puede lograr combinando materiales de recubrimiento de baja permeabilidad y de alta permeabilidad en una proporción adecuada.

30 Los dispositivos con diferentes mecanismos de liberación de fármaco descritos anteriormente se pueden combinar en una forma farmacéutica final que comprende unidades individuales o múltiples. Los ejemplos de unidades múltiples incluyen, entre otros, comprimidos y cápsulas de múltiples capas que contienen comprimidos, perlas o gránulos. Se puede añadir una porción de liberación inmediata al sistema de liberación prolongada mediante la aplicación de una capa de liberación inmediata sobre el núcleo de liberación prolongada utilizando un proceso de recubrimiento o compresión o en un sistema de unidades múltiples tal como una cápsula que contiene perlas de liberación prolongada e inmediata.

40 Los comprimidos de liberación prolongada que contienen polímeros hidrófilos se preparan mediante técnicas conocidas en general en la técnica, tales como compresión directa, granulación en húmedo o granulación en seco. Sus formulaciones generalmente incorporan polímeros, diluyentes, aglutinantes y lubricantes, así como el ingrediente farmacéutico activo. Los diluyentes habituales incluyen sustancias en polvo inertes tales como almidones, celulosa en polvo, especialmente celulosa cristalina y microcristalina, azúcares tales como fructosa, manitol y sacarosa, harinas de grano y polvos comestibles similares. Los diluyentes típicos incluyen, por ejemplo, diversos tipos de almidón, lactosa, manitol, caolín, fosfato o sulfato de calcio, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio y azúcar en polvo. Los derivados de celulosa en polvo también son útiles. Los aglutinantes de comprimidos típicos incluyen sustancias tales como almidón, gelatina y azúcares como lactosa, fructosa y glucosa. También se pueden utilizar gomas naturales y sintéticas, que incluyen acacia, alginatos, metilcelulosa y polivinilpirrolidona. También pueden servir como aglutinantes polietilenglicol, polímeros hidrófilos, etilcelulosa y ceras. Es necesario un lubricante en una formulación de comprimido para evitar que el comprimido y los punzones se adhieran al troquel. El lubricante se elige entre sólidos resbaladizos tales como talco, estearato de magnesio y calcio, ácido esteárico y aceites vegetales hidrogenados.

50 Los comprimidos de liberación prolongada que contienen materiales de cera generalmente se preparan utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como un procedimiento de mezcla directa, un procedimiento de solidificación y un procedimiento de dispersión acuosa. En el procedimiento de solidificación, el fármaco se mezcla con un material de cera y se solidifica por pulverización o se solidifica y se tamiza y se procesa.

60 En algunas divulgaciones, la formulación es una formulación de liberación controlada en forma de una forma farmacéutica sólida, tal como una cápsula o un comprimido. La formulación puede contener un núcleo que contiene gamma-hidroxibutirato o una sal del mismo y uno o más materiales, tales como materiales poliméricos, que proporcionan una liberación controlada del gamma-hidroxibutirato. El núcleo puede realizar la liberación del gamma-hidroxibutirato durante un periodo prolongado de tiempo, por ejemplo, superior a 2, 3, 4, 6, 7 u 8 horas, tal como 6-8 horas. La formulación también puede contener un recubrimiento de liberación inmediata que contiene gamma-hidroxibutirato que libera una porción sustancial (superior al 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95%) del gamma-hidroxibutirato en menos de una hora, realizándose la medición en agua desionizada utilizando el aparato 2 de USP a 37 °C ± 2 °C con paletas a 50 rpm.

ii. Formas farmacéuticas de liberación retardada

Las formulaciones de liberación retardada pueden crearse recubriendo una forma farmacéutica sólida con una película de polímero, que es insoluble en el entorno ácido del estómago y soluble en el entorno neutro del intestino delgado.

Las unidades de dosificación de liberación retardada pueden prepararse, por ejemplo, recubriendo un fármaco o una composición que contiene fármaco con un material de recubrimiento seleccionado. La composición que contiene fármaco puede ser, por ejemplo, un comprimido para su incorporación en una cápsula, un comprimido para su uso como núcleo interno en una forma farmacéutica de "núcleo recubierto", o una pluralidad de perlas, partículas o gránulos que contienen fármaco, para su incorporación ya sea en un comprimido o una cápsula. Los materiales de recubrimiento incluyen polímeros bioerosionables, gradualmente hidrolizables, gradualmente solubles en agua y/o degradables enzimáticamente, y pueden ser polímeros "entéricos" convencionales. Los polímeros entéricos, como apreciarán los expertos en la técnica, se vuelven solubles en el entorno de pH más alto del sistema gastrointestinal inferior o se erosionan lentamente a medida que la forma farmacéutica pasa a través del sistema gastrointestinal, mientras que los polímeros degradables enzimáticamente son degradados por enzimas bacterianas presentes en el sistema gastrointestinal inferior, particularmente en el colon. Los materiales de recubrimiento adecuados para efectuar la liberación retardada incluyen, pero sin limitación, polímeros celulósicos tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, acetato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, acetato-trimelitato de celulosa y carboximetilcelulosa sódica; polímeros y copolímeros de ácido acrílico, formados, por ejemplo, a partir de ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, acrilato de etilo, metacrilato de metilo y/o metacrilato de etilo, y otras resinas metacrílicas que están disponibles comercialmente con la denominación comercial Eudragit® (Rohm Pharma; Westerstadt, Alemania), incluidas Eudragit® L30D-55 y L100-55 (soluble a pH 5,5 y superior), Eudragit® L-100 (soluble a pH 6,0 y superior), Eudragit® S (soluble a pH 7,0 y superior, como resultado de un mayor grado de esterificación), y Eudragits® NE, RL y RS (polímeros insolubles en agua que tienen diferentes grados de permeabilidad y capacidad de expansión); polímeros y copolímeros de vinilo tales como polivinilpirrolidona, acetato de vinilo, acetato-ftalato de vinilo, copolímero de acetato de vinilo-ácido crotonico y copolímero de etileno-acetato de vinilo; polímeros enzimáticamente degradables tales como polímeros azoicos, pectina, quitosano, amilosa y goma guar; zeína y goma laca. También se pueden utilizar combinaciones de diferentes materiales de recubrimiento. También se pueden aplicar recubrimientos de capas múltiples que utilizan diferentes polímeros.

Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los pesos de recubrimiento para materiales de recubrimiento particulares evaluando perfiles de liberación individuales para comprimidos, perlas y gránulos preparados con diferentes cantidades de diversos materiales de recubrimiento. Es la combinación de materiales, procedimiento y forma de aplicación la que produce las características de liberación deseadas, que se puede determinar solo a partir de los estudios clínicos.

El polímero P4HB, el polímero P4HB deuterado, los oligómeros 4HB u los oligómeros 4HB deuterados divulgados en el presente documento pueden utilizarse como material de recubrimiento con el beneficio adicional de que también son una fuente del 4-HB. Por ejemplo, un recubrimiento que contiene uno o más de los anteriores se puede aplicar a una forma farmacéutica sólida tal como un comprimido o una cápsula para proporcionar una liberación inmediata y/o una liberación controlada de 4HB.

La composición de recubrimiento puede incluir aditivos convencionales, tales como plastificantes, pigmentos, colorantes, agentes estabilizantes, deslizantes, etc. Normalmente está presente un plastificante para reducir la fragilidad del recubrimiento, y generalmente representará aproximadamente del 10% en peso al 50% en peso con respecto al peso seco del polímero. Los ejemplos de plastificantes típicos incluyen polietilenglicol, propilenglicol, triacetina, ftalato de dimetilo, ftalato de dietilo, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, citrato de trietilo, citrato de tributilo, citrato de trietilacetilo, aceite de ricino y monoglicéridos acetilados. Se puede utilizar un agente estabilizante para estabilizar partículas en la dispersión. Los agentes estabilizantes típicos son emulsionantes no iónicos tales como ésteres de sorbitán, polisorbatos y polivinilpirrolidona. Se recomiendan los deslizantes para reducir los efectos de adherencia durante la formación de película y el secado, y generalmente representarán aproximadamente del 25% en peso al 100% en peso con respecto al peso del polímero en la solución de recubrimiento. Un deslizante eficaz es el talco. También se pueden utilizar otros deslizantes tales como estearato de magnesio y monoestearatos de glicerol. También se pueden utilizar pigmentos tales como el dióxido de titanio. También se pueden añadir pequeñas cantidades de un agente antiespumante, tal como una silicona (por ejemplo, simeticona) a la composición de recubrimiento.

C. Formulaciones tópicas

Las formas farmacéuticas adecuadas para administración tópica incluyen cremas, ungüentos, pomadas, aerosoles, geles, lociones, emulsiones y parches transdérmicos. La formulación puede formularse para administración transmucosal, transepitelial, transendotelial o transdérmica. Los compuestos también pueden formularse para administración intranasal, administración pulmonar o inhalación. Las composiciones pueden contener además uno o

más potenciadores de la penetración química, agentes de permeabilidad de membrana, agentes de transporte de membrana, emolientes, tensioactivos, estabilizantes y una combinación de los mismos.

Los "emolientes" son agentes que se aplican externamente que suavizan o ablandan la piel y generalmente se conocen en la técnica y se enumeran en los compendios, tal como el "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 4ª ed., Pharmaceutical Press, 2003. Estos incluyen, sin limitación, aceite de almendras, aceite de ricino, extracto de ceratonia, alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, cera de ésteres de cetilo, colesterol, aceite de semilla de algodón, ciclometicona, palmitostearato de etilenglicol, glicerina, monoestearato de glicerina, monooleato de glicerina, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, lanolina, lecitina, aceite mineral ligero, triglicéridos de cadena media, aceite mineral y alcoholes de lanolina, vaselina, alcoholes de vaselina y lanolina, aceite de soja, almidón, alcohol estearílico, aceite de girasol, xilitol y combinaciones de los mismos. En una divulgación, los emolientes son estearato de etilhexilo y palmitato de etilhexilo.

Los "tensioactivos" son agentes con actividad superficial que disminuyen la tensión superficial y, por lo tanto, aumentan las propiedades emulsionantes, espumantes, dispersantes, dispersantes y humectantes de un producto. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen cera emulsionante, monooleato de glicerilo, polioxietilenoalquiléteres, derivados de polioxietileno-aceite de ricino, polisorbato, ésteres de sorbitán, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, ciclodextrinas, monoestearato de glicerina, poloxámero, povidona y combinaciones de los mismos. En una divulgación, el tensioactivo no iónico es alcohol estearílico.

Los "emulsionantes" son sustancias con actividad superficial que promueven la suspensión de un líquido en otro y promueven la formación de una mezcla estable, o emulsión, de aceite y agua. Los emulsionantes comunes son: jabones metálicos, determinados aceites animales y vegetales, y varios compuestos polares. Los emulsionantes adecuados incluyen acacia, cera emulsionante aniónica, estearato de calcio, carbómeros, alcohol cetosteárico, alcohol cetílico, colesterol, dietanolamina, palmitoestearato de etilenglicol, monoestearato de glicerina, monooleato de glicerilo, hidroxipropilcelulosa, hipromelosa, lanolina, medio hidratado, alcoholes de lanolina, lecitina, triglicéridos de cadena media, metilcelulosa, aceite mineral y alcoholes de lanolina, fosfato de sodio monobásico, monoetanolamina, cera emulsionante no iónica, ácido oleico, poloxámero, poloxámeros, polioxietilenoalquiléteres, derivados de polioxietileno-aceite de ricino, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno-sorbitán, estearatos de polioxietileno, alginato de propilenglicol, monoestearato de glicerilo autoemulsionante, citrato de sodio deshidratado, laurilsulfato de sodio, ésteres de sorbitán, ácido esteárico, aceite de girasol, tragacanto, trietanolamina, goma xantana y combinaciones de los mismos. En una divulgación, el emulsionante es estearato de glicerol.

Las clases adecuadas de potenciadores de la penetración son conocidas en la técnica e incluyen, pero sin limitación, alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos, éteres de alcoholes grasos, aminoácidos, fosfolípidos, lecitinas, sales de colato, enzimas, aminas y amidas, agentes complejantes (liposomas, ciclodextrinas, celulosas modificadas y diimidias), macrocíclicos, tales como lactonas macrocíclicas, cetonas y anhídridos y ureas cíclicas, tensioactivos, N-metil-pirrolidonas y derivados de las mismas, DMSO y compuestos relacionados, compuestos iónicos, azonas y compuestos relacionados y disolventes, tales como alcoholes, cetonas, amidas, polioles (por ejemplo, glicoles). Ejemplos de estas clases son conocidos en la técnica.

i. Lociones, cremas, geles, pomadas, emulsiones y espumas

"Hidrófilo", como se utiliza en el presente documento, se refiere a sustancias que tienen grupos fuertemente polares que interactúan fácilmente con el agua.

"Lipófilo" se refiere a compuestos que tienen afinidad por lípidos.

"Anfífilo" se refiere a una molécula que combina propiedades hidrófilas y lipófilas (hidrófobas).

"Hidrófobo", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a sustancias que carecen de afinidad por el agua; tiende a repeler y no absorber agua, así como a no disolverse ni mezclarse con agua.

Un "gel" es un coloide en el que la fase dispersada se ha combinado con la fase continua para producir un material semisólido, tal como la gelatina.

Un "aceite" es una composición que contiene al menos el 95% en peso de una sustancia lipófila. Los ejemplos de sustancias lipófilas incluyen, pero sin limitación, aceites naturales y sintéticos, grasas, ácidos grasos, lecitinas, triglicéridos y combinaciones de los mismos.

Una "fase continua" se refiere al líquido en el que se suspenden los sólidos o se dispersan las gotas de otro líquido, y a veces se denomina fase externa. Esto también se refiere a la fase fluida de un coloide dentro del cual se distribuyen partículas sólidas o fluidas. Si la fase continua es agua (u otro disolvente hidrófilo), los fármacos hidrosolubles o hidrófilos se disolverán en la fase continua (en lugar de dispersarse). En una formulación multifásica (por ejemplo, una emulsión), la fase discreta se suspende o se dispersa en la fase continua.

Una "emulsión" es una composición que contiene una mezcla de componentes no miscibles entre sí mezclados homogéneamente. En divulgaciones particulares, los componentes no miscibles incluyen un componente lipófilo y un componente acuoso. Una emulsión es una preparación de un líquido distribuido en pequeños glóbulos a lo largo del cuerpo de un segundo líquido. El líquido dispersado es la fase discontinua, y el medio de dispersión es la fase continua.

5 Cuando el aceite es el líquido dispersado y una solución acuosa es la fase continua, se conoce como una emulsión de aceite en agua, mientras que cuando el agua o la solución acuosa es la fase dispersada y el aceite o la sustancia oleaginosa es la fase continua, se conoce como una emulsión de agua en aceite. Tanto la fase oleosa como la fase acuosa, o ambas, pueden contener uno o más tensioactivos, emulsionantes, estabilizantes de la emulsión, tampones y otros excipientes. Los excipientes incluyen tensioactivos, especialmente tensioactivos no iónicos; agentes emulsionantes, especialmente ceras emulsionantes; y materiales líquidos no volátiles no acuosos, particularmente glicoles tales como propilenglicol. La fase oleosa puede contener otros excipientes oleosos aprobados farmacéuticamente. Por ejemplo, pueden utilizarse materiales tales como el aceite de ricino hidroxilado o el aceite de sésamo en la fase oleosa como tensioactivos o emulsionantes.

15 Una emulsión es una preparación de un líquido distribuido en pequeños glóbulos a lo largo del cuerpo de un segundo líquido. El líquido dispersado es la fase discontinua, y el medio de dispersión es la fase continua. Cuando el aceite es el líquido dispersado y una solución acuosa es la fase continua, se conoce como una emulsión de aceite en agua, mientras que cuando el agua o la solución acuosa es la fase dispersada y el aceite o la sustancia oleaginosa es la fase continua, se conoce como una emulsión de agua en aceite. La fase oleosa puede consistir al menos en parte en un propulsor, tal como un propulsor HFA. Tanto la fase oleosa como la fase acuosa, o ambas, pueden contener uno o más tensioactivos, emulsionantes, estabilizantes de la emulsión, tampones y otros excipientes. Los excipientes incluyen tensioactivos, especialmente tensioactivos no iónicos; agentes emulsionantes, especialmente ceras emulsionantes; y materiales líquidos no volátiles no acuosos, particularmente glicoles tales como propilenglicol. La fase oleosa puede contener otros excipientes oleosos aprobados farmacéuticamente. Por ejemplo, pueden utilizarse materiales tales como el aceite de ricino hidroxilado o el aceite de sésamo en la fase oleosa como tensioactivos o emulsionantes.

30 Un subconjunto de emulsiones son los sistemas autoemulsionantes. Estos sistemas de administración de fármacos son típicamente cápsulas (de cubierta dura o de cubierta blanda) compuestas por el fármaco dispersado o disuelto en una mezcla de tensioactivo(s) y líquidos lipófilos tales como aceites u otros líquidos inmiscibles con agua. Cuando la cápsula se expone a un ambiente acuoso y la cubierta de gelatina externa se disuelve, el contacto entre el medio acuoso y el contenido de la cápsula genera instantáneamente gotas de emulsión muy pequeñas. Estas suelen encontrarse en el intervalo de tamaño de micelas o nanopartículas. No se requiere ninguna fuerza de mezclado para generar la emulsión, como es normalmente el caso en los procesos de formulación de emulsión.

35 Una "loción" es una formulación líquida de baja a media viscosidad. Una loción puede contener sustancias en polvo fino que son solubles en el medio de dispersión mediante el uso de agentes de suspensión y agentes dispersantes. Alternativamente, las lociones pueden tener como la fase dispersada sustancias líquidas que son inmiscibles con el vehículo y generalmente se dispersan por medio de agentes emulsionantes u otros estabilizantes adecuados. En una divulgación, la loción se encuentra en forma de una emulsión que tiene una viscosidad de entre 100 y 1000 centistokes. La fluidez de las lociones permite una aplicación rápida y uniforme a lo largo de un área superficial amplia. Normalmente se pretende que las lociones se sequen sobre la piel dejando una fina capa de sus componentes medicinales en la superficie de la piel.

45 Una "crema" es un líquido viscoso o una emulsión semisólida del tipo "aceite en agua" o "agua en aceite". Las cremas pueden contener agentes emulsionantes y/u otros agentes estabilizantes. En una divulgación, la formulación se encuentra en forma de una crema que tiene una viscosidad de más de 1000 centistokes, típicamente en el intervalo de 20.000-50.000 centistokes. Las cremas a menudo se prefieren, con el tiempo, más que las pomadas, ya que generalmente son más fáciles de dispersar y más fáciles de eliminar.

50 La diferencia entre una crema y una loción es la viscosidad, que depende de la cantidad/el uso de varios aceites y el porcentaje de agua utilizada para preparar las formulaciones. Las cremas son típicamente más espesas que las lociones, pueden tener varios usos y, a menudo, se utilizan aceites/mantecas más variados, dependiendo del efecto deseado sobre la piel. En una formulación de crema, el porcentaje de la base de agua es de aproximadamente el 60-75% y el de la base de aceite es de aproximadamente el 20-30% del total, siendo los otros porcentajes el agente emulsionante, conservantes y aditivos hasta un total del 100%.

60 Una "pomada" es una preparación semisólida que contiene una base de pomada y opcionalmente uno o más agentes activos. Los ejemplos de bases de pomada adecuadas incluyen bases de hidrocarburos (por ejemplo, vaselina, vaselina blanca, pomada amarilla y aceite mineral); bases de absorción (vaselina hidrófila, lanolina anhidra, lanolina y crema fría); bases extraíbles en agua (por ejemplo, pomada hidrófila) y bases solubles en agua (por ejemplo, pomadas de polietilenglicol). Las pastas generalmente difieren de las pomadas en que contienen un mayor porcentaje de sólidos. Las pastas son típicamente más absorbentes y menos grasientas que las pomadas preparadas con los mismos componentes.

Un "gel" es un sistema semisólido que contiene dispersiones de moléculas pequeñas o grandes en un vehículo líquido que se vuelve semisólido por la acción de un agente espesante o material polimérico disuelto o suspendido en el vehículo líquido. El líquido puede incluir un componente lipófilo, un componente acuoso o ambos. Algunas emulsiones pueden ser geles o incluir un componente de gel. Sin embargo, algunos geles no son emulsiones porque no contienen una mezcla homogeneizada de componentes inmiscibles. Los agentes gelificantes adecuados incluyen, pero sin limitación, celulosas modificadas, tales como hidroxipropilcelulosa e hidroxietilcelulosa; homopolímeros y copolímeros de carbopol; y combinaciones de los mismos. Los disolventes adecuados en el vehículo líquido incluyen, pero sin limitación, diglicolmonoetiléter; alquilenglicoles, tales como propilenglicol; dimetilsosorbida; alcoholes, tales como alcohol isopropílico y etanol. Los disolventes se seleccionan típicamente por su capacidad para disolver el fármaco. También se pueden incorporar otros aditivos, que mejoran la sensación en la piel y/o la emolencia de la formulación. Los ejemplos de dichos aditivos incluyen, pero sin limitación, miristato de isopropilo, acetato de etilo, benzoatos de alquilo C₁₂-C₁₅, aceite mineral, escualano, ciclometicona, triglicéridos cápricos/caprílicos y combinaciones de los mismos.

Las espumas consisten en una emulsión en combinación con un propulsor gaseoso. El propulsor gaseoso se compone principalmente de hidrofluoroalcanos (HFA). Los propulsores adecuados incluyen HFA tales como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227), pero son adecuadas mezclas y mixturas de estos y otros HFA que actualmente están aprobados o pueden ser aprobados para uso médico. En determinadas divulgaciones, los propulsores no son gases propulsores de hidrocarburos que puedan producir vapores inflamables o explosivos durante la pulverización. En otras determinadas divulgaciones, las composiciones no contienen alcoholes volátiles, que pueden producir vapores inflamables o explosivos durante su uso.

Los tampones se utilizan para controlar el pH de una composición. En determinadas divulgaciones, los tampones tamponan la composición de un pH de aproximadamente 4 a un pH de aproximadamente 7,5, por ejemplo, de un pH de aproximadamente 4 a un pH de aproximadamente 7, tal como de un pH de aproximadamente 5 a un pH de aproximadamente 7. En una divulgación, el tampón es trietanolamina.

Pueden utilizarse conservantes para prevenir el crecimiento de hongos y microorganismos. Los agentes antimicóticos y antimicrobianos adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido benzoico, butilparabeno, etilparabeno, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio, propionato de sodio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol, fenol, alcohol fenilético y timerosal.

En determinadas divulgaciones, puede ser deseable proporcionar un suministro continuo de gamma-hidroxibutirato a un paciente que lo necesite. Para aplicaciones tópicas, se puede realizar una aplicación repetida o se puede utilizar un parche para proporcionar la administración continua del gamma-hidroxibutirato durante un periodo prolongado de tiempo.

D. Formulaciones de administración pulmonar

En una divulgación, el gamma-hidroxibutirato se formula para administración pulmonar, tal como la administración intranasal o la inhalación oral. El sistema respiratorio es la estructura involucrada en el intercambio de gases entre la atmósfera y el torrente sanguíneo. Los pulmones son estructuras ramificadas que en última instancia terminan en los alvéolos, en los que tiene lugar el intercambio de gases. El área de superficie alveolar es la más grande en el sistema respiratorio y es donde tiene lugar la absorción de fármacos. Los alvéolos están cubiertos por un epitelio delgado sin cilios o una capa de moco y segregan fosfolípidos tensioactivos.

El sistema respiratorio abarca las vías respiratorias superiores, incluidas la orofaringe y la laringe, seguidas de las vías respiratorias inferiores, que incluyen la tráquea seguida de bifurcaciones en los bronquios y los bronquiolos. Las vías respiratorias superiores e inferiores se denominan vías respiratorias conductoras. Los bronquiolos terminales se dividen después en bronquiolos respiratorios que después conducen a la zona respiratoria final, los alvéolos o pulmón profundo. El pulmón profundo, o alvéolos, son el objetivo principal de los aerosoles terapéuticos inhalados para la administración de fármacos sistémicos.

Se ha observado la administración pulmonar de composiciones terapéuticas compuestas por fármacos de bajo peso molecular, por ejemplo, antagonistas beta-androgénicos para tratar el asma. Otros agentes terapéuticos que son activos en los pulmones se han administrado de forma sistémica y dirigida mediante absorción pulmonar. La administración nasal se considera una técnica prometedora para la administración de productos terapéuticos por las razones siguientes: la nariz tiene una gran área de superficie disponible para la absorción del fármaco debido a la cobertura de la superficie epitelial por numerosas microvellosidades, la capa subepitelial está altamente vascularizada, la sangre venosa de la nariz pasa directamente a la circulación sistémica y, por lo tanto, evita la pérdida del fármaco por el metabolismo de primer paso en el hígado, ofrece dosis más bajas, una consecución más rápida de niveles sanguíneos terapéuticos, un inicio más rápido de la actividad farmacológica, menos efectos secundarios, alto flujo sanguíneo total por cm³, membrana basal endotelial porosa, y es fácilmente accesible.

El término aerosol, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier preparación de una fina niebla de partículas, que puede encontrarse en solución o en suspensión, se produzca o no utilizando un propulsor. Los aerosoles se pueden producir utilizando técnicas estándar, tales como ultrasonificación o tratamiento a alta presión.

5 Los vehículos para formulaciones de administración pulmonar pueden dividirse en aquellos para formulaciones de polvo seco y para administración en forma de soluciones. Los aerosoles para la administración de agentes terapéuticos al sistema respiratorio son conocidos en la técnica. Para la administración a través del sistema respiratorio superior, la formulación puede formularse en forma de una solución, por ejemplo, agua o solución salina isotónica, tamponada o no tamponada, o en forma de una suspensión, para administración intranasal en forma de gotas o como un aerosol.
10 Dichas soluciones o suspensiones pueden ser isotónicas con respecto a las secreciones nasales y de aproximadamente el mismo pH, que varía, por ejemplo, de un pH de aproximadamente 4,0 a un pH de aproximadamente 7,4 o, de pH 6,0 a pH 7,0. Los tampones deben ser fisiológicamente compatibles e incluir, simplemente a modo de ejemplo, tampones de fosfato. Por ejemplo, un descongestionante nasal representativo se describe como tamponado a un pH de aproximadamente 6,2. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un contenido de solución salina y un pH adecuados para una solución acuosa inocua para la administración nasal y/o respiratoria superior.

Las soluciones acuosas pueden ser agua, soluciones acuosas fisiológicamente aceptables que contienen sales y/o tampones, tales como solución salina tamponada con fosfatos (PBS), o cualquier otra solución acuosa aceptable para su administración a un animal o un ser humano. Dichas soluciones son bien conocidas por un experto en la técnica e incluyen, pero sin limitación, agua destilada, agua desionizada, agua pura o ultrapura, solución salina, solución salina tamponada con fosfatos (PBS). Otros vehículos acuosos adecuados incluyen, pero sin limitación, solución de Ringer y cloruro de sodio isotónico. Las suspensiones acuosas pueden incluir agentes de suspensión tales como derivados de celulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona y goma de tragacanto, y un agente humectante tal como lecitina. Los conservantes adecuados para suspensiones acuosas incluyen p-hidroxibenzoato de etilo y de n-propilo.

En otra divulgación, pueden utilizarse para las formulaciones disolventes que son disolventes residuales orgánicos de clase 3 de baja toxicidad (es decir, no acuosos), tales como etanol, acetona, acetato de etilo, tetrahidrofurano, etiléter y propanol. El disolvente se selecciona en función de su capacidad para aerosolizar fácilmente la formulación. El disolvente no debe reaccionar perjudicialmente con el gamma-hidroxi butirato o los oligómeros de gamma-hidroxi butirato. Se debe utilizar un disolvente apropiado que disuelva el gamma-hidroxi butirato o los oligómeros de gamma-hidroxi butirato o que forme una suspensión de gamma-hidroxi butirato. El disolvente debe ser lo suficientemente volátil como para permitir la formación de un aerosol de la solución o la suspensión. Se pueden añadir disolventes o agentes de aerosol adicionales, tales como freones, según se desee, para aumentar la volatilidad de la solución o la suspensión.

En una divulgación, las composiciones pueden contener cantidades secundarias de polímeros, tensioactivos u otros excipientes bien conocidos por los expertos en la técnica. En este contexto, "cantidades secundarias" significa que no hay presencia de excipientes que puedan afectar o mediar la absorción del gamma-hidroxi butirato en los pulmones y que los excipientes que están presentes están presentes en una cantidad que no afecta negativamente la absorción del gamma-hidroxi butirato en los pulmones.

Los polvos lipídicos secos se pueden dispersar directamente en etanol debido a su carácter hidrófobo. Para lípidos almacenados en disolventes orgánicos tales como cloroformo, la cantidad deseada de solución se dispone en un vial, y el cloroformo se evapora bajo una corriente de nitrógeno para formar una película fina y seca en la superficie de un vial de vidrio. La película se hincha fácilmente cuando se reconstituye con etanol. Para dispersar completamente las moléculas de lípidos en el disolvente orgánico, la suspensión se somete a sonicación. Las suspensiones no líquidas de lípidos también se pueden preparar en etanol absoluto utilizando un nebulizador PARI LC Jet+ reutilizable (Equipo respiratorio PARI, Monterrey, CA).

Las formulaciones de polvo seco ("DPF") con gran tamaño de partícula tienen características mejoradas de fluidez, tales como menos agregación, aerosolización más fácil y potencialmente menos fagocitosis. Los aerosoles de polvo seco para el tratamiento por inhalación se producen generalmente con diámetros medios principalmente en el intervalo de menos de 5 micrómetros, aunque un intervalo particular es de entre uno y diez micrómetros de diámetro aerodinámico. Se han administrado partículas "vehículo" grandes (que no contienen fármaco) conjuntamente con aerosoles terapéuticos para ayudar a lograr una aerosolización eficaz, entre otros posibles beneficios.

Pueden prepararse partículas poliméricas utilizando evaporación de disolvente de emulsión simple y doble, secado por pulverización, extracción de disolvente, evaporación de disolvente, separación de fases, coacervación simple y compleja, polimerización interfacial y otros procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica. Las partículas se pueden producir utilizando procedimientos para fabricar microesferas o microcápsulas conocidos en la técnica. Los procedimientos particulares de fabricación son mediante secado por pulverización y liofilización, lo que implica el uso de una solución que contiene el tensioactivo, la pulverización para formar gotas del tamaño deseado y la eliminación del disolvente.

65

Las partículas pueden fabricarse con el material, la rugosidad de la superficie, el diámetro y la densidad aparente apropiados para su administración localizada a regiones seleccionadas del sistema respiratorio, tales como el pulmón profundo o las vías respiratorias superiores. Por ejemplo, se pueden utilizar partículas de mayor densidad o más grandes para su administración a la vía respiratoria superior. De forma similar, se puede administrar una mezcla de partículas de diferentes tamaños, provistas con el mismo o diferente EGS para dirigirlas a diferentes regiones del pulmón en una administración.

Las formulaciones para administración pulmonar incluyen vesículas de fosfolípidos unilamelares, liposomas o partículas de lipoproteínas. Las formulaciones y procedimientos para preparar dichas formulaciones que contienen ácido nucleico son bien conocidas por un experto en la técnica. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos disponibles en el mercado suministrados por una diversidad de proveedores, incluidos Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). En una divulgación, el liposoma puede incluir una molécula ligando específica para un receptor en la superficie de la célula diana para dirigir el liposoma a la célula diana.

IV. Procedimientos de producción de gamma-hidroxitirato

El gamma-hidroxitirato o el gamma-hidrobutirato deuterado que tienen una huella de carbono única se pueden preparar mediante una diversidad de técnicas. En una divulgación, se prepara gamma-butirolactona o gamma-hidrobutirato deuterado que tienen un porcentaje particular de carbono moderno. Esto puede realizarse por medio de una diversidad de procedimientos, incluida la fermentación. Mediante el uso de materias primas renovables de base biológica y materias primas derivadas del petróleo en proporciones definidas, se puede preparar gamma-butirolactona o gamma-hidrobutirato deuterado que tienen una huella de carbono única y, por lo tanto, se pueden rastrear. La gamma-butirolactona o la gamma-butirolactona deuterada pueden convertirse en gamma-hidroxitirato o gamma-hidrobutirato deuterado por saponificación (por ejemplo, apertura del anillo catalizada por base) del anillo de lactona. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2011/0028551 describe procedimientos continuos para efectuar la apertura del anillo de gamma-butirolactona para formar gamma-hidroxitirato. Otros procedimientos para producir gamma-hidroxitirato o gamma-hidrobutirato deuterado incluyen la hidrogenación parcial de ácido succínico o sus formas deuteradas que tienen una huella de carbono única y la oxidación parcial de butanodiol o sus formas deuteradas que tienen una huella de carbono única.

En una divulgación, la gamma-butirolactona de base biológica se produce a partir de la conversión a GHB de base biológica o gamma-hidrobutirato deuterado mediante pirólisis de poli(4-hidroxitirato) o DP4HB tal como se describe en el documento WO 2011/100601. Se pueden producir P4HB o DP4HB a partir de una diversidad de materias primas renovables de base biológica, tales como jarabe de glucosa o de glucosa deuterada o D₂O utilizando procedimientos de fermentación. También pueden prepararse P4HB o DP4HB a partir de una mezcla de materias primas renovables de base biológica y materias primas derivadas del petróleo utilizando los mismos procedimientos de fermentación. El P4HB o el DP4HB se pueden pirolizar en presencia de Ca(OH)₂ para producir GBL o DGBL, que pueden saponificarse para formar GHB o DGHB. El P4HB o el DP4HB también se pueden convertir en GHB o DGHB disolviendo P4HB o DP4HB purificados en un disolvente orgánico, tal como tetrahidrofurano (THF), y haciéndolos reaccionar con una base, tal como metóxido de sodio, para convertir P4HB o DP4HB directamente en GHB o DGHB. El mismo procedimiento también puede utilizarse para preparar oligómeros de 4HB o de D4HB de un peso molecular deseado. GBL o DGBL de base biológica o una mezcla de GBL o DGBL de base biológica y GBL o DGBL derivadas del petróleo se pueden convertir en GHB o DGHB haciendo reaccionar GBL o DGBL con una base, tal como hidróxido de sodio, para formar la sal de sodio del ácido gamma-hidroxitirato o gamma-hidrobutirato deuterado, gamma-hidroxitirato de sodio o gamma-hidrobutirato de sodio deuterado.

La GBL o la GBH o formas deuteradas de las mismas que tienen una huella de carbono única pueden prepararse a partir de ácido succínico o formas deuteradas del mismo. El ácido succínico que tiene una huella de carbono particular se puede preparar por medio de fermentación de biomasa microbiana, aislamiento del ácido succínico e hidrogenación catalítica del ácido succínico para formar GHB.

Se pueden preparar GHB o DGHB que tienen una huella única también a partir de 1,4-butanodiol o formas deuteradas del mismo que tienen la huella de carbono única. El 1,4-butanodiol que tiene una huella de carbono particular se puede preparar por medio de fermentación de biomasa microbiana, aislamiento del 1,4-butanodiol y oxidación catalítica del 1,4-butanodiol para formar GHB.

La GBL o el GHB o sus formas deuteradas se pueden producir con una pureza muy alta, por ejemplo, superior al 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o 99,9% en masa que requiere menos purificación para preparar un producto para composiciones farmacéuticas.

Los procedimientos para fabricar una diversidad de compuestos deuterados mediante el crecimiento de bacterias en medios deuterados se describen en el documento WO 1997/007216. Los compuestos que tienen una huella de carbono única pueden prepararse utilizando las técnicas descritas en el mismo.

V. Procedimientos de uso de gamma-hidroxitirato

El gamma-hidroxibutirato ("GHB") es una sustancia de origen natural que está ampliamente distribuida en el cuerpo de los mamíferos y está presente, por ejemplo, en el cerebro, los riñones, el corazón, el hígado, los pulmones y los músculos. Cuando se administra de forma exógena, el GHB atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica y penetra en el cerebro, produciendo una serie de efectos neurofarmacológicos. El GHB se ha utilizado como agente intravenoso para la inducción de anestesia y para la sedación a largo plazo sin efectos secundarios graves en la circulación o la respiración y sin una actividad inductora de convulsiones en humanos. También se ha sugerido que el GHB puede ser un agente adecuado para la anestesia intravenosa total en pacientes con enfermedad coronaria, así como para la sedación durante la anestesia espinal. Pacientes con esquizofrenia crónica caracterizada por autismo, inactividad y apatía; esquizofrenia catatónica; esquizofrenia crónica con alucinación y delirio; psicosis atípicas; y síndrome cerebral crónico debido a traumatismos, así como pacientes neuróticos, han sido tratados con GHB.

Además de estos usos, el GHB también se utiliza para tratar la narcolepsia, un trastorno crónico del sueño que generalmente comienza en la adolescencia o en la edad adulta temprana y dura toda la vida. La narcolepsia se caracteriza por ataques repentinos de sueño que duran generalmente de unos pocos a treinta minutos, parálisis al acostarse o despertarse, alucinaciones visuales o auditivas al comienzo del sueño y pérdida temporal del tono muscular mientras se está despierto (cataplexia) o dormido. El tratamiento con GHB reduce sustancialmente estos signos y síntomas de narcolepsia en seres humanos. La GHB en forma de su sal de sodio, conocida como oxibato de sodio, se comercializa por Jazz Pharmaceuticals con la denominación Xyrem para tratar la cataplexia y la somnolencia diurna excesiva en pacientes con narcolepsia.

Otros usos de GHB incluyen su aplicación en la farmacoterapia del alcoholismo, donde se ha encontrado que reduce el deseo de consumir alcohol y el consumo del mismo, y mejora los síntomas del síndrome de abstinencia de alcohol en alcohólicos. Según los informes, el GHB también ayuda a los pacientes que sufren abstinencia a opiáceos y alivia la ansiedad, el temblor y la rigidez muscular en pacientes con enfermedad de Parkinson.

También se ha informado que la administración de GHB protege las neuronas y el epitelio intestinal contra la muerte celular resultante de la isquemia experimental, reduce la tensión arterial en pacientes hipertensos, aumenta los niveles plasmáticos de la hormona del crecimiento después de su inyección en sujetos sanos y estimula la producción de hormona del crecimiento y de prolactina. La administración de GHB es supuestamente también un efecto anoréxico eficaz, aumenta el deseo sexual, produce efectos placenteros tales como euforia y la relajación del músculo liso, promueve la masa muscular y es capaz de inducir un sueño de movimientos oculares rápidos. El documento PCT WO 99/09972 y la patente de Estados Unidos N° 5.990.162 de Scharf describen el uso de GHB en el tratamiento de la fibromialgia y el síndrome de fatiga crónica. También se ha demostrado que la administración de GHB aumenta el vaciado gástrico, y podría utilizarse como un fármaco procinético para el tratamiento de una serie de afecciones en las que se desea mejorar la motilidad gastrointestinal y el vaciamiento gástrico. Dichas afecciones incluyen el tratamiento de los trastornos de malabsorción y el aumento de la absorción de fármacos mal absorbidos. Se ha demostrado que la gamma-butirolactona que se metaboliza dando GHB potencia el efecto del ácido gamma-aminobutírico sobre las secreciones gástricas. El GHB ha mostrado actividad antiulcerosa contra úlceras inducidas por indometacina, estrés de restricción o ligadura pilórica.

En animales, el GHB produce cambios electroencefalográficos (EEG) y de comportamiento, que se asemejan a las crisis de ausencia generalizadas. Los animales tratados muestran una detención de la actividad que puede ser abortada por medio de fármacos antiausencia. Por este motivo, el GHB se ha utilizado para proporcionar un modelo farmacológicamente específico, coherente y reproducible para el estudio de las crisis de ausencia generalizadas, que es análogo a otros modelos de ausencia en ratas. La administración de GHB también se ha utilizado en animales para normalizar la función cardiovascular de la hemorragia y como un antiisquémico. En ratones, se ha descubierto que el GHB ejerce un efecto radioprotector.

También se ha descubierto que la infusión de GHB posee un efecto inhibitorio de la angiogénesis, lo que hace que el GHB sea potencialmente útil en el tratamiento del cáncer como agente antiangiogénesis. El GHB también se ha utilizado profilácticamente en ratas como un antihipoxante, antioxidante o actoprotector, aumentando las tasas de supervivencia de ratas con infarto de miocardio. Según los informes, el GHB previene el daño cardíaco después de una pérdida de sangre aguda.

El GHB también se puede administrar profilácticamente para reducir la inflamación o lesiones isquémicas o de reperfusión durante la cirugía. La administración profiláctica de GHB previno el daño hepático por intoxicación con tetraclorometano. La sal de litio de GHB redujo la inflamación por carragenano en un ensayo de bolsa de mejilla de hámster. La administración profiláctica de sal de litio de GHB previno la inflamación en el ensayo de edema agudo de la pata. Se ha demostrado que el GHB mejora el flujo sanguíneo al tejido cardíaco isquémico. El GHB también se ha utilizado para proteger el tejido hepático congelado para su trasplante.

Se ha demostrado que el 4-hidroxibutirato de sodio afecta el metabolismo, ya que su administración redujo el catabolismo de nucleótidos, la glucólisis, la lipólisis y la peroxidación lipídica. También se ha demostrado que el hidroxibutirato de sodio estimula el ciclo de pentosofosfato e interfiere con la acidosis metabólica. Por lo tanto, el GHB puede utilizarse para mejorar el metabolismo y compensar los efectos dañinos de lesiones, cirugía, isquemia y choque.

Se ha demostrado que el GHB previene la proliferación del cáncer y funciona como un agente antineoplásico (Basaki, et al., *Gan To Kagaku Ryoho*, 27: 93-98 2000)). Se ha demostrado que el GHB y la gamma-butirolactona reducen la angiogénesis inducida por determinados tipos de células cancerosas (Yonekura, et al., *Clinical Cancer Research*, 5: 2185-91 (1999)). También se ha demostrado que el GHB es beneficioso para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón durante y después de la cirugía (Leonkov, et al., *Vopr. Onkol.*, 39: 75-79 (1993)) y este beneficio se atribuyó a los efectos antihipóxicos del GHB. En consecuencia, el GHB puede utilizarse para prevenir la propagación o la proliferación de un cáncer.

Las composiciones divulgadas en el presente documento pueden contener un único componente activo, una pluralidad de componentes activos y/o uno o más componentes que pueden convertirse en un componente activo. Por ejemplo, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden contener GHB o DGHB solo o en combinación con GBL, DGBL, P4HB, DP4HB o combinaciones de los mismos. En otras divulgaciones, la composición contiene GBL o DGBL en combinación con P4HB o DP4HB. En otras divulgaciones, la composición contiene oligómeros de GBL o DGBL en combinación con P4HB o DP4HB y GBL o DGBL monoméricas. Las composiciones pueden formularse para liberación controlada, tal como liberación inmediata, liberación prolongada, liberación retardada, liberación pulsátil y combinaciones de las mismas. Por ejemplo, la composición puede encontrarse en forma de un comprimido o una cápsula con un recubrimiento que contiene el agente activo para liberación inmediata y un núcleo (comprimido) o relleno (cápsula) que proporciona liberación prolongada o liberación retardada.

Ejemplos

Cuando los ejemplos específicos siguientes no entren dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas, se divulgan solo con fines ilustrativos.

Ejemplo de referencia 1. Producción de gamma-butirolactona (GBL) de base biológica a partir de la pirólisis de un microbio manipulado genéticamente que produce poli-4-hidroxibutirato (P4HB).

En este ejemplo, se produce GBL de base biológica para su conversión a GHB de base biológica para su uso en aplicaciones farmacéuticas con una supervisión y una seguridad mejoradas. Se produjo biomasa que contiene poli-4-hidroxibutirato (poli-4HB) en un fermentador New Brunswick Scientific 20L (BioFlo 4500) utilizando una cepa de *E. coli* modificada genéticamente diseñada específicamente para la producción de alto rendimiento de poli-4HB a partir de jarabe de glucosa como única fuente de alimentación de carbono. El uso de una materia prima basada en recursos renovables tal como el jarabe de glucosa como única fuente de carbono permite la producción de un P4HB de base biológica y, por lo tanto, la producción de GBL y derivados de base biológica, incluido el ácido gamma-hidroxibutírico (GHB) de base biológica. Ejemplos de cepas de *E. coli*, condiciones de fermentación, medios y condiciones de alimentación se describen en las patentes de Estados Unidos N° 6.316.262, 6.689.589, 7.081.357 y 7.229.804. La cepa de *E. coli* generó un caldo de fermentación que tenía un título de P4HB de aproximadamente 100-120 g de P4HB/kg de caldo. Después de la fermentación, el caldo se lavó con agua DI añadiendo un volumen igual de agua, mezclando durante 2 minutos, centrifugando y decantando el agua. A continuación, el caldo lavado se mezcló con cal (cal hidratada estándar $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 98%, Mississippi Lime) con el objetivo de lograr el 4% en peso de sólidos secos. La mezcla se secó después en un secador de tambor giratorio a 125-130 °C hasta un peso constante. Los niveles de humedad en la biomasa seca fueron de aproximadamente el 1-2% en peso. El % en peso final de iones de calcio en el caldo seco + P4HB se midió por cromatografía iónica, siendo el 1,9% (3,5% en peso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$).

La pirólisis del caldo seco + P4HB + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se llevó a cabo utilizando un horno giratorio de vidrio de cuarzo de cuatro pulgadas de diámetro suspendido dentro de un horno de tubo de concha de almeja. Al comienzo del proceso, una muestra pesada de caldo seco + P4HB + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se dispuso dentro del horno de vidrio y se estableció un flujo de purga de nitrógeno. La rotación del horno y el calentamiento se iniciarían después. A medida que la temperatura del horno alcanzó su valor de referencia, los gases generados por la muestra de caldo + P4HB + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ serían arrastrados al exterior del horno por la purga de nitrógeno y entrarían en una serie de condensadores de vidrio o trampas refrigeradas. Los condensadores consistían en una torre vertical de condensadores de vidrio enfriada con una ampolla de recolección de condensado ubicada en la base. Se hizo circular una mezcla de glicol/agua mantenida a 0 °C a través de todos los condensadores de vidrio. Los gases enfriados que salían de la parte superior del primer condensador se dirigieron hacia abajo a través de un segundo condensador y a través de una segunda ampolla de recolección de condensado antes de borbotearlos a través de un borboteador de vidrio relleno con agua desionizada.

Para el experimento de pirólisis a mayor escala, se cargaron en primer lugar 292 g de caldo seco + P4HB + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en el horno de cuarzo a temperatura ambiente. El peso total de la biomasa P4HB se estimó que era de 281,4 g con respecto a la carga de $\text{Ca}(\text{OH})_2$. También se midió que el % en peso de P4HB en la mezcla era del 66,7% con respecto a los sólidos secos que hicieron que la masa de P4HB en el horno fuera igual a 195 g. A continuación se selló el sistema y se estableció una purga de nitrógeno de aproximadamente 1500 ml/min. Se aplicó energía al horno y al caldo seco + P4HB + $\text{Ca}(\text{OH})_2$ se calentó hasta la temperatura objetivo de pirólisis de 250 °C.

Durante la pirólisis, los productos de la degradación térmica de la biomasa + P4HB, GBL, se recogieron en las trampas de condensado dispuestas por debajo de los condensadores enfriados. Se podía observar que el agua se acumulaba inicialmente en cada una de las ampollas de recolección. La mayor parte del producto licuado (> 95%) se recogió en

la primera ampolla de recolección de vidrio. El tiempo total de ejecución de la pirólisis fue de aproximadamente 60 minutos. La medición del peso de la biomasa restante después de la pirólisis dio como resultado 11,9 g.

Una vez completado el proceso de pirólisis, se recogieron y se pesaron los condensados de los condensadores. Los resultados mostraron que el peso condensado combinado fue de 181 g. El análisis del condensado por análisis de humedad de Karl Fisher y CG-EM mostró que el condensado contenía el 6,1% de agua, el 0,06% de ácidos grasos y el resto del material eran productos de GBL. El rendimiento del producto de GBL ((g de producto de GBL/g de P4HB inicial) x 100%), por lo tanto, se calculó que era aproximadamente el 87%. Los resultados de CG-EM también mostraron que la impureza principal en el producto de GBL era el dímero de GBL, calculándose que la relación de área de pico de GBL/dímero de GBL era 2777. Esto estaba de acuerdo con los resultados del experimento del ejemplo 10 que muestra que las condiciones óptimas de proceso para lograr la mayor pureza de GBL fueron a la temperatura de pirólisis de 250 °C con el catalizador de Ca(OH)₂. La CG-EM también detectó que otras impurezas, tales como compuestos de organoazufre y amida, estaban presentes en el condensado. Se calculó que la conversión de la biomasa P4HB sólida a líquida ((g de biomasa seca - g de biomasa residual/g de biomasa seca) x 100%) fue del 96%. La GBL producida se analizó para determinar el contenido de base biológica según el protocolo de ensayo de la norma ASTM-D6866-11 y se demostró que tenía un contenido de base biológica del 99%.

Ejemplo de referencia 2. Pospurificación de GBL de base biológica por destilación, destilación por arrastre de vapor y tratamiento con peróxido

Este ejemplo describe un procedimiento para la purificación de un líquido de GBL de base biológica preparado a partir de la pirólisis de un microbio modificado genéticamente que produce un polímero de poli-4-hidroxibutirato mezclado con un catalizador tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1.

La purificación de GBL es un proceso por lotes mediante el cual el líquido de GBL "bruto" recuperado después de la pirólisis se filtra en primer lugar para eliminar las partículas sólidas (típicamente < 1% del peso total bruto de GBL) y después se destila dos veces para eliminar los compuestos que contribuyen al olor y al color.

La filtración del líquido de GBL bruto se realizó a escala de laboratorio utilizando un embudo de vidrio fritado Buchner acoplado a un matraz Erlenmeyer receptor. Se filtró aproximadamente 1 litro de GBL bruta que dio como resultado aproximadamente 0,99 litros de líquido de GBL recuperado.

La destilación del líquido de GBL filtrado se llevó a cabo utilizando una columna de destilación de vidrio de 20 etapas de alto vacío. La sección de etapa de la columna estaba contenida dentro de un manguito aislante de vidrio evacuado recubierto de plata para minimizar las pérdidas de calor de la columna durante el proceso de destilación. La destilación se realizó en condiciones de vacío utilizando una bomba de vacío equipada con una trampa de frío de nitrógeno líquido. Las presiones típicas de operación de la columna durante la destilación se encontraban en el intervalo de 25 pulgadas de Hg. Se hizo correr agua de refrigeración, mantenida a 10 °C, a través del condensador en la parte superior de la columna para ayudar en el fraccionamiento del vapor. La columna también estaba equipada con dos termopares: uno en la parte superior de la columna para controlar la temperatura del vapor y otro en la parte inferior de la columna para controlar la temperatura de alimentación del líquido. Al comienzo de la destilación, se cargó aproximadamente 1 litro de líquido de GBL filtrado en el fondo de la columna, después se activaron el agua de enfriamiento del condensador y el vacío. Una vez que la presión se hubo estabilizado, el líquido de GBL filtrado se calentó lentamente utilizando una camisa calefactora hasta el punto de ebullición de GBL (204 °C).

Durante las etapas iniciales de la destilación, se eliminó en primer lugar el agua contenida en la GBL filtrada y se descartó junto con impurezas con el punto de ebullición más bajo. Cuando el agua y las impurezas con el punto de ebullición más bajo se eliminaron por completo, la temperatura de alimentación del líquido GBL aumentó hasta el punto de ebullición de GBL. En esta etapa, el vapor generado en la parte superior de la columna era principalmente GBL, que se condensó, se recogió y se reservó para su posterior destilación. Cuando se observó que la temperatura de la alimentación de líquido aumentó rápidamente por encima de 204 °C, se detuvo la destilación. La cantidad total de líquido de GBL recuperado en la primera destilación fue de 0,9 litros con una pureza del 97%.

Después de que el líquido de alimentación restante procedente de la primera destilación se enfriara, se retiró de la columna y se añadieron los 0,9 litros de líquido de GBL destilado. Junto con el líquido de GBL destilado, se añadieron 203 g (o el 20% en peso de GBL) de agua destilada/desionizada (MILLI-Q® Water System, Millipore) al fondo de la columna. Se descubrió que la adición de agua mejora la eliminación de muchas impurezas mediante destilación por arrastre de vapor. Después de la adición del agua, la segunda destilación se llevó a cabo al vacío tal como se ha descrito anteriormente. Se demostró que el líquido GBL resultante recuperado tenía una pureza del 98%.

Se intentó otra variación para la segunda destilación mediante la cual se añadió el 1-3% (en peso de GBL) de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% junto con el agua DI al líquido de GBL previamente destilado. El peróxido actúa oxidando las impurezas en el líquido GBL haciéndolas menos volátiles y por lo tanto más fáciles de separar. Para llevar a cabo esta destilación, se añadieron 0,9 litros de líquido de GBL previamente destilado al fondo de la columna de destilación junto con 203 g de agua DI y 10,2 g de peróxido de hidrógeno al 30-32% (Sigma Aldrich). Se activaron el agua de enfriamiento del condensador y el vacío y se calentó la alimentación de líquido de GBL. La

destilación generó una fracción de agua en primer lugar y una segunda fracción de transición antes del vapor puro de GBL. Se descartaron tanto la primera como la segunda fracciones y se recogió el líquido de GBL puro. El análisis del líquido GBL por CG-EM mostró que tenía una pureza > 99,5% con muy poco olor y color. Para eliminar agua adicional, el líquido de GBL purificado se puede almacenar sobre tamices moleculares secos (tamaño de poro de 3-4 Å, Sigma Aldrich) hasta su uso.

Otra variación en las etapas de purificación anteriores consiste en añadir agua DI y/o solución de peróxido de hidrógeno al 30% durante la primera etapa de destilación. Las etapas adicionales de purificación podrían incluir tratamiento con ozono, resina de intercambio iónico o carbón activado.

Ejemplo de referencia 3. Producción de GBL de base biológica a partir de P4HB purificado acoplada con termólisis

En este ejemplo, la biomasa que contiene P4HB se produce en un proceso de fermentación utilizando glucosa como única fuente de alimentación de carbono tal como se ha descrito anteriormente. Después de la fermentación, el P4HB se extrae de la biomasa y se purifica. Los procedimientos adecuados para purificar P4HB a partir de biomasa se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.610.764 de Tepha y Metabolix y las patentes de Estados Unidos Nº 7.981.642 y 7.576.173 de Metabolix Inc. El P4HB purificado se somete a un procedimiento de termólisis esencialmente en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 y se produce GBL. La GBL producida con este enfoque debe tener un contenido de base biológica de aproximadamente el 99% cuando se somete a ensayo según el protocolo de ensayo de la norma ASTM-D6866-11.

Ejemplo de referencia 4. Producción de GHB de base biológica a partir de P4HB purificado acoplada con despolimerización catalizada

En este ejemplo se produce GHB directamente a partir de un polímero de P4HB de base biológica purificado mediante despolimerización de P4HB en un disolvente apropiado. El polímero de P4HB se produce y se purifica tal como se ha descrito en el ejemplo 3. El polímero purificado se disuelve después en un disolvente tal como tetrahidrofurano (THF) y se trata con metóxido de sodio 0,1 M en metanol. Se utiliza el suficiente metóxido de sodio como para dar como resultado una degradación esencialmente completa del P4HB en el monómero GHB. La mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se completa la reacción, momento en el que la mezcla de reacción se inactiva con ácido esencialmente tal como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 6.623.730. El GHB producido con este enfoque debe tener un contenido de base biológica de aproximadamente el 99% cuando se somete a ensayo según el protocolo de ensayo de la norma ASTM-D6866-11.

Ejemplo de referencia 5. Producción de oligómeros de P4HB de base biológica a partir de P4HB purificado

En este ejemplo, se producen oligómeros de GHB con diferentes pesos moleculares, desde 1.000 daltons hasta 50.000 daltons, directamente a partir de polímero P4HB de base biológica purificado. El polímero P4HB de base biológica se produce en primer lugar y se purifica tal como se ha descrito en el ejemplo 3. El polímero purificado se disuelve después en un disolvente tal como tetrahidrofurano (THF) y se trata con metóxido de sodio 0,1 M en metanol. Se utiliza el suficiente metóxido de sodio como para dar como resultado la degradación del polímero P4HB de base biológica en oligómeros del peso molecular deseado. La mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se completa la reacción, momento en el que la mezcla de reacción se inactiva con ácido esencialmente tal como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 6.623.730. Los oligómeros de P4HB producidos con este enfoque deberán tener un contenido de base biológica de aproximadamente el 99% cuando se someten a ensayo según el protocolo de ensayo de la norma ASTM-D6866-11.

Ejemplo de referencia 6. Producción de GBL o GHB de base biológica a partir de ácido succínico de base biológica

El ejemplo siguiente describe la producción de GBL a partir de ácido succínico de base biológica mediante fermentación de biomasa microbiana, aislamiento del ácido succínico, seguido de hidrogenación catalítica. En la literatura de patentes se describen diversos procedimientos para producir ácido succínico a partir de materiales de partida renovables (patentes de Estados Unidos 8.203.021 y 8.246.792; solicitud EP 2.360.137; solicitud PCT WO2010/092304). Todas las patentes describen la fermentación de una biomasa microbiana (tal como *E. coli*) modificada genéticamente para producir una sal de ácido succínico que después se aísla y se purifica para dar ácido succínico utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. El contenido de base biológica medido según la norma ASTM D6866 del ácido succínico producido por cualquiera de los procedimientos debe ser al menos del 98%. Para llevar a cabo la hidrogenación del ácido succínico, se puede utilizar el procedimiento en fase líquida tal como se describe en la patente de Estados Unidos 4.048.196 en el que un autoclave de 50 ml se carga con 0,3 g de un catalizador de óxido de Cu/Al/Zn. El autoclave se lava con una mezcla gaseosa de nitrógeno/hidrógeno al 98%/2% y se calienta a 150 °C para reducir el catalizador. Después se introduce en el reactor una solución al 7% en peso de producto de ácido succínico de base biológica recuperado en agua DI con un peso total de 10 g. El reactor se presuriza adicionalmente a 250 bares con H₂ gaseoso puro y la reacción de hidrogenación se deja desarrollar durante 1-2 horas. Una vez completada la reacción, el reactor se enfría y se despresuriza, operación seguida de un lavado con nitrógeno. Los contenidos del autoclave se descargan y el catalizador se separa por decantación. El catalizador se lava con agua DI adicional y el lavado se añade al sobrenadante. Una parte alícuota del sobrenadante se filtra y se analiza por HPLC

para determinar el porcentaje de conversión de ácido succínico y el porcentaje de rendimiento de GBL sobre una base molar. Alternativamente, se podría utilizar un procedimiento de hidrogenación catalítica en fase de vapor tal como se describe en el documento EP 1.047.687 para convertir el ácido succínico en GHB o GBL.

5 Ejemplo de referencia 7. Producción de GBL o GHB de base biológica a partir de 1,4-butanodiol de base biológica

El ejemplo siguiente describe la producción de GBL a partir de 1,4-butanodiol (BDO) de base biológica mediante la fermentación de biomasa microbiana, aislamiento del BDO, seguido de oxigenación catalítica. Se describen diversos procedimientos para producir 1,4-butanodiol a partir de materiales de partida renovables en la literatura de patentes (solicitudes de patente de Estados Unidos 2009/0075351 y 2010/00304453). Las patentes describen el uso de una biomasa (tal como *E. coli*, levadura, etc.) modificada genéticamente para producir BDO a partir de materiales de partida tales como glucosa, metanol, gas de síntesis (una mezcla de CO, CO₂, H₂), α-cetoglutarato o succinato. El BDO producido cultivando los microorganismos modificados genéticamente se aísla y se purifica utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. El contenido de base biológica medido según la norma ASTM D6866 del BDO purificado producido por el procedimiento anterior debe ser al menos del 98%. Para convertir el 1,4-butanodiol de base biológica en GBL, se lleva a cabo una oxidación catalítica. El BDO se calienta en primer lugar a 25 °C y después se alimenta con una bomba a través de un rotámetro líquido a la parte superior de un vaporizador calentado eléctricamente, en el que se pone en contacto con aire alimentado a través de un rotámetro separado al fondo del vaporizador. El vaporizador funciona a de 150 °C a 200 °C y está relleno con lana de acero inoxidable para garantizar una buena transferencia de calor y una vaporización y un mezclado eficaces de ácido crotonico y aire. La mezcla se envía después a un precalentador calentado eléctricamente, también relleno de lana de acero inoxidable, y se calienta a 250 °C a 300 °C. La corriente de vapor se envía a un lecho de catalizador fijo que consta de 1/8 gránulos de alúmina impregnados con pentóxido de vanadio (tal como se describe con más detalle por Church, J.M. y Bitha, P., "Catalytic air oxidation of crotonaldehyde to maleic anhydride", I&EC Product Research and Development, vol. 2 (1), 1963, p. 61-66) contenido dentro de un recipiente reactor con camisa. El reactor se calienta eléctricamente para su puesta en marcha y se enfría utilizando aceite de transferencia de calor circulante para mantener las condiciones del reactor. Los gases de salida se alimentan a un separador ciclónico enfriado con agua para permitir que se condense el anhídrido maleico y el ácido crotonico. Cualquier producto no condensado y aún presente en los gases ligeros se absorbe en una torre empaquetada con agua fría circulante utilizada como líquido de lavado de contacto directo. Al final del proceso, el producto líquido del separador ciclónico y el líquido de lavado se recogen y se analizan para calcular el rendimiento de GBL (como porcentaje del valor teórico) y la conversión de BDO.

Ejemplo de referencia 8. Producción de GHB sódico de base biológica a partir de GBL de base biológica

35 En este ejemplo, cualquiera de las GBL de base biológica producidas en los ejemplos anteriores se utiliza como material de partida para producir la sal de sodio del gamma-hidroxibutirato, que es un compuesto farmacéutico utilizado actualmente para tratar afecciones médicas tales como la narcolepsia y la cataplexia. Se añade lentamente GBL de base biológica (24,4 mol) a una solución de NaOH (25 mol en 2 l de agua y 400 ml de etanol) con agitación mecánica y la reacción se deja calentar a reflujo durante 1 hora. El etanol se elimina por destilación dando como resultado una solución acuosa que contiene el 70% de GHB sódico en peso. El GHB producido utilizando este enfoque debe tener un contenido de base biológica de aproximadamente el 99% cuando se somete a ensayo según el protocolo de ensayo de la norma ASTM-D6866-11. Combinando GBL de base biológica con GBL derivada del petróleo en una proporción de 5:95, se puede producir GHB que tiene un contenido de aproximadamente el 5-95% de base biológica utilizando el procedimiento descrito en este ejemplo.

45 Ejemplo de referencia 9. Producción de una composición farmacéutica que contiene gamma-hidroxibutirato sódico (Na-GHB) de base biológica

50 En este ejemplo se describe un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica de Na-GHB de base biológica microbianamente estable (tal como se produce en el ejemplo 8) (véase la patente de Estados Unidos N° 8.263.650). Para preparar una formulación farmacéutica microbianamente estable, se disuelve Na-GHB en agua DI a una concentración de aproximadamente 500 mg/ml. El pH se ajusta con ácido málico, HCl, ácido cítrico u otros ácidos a un valor de 7,3-8,5. Estos ácidos también actúan como tampones para mantener el pH dentro del intervalo óptimo para evitar la conversión de GHB a GBL y para prevenir el crecimiento microbiano durante el almacenamiento.

55 Ejemplo de referencia 10. Producción continua de una composición farmacéutica que contiene GHB de base biológica

60 La GBL de base biológica producida tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores se puede utilizar en un proceso continuo para producir GHB para aplicaciones farmacéuticas tal como se describe en el documento PCT WO2012051473 de Norac Pharma.

Ejemplo de referencia 11. Composiciones que contienen restos de GHB de base biológica para mejorar el tratamiento de pacientes

65 Se utiliza GBL o GHB de base biológica para producir composiciones mejoradas que comprenden restos de GHB para tratar pacientes esencialmente tal como se describe en la patente de Estados Unidos N° 7.572.605B2.

Ejemplo de referencia 12. Composiciones que contienen Na-GHB deuterado de base biológica

Puede prepararse Na-GHB de base biológica en el que uno o más átomos de hidrógeno se han reemplazado por átomos de deuterio partiendo de GBL de base biológica tal como se ha preparado en los ejemplos 1-7 y siguiendo el procedimiento descrito en la solicitud de patente N° US2012/0122952 asignada a Concert Pharmaceuticals. La GBL de base biológica se convierte en primer lugar en el éster butílico por reacción con butanol utilizando un catalizador ácido. El éster t-butílico de GBL se hace reaccionar después en metanol deuterado en presencia de carbonato de potasio para efectuar un intercambio de átomos de hidrógeno-deuterio. Después de que se completa el intercambio de hidrógeno-deuterio, el compuesto se saponifica con hidróxido de sodio para formar un oxibato de sodio deuterado de base biológica. Alternativamente, se podrían utilizar materias primas deuteradas (azúcar, ácido acético o D₂O) para preparar el ácido succínico de partida, 1,4-butanodiol o materiales de GBL que después se convierten en Na-GHB tal como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

Ejemplo de referencia 13. Composiciones que contienen Na-GHB fluorado de base biológica

La solicitud de patente internacional N° WO2102/142162 describe un procedimiento y materiales para fluorar compuestos orgánicos de hidroxilo tales como intermedios o precursores farmacéuticos. El procedimiento se puede aplicar a oxibato de sodio de base biológica tal como se preparó en el ejemplo 8.

Ejemplo de referencia 14. Generación de formulación farmacéutica sólida de oxibato de sodio de base biológica de liberación inmediata

La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US20110111027 asignada a Jazz Pharmaceuticals describe una forma farmacéutica sólida que contiene oxibato de sodio que, cuando se toma por vía oral, es capaz de liberar rápidamente el 90% del producto farmacéutico activo gamma-hidroxibutirato en menos de 1 hora, similar al efecto que se produce cuando se administra oxibato de sodio líquido. La formulación contiene Na-GHB (70-90% en peso), un aglutinante, por ejemplo hidroxipropilcelulosa (1-10% en peso), un lubricante, por ejemplo estearato de magnesio (0,5-5% en peso) y un tensioactivo, por ejemplo laurilsulfato de sodio (0,5-3% en peso). Los ingredientes pueden combinarse en un procedimiento de granulación en seco o en húmedo y después prensarse dando un comprimido. En el procedimiento en húmedo, se utilizó etanol para disolver en primer lugar el aglutinante hidroxipropilcelulosa. También podrían prepararse formulaciones similares sustituyendo oxibato de sodio de base biológica tal como se preparó en el ejemplo 8 en la formulación de liberación inmediata tal como se describió anteriormente para formar un comprimido sólido para la dosificación de oxibato de sodio de base biológica de liberación inmediata.

Ejemplo de referencia 15. Formas farmacéuticas sólidas de liberación controlada de oxibato de sodio de base biológica de pureza ultraalta

La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos US20120076865 asignada a Jazz Pharmaceuticals describe formas farmacéuticas de liberación controlada para fármacos hidrosolubles e higroscópicos tales como oxibato de sodio. La formulación, tal como se describe, incluye tanto un recubrimiento de liberación inmediata de oxibato de sodio como un núcleo sólido de liberación controlada de oxibato de sodio. El núcleo está compuesto de Na-GHB (90-100% en peso) y un aglutinante polimérico tal como hidroxipropilcelulosa o etilcelulosa (1-10% en peso) que se utilizan para preparar los comprimidos sólidos. Se pueden añadir otros componentes al núcleo de liberación controlada, tales como lubricantes, tensioactivos, plastificantes, excipientes, coadyuvantes de compresión u otros materiales de carga.

El núcleo se forma por granulación en húmedo, compactación por rodillos o compresión directa. Una vez que se forma el núcleo, este se recubre después para facilitar la liberación controlada del oxibato de sodio en el sistema GI, así como para conservar la integridad de la forma farmacéutica unitaria. El recubrimiento es una mezcla de un polímero, por ejemplo polímeros de celulosa (50-80% en peso), un formador de poros que modifica la permeabilidad del recubrimiento, por ejemplo hidroxipropilcelulosa, azúcares o ácidos orgánicos y otros materiales de carga o aditivos. Se aplica al núcleo a aproximadamente el 2,5-7,5% en peso del peso total del comprimido. El espesor del recubrimiento también proporciona el control de la velocidad de liberación del oxibato de sodio desde el núcleo y se puede variar para modular la administración del producto farmacéutico. Se demostró que el perfil de liberación de oxibato de sodio del comprimido recubierto se encontraba en el intervalo de 6-8 horas o más.

Antes de administrar el comprimido recubierto, este también se puede recubrir con una película de liberación inmediata que contiene oxibato de sodio tal como se ha descrito en el ejemplo 14. De esta forma, el comprimido suministra una concentración predeterminada de oxibato de sodio dentro de la primera hora y después mantiene un perfil de liberación mantenida a lo largo de las 6-8 horas siguientes. Se podrían preparar formulaciones de liberación controlada similares sustituyendo el oxibato de sodio de base biológica de pureza ultraalta preparado en el ejemplo 8 en la formulación tal como se ha descrito anteriormente. De esta forma, se prepara un comprimido sólido para la dosificación de oxibato de sodio de base biológica de liberación controlada.

Ejemplo 16. Síntesis de P4HB deuterado utilizando D₂O o glucosa deuterada como fuente de deuterio

Se adquirieron óxido de deuterio (D₂O) y glucosa-1,2,3,4,5,6, 6-d7 de Sigma Aldrich. Se prepararon dos soluciones de medios de sales mínimas (MSM). Una solución utilizó D₂O como fuente de todos los componentes del agua, excepto por una pequeña adición de solución de sales traza que añadió 1:1000 de componente H₂O a la solución deuterada. La segunda solución contenía solo H₂O. Además, se utilizaron un medio LB deuterado y una solución de glucosa de 500 g/l en D₂O.

El homopolímero P4HB cepa MBX4743 se eligió para este experimento. Se inoculó MBX4743 en medio LB H₂O a partir de una solución madre de glicerol, y se incubó durante la noche a 250 rpm y 37 °C. Un ml del cultivo realizado durante la noche se subcultivó en 2 ml tanto de LB-D₂O como de LB-H₂O, y se incubó en el agitador durante 2 horas a 37 °C. El cultivo realizado durante la noche de LB-D₂O se utilizó para el subcultivo en medios de sales mínimas de D₂O, mientras que el cultivo de LB-H₂O se utilizó para el subcultivo en medios de sales mínimas de H₂O. Todos los subcultivos se incubaron en el agitador durante 3 horas a 37 °C (figura 1). El cultivo de H₂O-MSM se utilizó para inocular el control (tabla 1, condición 1), mientras que el cultivo en D₂O-MSM se utilizó para inocular todas las demás condiciones (tabla 1).

Tabla 1. Condiciones del medio de fermentación

Numero de condición	Medio	Glucosa alimentada (mg)
1	100% de H ₂ O, MSM	756 de glucosa sin marcar
2	50% de D ₂ O + 50% de H ₂ O, MSM	689 de glucosa sin marcar
3	75% de D ₂ O + 25% de H ₂ O, MSM	376 de glucosa sin marcar
4	100% de D ₂ O, MSM	220 de glucosa sin marcar
5	25% de D ₂ O + 75% de H ₂ O, MSM	49 de glucosa pesada + 69 de glucosa sin marcar
6	50% de D ₂ O + 50% de H ₂ O, MSM	378 de glucosa pesada
7	100% de D ₂ O, MSM	200 de glucosa pesada

Se prepararon siete condiciones de medio de fermentación con diferentes cantidades de D₂O y glucosa marcada (tabla 1). Se utilizaron cuatrocientos µl de cultivos MSM para inocular 24 pocillos en el reactor MICRO24 (tabla 2). El pH se mantuvo a 6,9 a través de un borboteador de NH₄OH y el oxígeno disuelto (OD) se mantuvo al 20% por medio de una alimentación de oxígeno puro. La fermentación se dejó desarrollar durante 42 horas. La alimentación de glucosa se realizó a la discreción del operador con un intento de mantener la concentración de glucosa a 30 g/l. Se utilizaron 500 g/l de glucosa en H₂O para alimentar el control (condición 1). Se utilizaron 500 g/l de glucosa en D₂O para alimentar las condiciones 2, 3, 4 y 7. Se utilizaron diferentes cantidades de 500 g/l de glucosa-1, 2, 3, 4, 5, 6, 6-d7 ("glucosa pesada") en D₂O en las condiciones 5 a 7.

Tabla 2. Las condiciones de cada pocillo en los 24 pocillos del casete MICRO24. Los números de cada celda corresponden a las condiciones del medio de fermentación en la tabla 1 (1 a 7).

	Columna					
Fila	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
A	1	1	4	4	4	5
B	1	1	4	4	7	6
C	1	1	3	3	3	3
D	1	1	2	2	2	2

Los pozos que contenían la misma condición se agruparon. Se centrifugó una muestra de caldo de cada condición, se lavó con H₂O, se liofilizó y se convirtió en la forma de éster butílico mediante butanolisis. El caldo restante de cada condición se usó para la extracción y purificación de polímeros para el análisis por RMN de ¹H.

Resultados

Después de 42 horas de fermentación en MICRO24, todas las condiciones, con la excepción de la condición 7, alcanzaron una alta densidad celular con más del 50% de acumulación de P4HB (Tabla 3).

Tabla 3. Crecimiento celular en MICRO24

Numero de condición	Medio	Glucosa alimentada (mg)	Título final de biomasa (g/l)
1	100% de H ₂ O, MSM	756 de glucosa sin marcar	32,6
2	50% de D ₂ O + 50% de H ₂ O, MSM	689 de glucosa sin marcar	26,9
3	75% de D ₂ O + 25% de H ₂ O, MSM	376 de glucosa sin marcar	23,8
4	100% de D ₂ O, MSM	220 de glucosa sin marcar	3,5
5	25% de D ₂ O + 75% de H ₂ O, MSM	49 de glucosa pesada + 69 de glucosa sin marcar	13,1
6	50% de D ₂ O + 50% de H ₂ O, MSM	378 de glucosa pesada	13,6
7	100% de D ₂ O, MSM	200 de glucosa pesada	Sin crecimiento

5 Las muestras de fermentación se analizaron mediante CG-EM para determinar la distribución de isotómeros. Un cromatograma de CG típico de P4HB muestra dos picos dominantes debido a P4HB: 4-clorobutirato de butilo a 7,68 min y 4-butoxibutirato de butilo a 10,18 min. Cualquiera de los dos picos podría utilizarse para determinar la distribución de peso molecular de 4HB, la unidad de repetición de monómero de P4HB. El pico que se correlacionó con 4-butoxibutirato de butilo se eligió para su posterior análisis. Un patrón de fragmentación típico del 4-butoxibutirato de butilo muestra el ion base en m/z 87 y el ion parental en m/z 159. Ambos patrones se pueden utilizar para determinar la distribución de isotómeros, pero se eligió el patrón parental en m/z 159 para un análisis posterior por simplicidad.

Los resultados de CG-EM a m/z 159 para las seis condiciones se resumen en la tabla 4.

15 Tabla 4. Resultados de CG-EM. El m/z de 159 corresponde al ion parental sin ningún deuterio. El m/z de 165 corresponde al ion con seis deuterios. Los datos se corrigieron para la presencia de ¹³C de origen natural (1,07%) de la glucosa en el medio de fermentación y el butanol en la reacción de butanolisis. La contribución debida a la abundancia natural de deuterio (0,0115%) es pequeña y, por lo tanto, se desprecia.

Numero de condición	m/z								Número de deuterios en 4HB	Porcentaje de deuteración en 4HB
	159 (0 D)	160 (1 D)	161 (2 D)	162 (3 D)	163 (4 D)	164 (5 D)	165 (6 D)	166		
1	97%	0%	3%							
2	4%	18%	30%	28%	15%	4%	1%		2,47	41%
3	1%	4%	16%	30%	30%	16%	4%		3,46	58%
4	2%	0%	1%	7%	24%	41%	24%	1%	4,79	80%
5	19%	28%	31%	16%	5%	1%			1,63	27%
6	2%	2%	9%	23%	32%	24%	8%	1%	3,90	65%

20 Dado que 4HB en la forma de polímero tiene seis átomos de hidrógeno, son teóricamente posibles siete especies de peso molecular dependiendo del número de átomos de hidrógeno que están sustituidos con deuterio (de cero (m/z de 159) a seis deuterios (m/z de 165)).

25 Los resultados de CG-EM indicaron que el grado de incorporación de deuterio en P4HB varió dependiendo de las condiciones de fermentación que se utilizaron. Los resultados de las condiciones 2 a 5, en las que D₂O fue la única fuente de deuterio, demostraron que el deuterio puede incorporarse a P4HB utilizando D₂O como fuente de deuteración. Además, el grado de incorporación varió con la cantidad de D₂O que se añadió al medio. El uso de glucosa deuterada también aumentó el grado de deuteración (condiciones 6 y 7).

30 Cuando se utilizó D₂O al 100% (condición 5), la especie de 4HB más abundante obtenida fue la especie de cinco deuterios (5D) con un 41% de abundancia. También se pudo obtener 4HB marcado con seis átomos de deuterio (6D) (24% de abundancia). El número promedio de átomos de deuterio que podrían incorporarse utilizando D₂O al 100% fue de 4,79 sustituciones por unidad de monómero de 4HB, lo que dio como resultado una deuteración del 80%.

35 Las muestras de las condiciones 1 y 5 se analizaron mediante RMN de ¹H para confirmar independientemente los resultados de deuteración de CG-EM. Los patrones de multipletes de los picos en las posiciones C-2, C-3 y C-4 de P4HB confirmaron la incorporación de deuterio en P4HB. El pico C-4 a 4,109 ppm muestra un triplete con una intensidad de 1:2:1, el pico C-3 a 1,955 ppm muestra un quinteto con una intensidad de 1:4:6:4:1, y el pico C-2 a 2,383 ppm muestra un triplete con la intensidad de 1:2:1.

- 5 El espectro de RMN de ^1H de la condición 5 muestra un patrón diferente porque la incorporación de deuterio cambia el patrón de multiplete: el pico C-4 muestra un doblete que indica que al menos uno de los átomos de hidrógeno en la posición C-3 está reemplazado por deuterio. El pico C-3 es un doblete que indica que la mayor parte de los átomos de hidrógeno en las posiciones C-2 y C-4 están reemplazados por deuterio (se sustituyen tres de los cuatro átomos acoplados en las posiciones C-2 y C-4). El pico C-2 también es un doblete que indica que al menos uno de los átomos de hidrógeno en C-3 está reemplazado por deuterio.
- 10 El espectro de RMN de ^1H de la condición 5 es cualitativamente coherente con la distribución de las especies de peso molecular según se determina por CG-EM: las especies D5 y D6 no producirían picos en RMN de ^1H . La especie más abundante con una abundancia del 41% fue la especie D4 que contiene solo dos átomos de hidrógeno. Hay seis isótopos de la especie D4. Cada uno de los seis isótopos tiene un patrón de escisión de protones diferente. El pico en cada posición de carbono es una superposición de los picos de los seis isotopómeros.
- 15 Dado que solo existe un doblete y un singlete debido a la especie D4, el pico de cada posición puede ser un multiplete de tres picos, a diferencia de un triplete que difiere en el patrón de intensidad y el desplazamiento químico. Alternativamente, un singlete o un doblete dominará en cada posición si alguno de los isótopos es el más dominante. El patrón de doblete fue dominante en las tres posiciones de carbono, lo que indica que los isótopos 1 y 4 fueron probablemente los más dominantes.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir un poli(4-hidroxibutirato) deuterado, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 - alimentar glucosa deuterada a microbios manipulados genéticamente que producen un polímero de poli(4-hidroxibutirato) (P4HB); o
- fermentar en D₂O microbios manipulados genéticamente que producen polímero de P4HB, con o sin glucosa deuterada como alimentación,

10 en el que un porcentaje del carbono en el poli(4-hidroxibutirato) deuterado es carbono moderno y el porcentaje restante de carbono es carbono fósil, en el que la proporción de carbono moderno con respecto al carbono fósil proporciona una huella de carbono única que identifica la fuente del poli(4-hidroxibutirato) deuterado.

15 2. Poli(4-hidroxibutirato) deuterado que puede obtenerse mediante el procedimiento de la reivindicación 1.

 3. Fibra que comprende un poli(4-hidroxibutirato) deuterado según la reivindicación 2.

 4. Malla o sutura que comprende la fibra de la reivindicación 3.

20 5. Mezcla de un poli(4-hidroxibutirato) deuterado de base biológica de la reivindicación 2 y un poli(4-hidroxibutirato deuterado) de origen fósil.

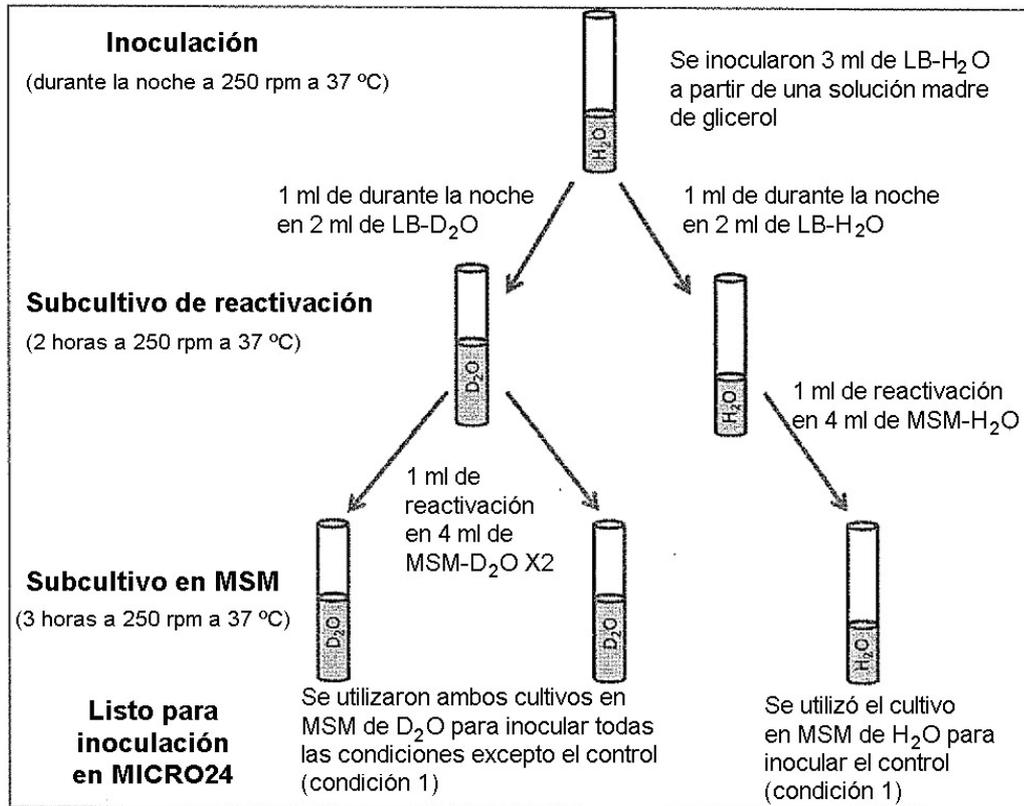


Figura 1