

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 006**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/445</b>	(2006.01)
<b>A61P 21/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 25/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/18</b>	(2007.01)
<b>A61K 31/45</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2014 PCT/US2014/010891**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14110270**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2014 E 14738292 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2943200**

54 Título: **Composiciones de DNJ parenterales estables**

30 Prioridad:

**09.01.2013 US 201361750677 P**  
**11.12.2013 US 201361914839 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.08.2020**

73 Titular/es:

**AMICUS THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**1 Cedar Brook Drive**  
**Cranbury, NJ 08512, US**

72 Inventor/es:

**CHAR, HING;**  
**TESLER, SERGEY;**  
**YANG, JIPING y**  
**DILONE, ENRIQUE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 779 006 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de DNJ parenterales estables

## ANTECEDENTES

5 La enfermedad de Pompe es un ejemplo de un trastorno del almacenamiento lisosómico. La enfermedad de Pompe está provocada por una deficiencia en la enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA). La GAA metaboliza el glucógeno, una forma de almacenamiento de azúcar usada para energía, en glucosa. Se cree que la acumulación de glucógeno conduce a miopatía muscular progresiva en todo el cuerpo que afecta a diversos tejidos corporales, particularmente el corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y el sistema nervioso. Según the National Institute of Neurological Disorders and Stroke, se estima que la enfermedad de Pompe se presenta en aproximadamente 1 de 40.000 nacimientos.

10 Existen tres tipos reconocidos de enfermedad de Pompe – de comienzo infantil, juvenil y en la edad adulta. La infantil es el más grave, y se presenta con síntomas que incluyen falta grave de tono muscular, debilidad, hepatomegalia y cardiomegalia y cardiomiopatía. El tragado puede volverse difícil y la lengua puede sobresalir y dilatarse. La mayoría de los niños mueren de complicaciones respiratorias o cardíacas antes de los dos años de edad. La enfermedad de Pompe de comienzo juvenil se presenta en primer lugar en la infancia temprana o tardía e incluye debilidad progresiva de los músculos respiratorios del tronco, el diafragma y las extremidades inferiores, así como intolerancia al ejercicio. La mayoría de los pacientes con enfermedad de Pompe de comienzo juvenil no vive más allá de la segunda o tercera década de vida. Los síntomas de comienzo en la edad adulta implican debilidad muscular generalizada y consunción de los músculos respiratorios del tronco, las extremidades inferiores y el diafragma. Algunos pacientes adultos carecen de síntomas importantes o limitaciones motrices.

15 La enzimoterapia reconstitutiva (ERT) es un enfoque para tratar la enfermedad de Pompe. Una de las principales complicaciones con la ERT es la obtención y el mantenimiento de cantidades terapéuticamente eficaces de enzima debido a la degradación rápida de la enzima infundida. Como resultado, la ERT requiere numerosas infusiones de alta dosis y es costosa y prolongada.

20 Un enfoque más nuevo para tratar la enfermedad de Pompe, una estrategia específica con chaperonas, salva a proteínas mutadas de la degradación presumiblemente en el retículo endoplásmico (ER) o en otros sistemas de degradación/eliminación de proteínas celulares. Esta estrategia emplea inhibidores reversibles de molécula pequeña que se unen específicamente a una enzima lisosómica defectuosa asociada con un trastorno lisosómico particular. La estrategia de las chaperonas implica el uso de una molécula pequeña que facilite el plegamiento correcto de una proteína mutada, para evitar la degradación excesiva o anormal del sistema de control de calidad del ER. Estas chaperonas específicas se denominan chaperonas sitioespecíficas. Véanse, p. ej., las Patentes de EE. UU. N° 6.274.597, 6.583.158, 6.589.964 y 6.599.919. El documento U.S. 6.583.158 divulga 1-desoxinojirimicina (DNJ) y otras chaperonas sitioespecíficas activas para tratar la enfermedad de Pompe.

25 La 1-DNJ se puede proporcionar en una forma sólida para la administración oral. Sin embargo, si la DNJ se va a administrar como parte de una terapia combinada junto con ERT, existe un deseo de DNJ administrada parenteralmente, ya que una formulación parenteral permite mayor control de la dosificación y acceso de la administración. Además, los pacientes, especialmente los niños, pueden tener dificultad para tragar formas de dosificación orales, independientemente de si se elige como una forma de tratamiento monoterapia o terapia combinada. Aunque la 1-DNJ es soluble y generalmente estable en formulaciones acuosas, estas formulaciones no son adecuadas para la administración parenteral debido a la necesidad de controlar el pH a lo largo de una vida útil práctica de la formulación y proporcionar una osmolalidad adecuada para la administración parenteral de modo que la formulación no provoque efectos perjudiciales para la salud.

30 El documento US 2006/264467 describe un método para incrementar la actividad de una enzima alfa-glucosidasa mutante o silvestre in vitro e in vivo al poner en contacto la enzima con una chaperona farmacológica específica que es un derivado de 1-desoxinojirimicina. La invención también proporciona un método para el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

35 El documento US 5786368 divulga derivados alquilados en N de desoxigalactonojirimicina en los que dicho alquilo contiene de 3-6 átomos de carbono. Se dice que estos compuestos son útiles para inhibir selectivamente la síntesis de glucolípidos.

40 El documento WO 2011/103114 describe soluciones de conservación para conservar materiales biológicos que comprenden al menos un azúcar penetrable en la membrana, al menos un azúcar impenetrable en la membrana, al menos un agente antimicrobiano, al menos un antioxidante, adenosina, albúmina, una sal, un tampón y un agente quelante, y métodos para usar estas soluciones de conservación para conservar materiales biológicos.

45 El documento WO 2011/131926 describe una combinación que comprende N-DNJ y un compuesto de fórmula (I) en la que R1 se selecciona de H; alquilo, alquenilo, alquinilo y aralquilo sustituido o no sustituido lineal o ramificado y en donde la sustitución opcional puede ser con uno o más grupos seleccionados independientemente de: -OH; -F; -Cl; -Br; -I; -NH<sub>2</sub>; alquilamino; dialquilamino; alquilo, alquenilo, alquinilo y aralquilo lineal o ramificado; arilo; heteroarilo;

alcoxi lineal o ramificado; ariloxi; aralcoxi; -(alquilen)oxi(alquilo); -CN; -NO<sub>2</sub>; -COOH; -COO(alquilo); -COO(arilo); -C(O)NH(alquilo); -C(O)NH(arilo); sulfonilo; alquilsulfonilo; arilsulfonilo; sulfamoilo; alquilsulfamoilo; alquiltio; alquilsulfonamida; arilsulfonamida; -NHNH<sub>2</sub>; y -NHOH; o un bioisómero, una de sus sales farmacéuticamente aceptables o derivados. Se dice que la combinación encuentra aplicación en el tratamiento de la fibrosis quística.

- 5 El documento WO 2013/134530 proporciona composiciones que comprenden altas concentraciones de  $\alpha$ -glucosidasa ácida en combinación con una chaperona sitioespecífica para la  $\alpha$ -glucosidasa ácida, y métodos para tratar la enfermedad de Pompe en un sujeto que lo necesite, que incluye un método para administrar al sujeto estas composiciones. También proporciona métodos para incrementar la estabilidad in vitro e in vivo de una formulación de enzima  $\alpha$ -glucosidasa ácida.

## 10 BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

Un aspecto de la materia actualmente divulgada proporciona una composición farmacéutica estable que comprende:

a) un agente activo seleccionado de 1-desoxinójirimicina o N-butil-desoxinójirimicina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y

b) un tampón de citrato sódico,

- 15 en donde el tampón está presente en una concentración de 20 mM a 75 mM, y

en donde la composición farmacéutica estable es autoestable durante al menos aproximadamente un año bajo una atmósfera seleccionada de nitrógeno, aire o una de sus combinaciones, y una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 42°C, y es capaz de ser administrada parenteralmente, preferiblemente capaz de ser administrada uno o más de subcutáneamente e intravenosamente, a un ser humano sin efectos perjudiciales sobre la salud.

- 20 El agente activo puede ser hidrocloreto de 1-desoxinójirimicina.

El agente activo puede ser N-butil-desoxinójirimicina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.

Preferiblemente, la composición farmacéutica está a un pH de 4,6 a 5,5, preferiblemente de aproximadamente 5.

Preferiblemente, el agente activo está presente a una concentración de 1 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de 1 mg/ml a 60 mg/ml, más preferiblemente de 25 mg/ml a 30 mg/ml.

- 25 Preferiblemente, el tampón está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM.

Preferiblemente, la cantidad total de agente activo es aproximadamente 300 mg y el volumen total de la composición es aproximadamente 10,5 ml.

Preferiblemente, la composición farmacéutica estable comprende además un agente quelante.

Preferiblemente, el agente quelante es EDTA.

- 30 Preferiblemente, el agente activo está presente a una concentración de 30 mg/ml o 25 mg/ml, el tampón está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM, y el EDTA está presente a una concentración de aproximadamente 0,05% en peso por volumen.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un método para incrementar la estabilidad de un agente activo seleccionado de 1-desoxinójirimicina o N-butil-desoxinójirimicina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en una formulación para una administración parenteral a un ser humano, que comprende introducir un tampón de citrato sódico en el agente activo para preparar la formulación y almacenar la formulación bajo una atmósfera seleccionada de nitrógeno, aire o una de sus combinaciones, preferiblemente una atmósfera de nitrógeno, y a una temperatura de 2°C a 42°C, en donde el tampón está presente a una concentración de 20 mM a 75 mM.

- 40 Preferiblemente, la formulación del derivado de 1-desoxinójirimicina es autoestable durante al menos aproximadamente un año.

Preferiblemente, la formulación de derivado de 1-desoxinójirimicina es autoestable a una temperatura de 2°C a 8°C o de 23°C a 27°C o de 38°C a 42°C.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un estuche para administración parenteral, preferiblemente para administración intravenosa o subcutánea, a un ser humano de una composición farmacéutica estable, que comprende:

- 45

a) un agente activo seleccionado de 1-desoxinójirimicina o N-butil-desoxinójirimicina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y

b) un tampón de citrato sódico,

en donde el tampón está presente a una concentración de 20 mM a 75 mM, y

en donde la composición es autoestable durante al menos aproximadamente un año bajo una atmósfera seleccionada de nitrógeno, aire o una de sus combinaciones, preferiblemente una atmósfera de nitrógeno, y una temperatura de 2°C a 42°C.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la estabilidad de hidrocloreto de 1-desoxinójirimicina (1-DNJ-HCl o AT2220) en solución tamponadora de fosfato sódico en comparación con la estabilidad en agua que se describe en el Ejemplo 2. La estabilidad se midió mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal (NP-HPLC). Los espectros de la izquierda muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector UV, mientras que los espectros de la derecha muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector de aerosol cargado (CAD).

La Figura 2 muestra la estabilidad de cloruro de 1-desoxinójirimicina en solución tamponadora de acetato sódico en comparación con la estabilidad en agua que se describe en el Ejemplo 3. La estabilidad se midió mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal (NP-HPLC). Los espectros de la izquierda muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector UV, mientras que los espectros de la derecha muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector de aerosol cargado (CAD).

La Figura 3 muestra la estabilidad de cloruro de 1-desoxinójirimicina en solución tamponadora de citrato sódico con una adición de EDTA bajo la atmósfera de nitrógeno según se describe en el Ejemplo 4. La estabilidad se midió mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal (NP-HPLC). Los espectros de la izquierda muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector UV, mientras que los espectros de la derecha muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector de aerosol cargado (CAD).

La Figura 4 muestra la estabilidad de cloruro de 1-desoxinójirimicina en solución tamponadora de citrato sódico en comparación con la estabilidad en agua que se describe en el Ejemplo 5. La estabilidad se midió mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal (NP-HPLC). Los espectros de la izquierda muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector UV, mientras que los espectros de la derecha muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector de aerosol cargado (CAD).

La Figura 5 muestra la estabilidad de cloruro de 1-desoxinójirimicina en solución tamponadora de citrato sódico en comparación con la estabilidad en agua que se describe en el Ejemplo 6. La estabilidad se midió mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal (NP-HPLC). Los espectros de la izquierda muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector UV, mientras que los espectros de la derecha muestran 1-desoxinójirimicina según se detecta mediante un detector de aerosol cargado (CAD).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las formulaciones parenterales ahora divulgadas incluyen 1-DNJ (también denominada DNJ), o una de sus sales o derivados. En una realización, la formulación parenteral incluye 1-DNJ-HCl. En otra realización, la formulación incluye un derivado de 1-DNJ, tal como N-butil-desoxinójirimicina. El derivado de 1-DNJ (p. ej., N-butil-desoxinójirimicina) se puede encontrar además de, o en lugar de, 1-DNJ o 1-DNJ-HCl.

Según se apunta anteriormente, el agente activo se selecciona de 1-desoxinójirimicina, una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o uno de sus derivados. La concentración del agente activo en la formulación, en ciertas realizaciones no limitativas, puede variar de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, o de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, o de aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 35 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del agente activo en la formulación puede ser 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml, 26 mg/ml, 27 mg/ml, 28 mg/ml, 29 mg/ml, 30 mg/ml, 31 mg/ml, 32 mg/ml, 33 mg/ml, 34 mg/ml o 35 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del agente activo en la formulación puede ser aproximadamente 30 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración de 1-desoxinójirimicina como una base libre en la formulación puede ser aproximadamente 25 mg/ml.

En ciertas realizaciones, el pH de la formulación es de aproximadamente 3 a aproximadamente 9 o a aproximadamente 10, o de aproximadamente 3 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,5. En una realización, el pH de la formulación está por debajo de 6,0, o por debajo de 5,5. Se ha encontrado que se puede producir decoloración en formulaciones de 1-DNJ/tampón con un pH en el intervalo de aproximadamente 6,0-7,5. En algunas realizaciones el pH de la formulación puede ser 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación puede ser aproximadamente 5,0.

La formulación contiene un tampón. El tampón es citrato sódico. La concentración del tampón es de 20 mM a 75 mM.

En algunas realizaciones, la formulación incluye un agente quelante, tal como EDTA o EGTA. En algunas realizaciones, el EDTA está presente en la formulación a una concentración de 0,005% a 0,25% (p/v), o de 0,01% a

0,1% (p/v). En una realización, el EDTA está presente en la formulación a una concentración de aproximadamente 0,05 % (p/v).

5 En una realización, la formulación parenteral ahora divulgada se almacena bajo una atmósfera de nitrógeno. En una realización, la formulación parenteral ahora divulgada se almacena bajo una atmósfera de aire. En una realización, la formulación parenteral ahora divulgada se almacena bajo una combinación de atmósfera de nitrógeno y aire. En una realización, la formulación parenteral ahora divulgada se almacena a menos de 45°C, o menos de 25°C, o menos de 15°C, o menos de 10°C.

10 En una realización, la osmolalidad de la formulación parenteral ahora divulgada varía de aproximadamente 280 a aproximadamente 320 mOsm/kg. En una realización alternativa, la osmolalidad de la formulación parenteral ahora divulgada está por debajo de aproximadamente 500 mOsm/kg, o por debajo de aproximadamente 450 mOsm/kg. En una realización, la concentración de 1-DNJ-HCl es aproximadamente 30 mg/ml, la concentración del tampón es 40 mM y la osmolalidad de aproximadamente 374 mOsm/kg. En otra realización, la concentración de 1-DNJ como una base libre es aproximadamente 25 mg/ml, la concentración del tampón es 40 mM y la osmolalidad de aproximadamente 374 mOsm/kg. En otra realización, la concentración de 1-DNJ-HCl es aproximadamente 30 mg/ml, la concentración del tampón es 50 mM y la osmolalidad de aproximadamente 400 mOsm/kg. En otra realización, la concentración de 1-DNJ como una base libre es aproximadamente 25 mg/ml, la concentración del tampón es 50 mM y la osmolalidad de aproximadamente 400 mOsm/kg. En otras realizaciones, la concentración de 1-DNJ-HCl será de aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml.

20 En una realización, la formulación es adecuada para administración subcutánea. En una realización, la formulación es adecuada para administración intravenosa (IV).

25 En una realización, el 1-DNJ-HCl está presente a una concentración de aproximadamente 30 mg/ml y el tampón está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM a un pH de aproximadamente 5. En una realización, la 1-DNJ, como una base libre, está presente a una concentración de aproximadamente 25 mg/ml y el tampón está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM a un pH de aproximadamente 5. En una realización, la formulación se almacena bajo la atmósfera de nitrógeno y a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C. En una realización, la formulación se almacena bajo la atmósfera de nitrógeno y a una temperatura de aproximadamente 23°C a aproximadamente 27°C. En una realización, la formulación se almacena bajo la atmósfera de nitrógeno y a una temperatura de aproximadamente 38°C a aproximadamente 42°C.

30 En una realización, la composición farmacéutica contiene 30 mg/ml de 1-DNJ-HCl a pH 5 y un tampón de citrato sódico 40 mM. En una realización, la composición farmacéutica contiene 25 mg/ml de 1-DNJ, como una base libre a pH 5 y un tampón de citrato sódico 40 mM. En una realización, la composición farmacéutica contiene 30 mg/ml de 1-DNJ-HCl a pH 5, tampón de citrato sódico 40 nM y 0,05% p/v de EDTA. En una realización, la composición farmacéutica contiene 25 mg/ml de 1-DNJ, como una base libre a pH 5, tampón de citrato sódico 40 nM y 0,05% p/v de EDTA.

35 En una realización, la composición farmacéutica contiene 30 mg/ml de 1-DNJ-HCl a pH 5 y un tampón de citrato sódico 50 mM. En una realización, la composición farmacéutica contiene 30 mg/ml de 1-DNJ-HCl a pH 5, tampón de citrato sódico 50 nM y 0,05% p/v de EDTA.

En una realización, la composición farmacéutica contiene 25 mg/ml de 1-DNJ, como una base libre, a pH 5 y un tampón de citrato sódico 50 mM. En una realización, la composición farmacéutica contiene 25 mg/ml de 1-DNJ, como una base libre, a pH 5, tampón de citrato sódico 50 nM y 0,05% p/v de EDTA.

40 Otros excipientes farmacéuticamente aceptables que se pueden incluir en la formulación como tampones incluyen tampón de bicarbonato, aminoácidos, urea, alcoholes, ácido ascórbico, fosfolípidos; proteínas, tales como albúmina sérica, colágeno y gelatina; sales tales como EDTA o EGTA, y cloruro sódico; liposomas; polivinilpirrolidona; azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol y glicerol; propilenglicol y polietilenglicol (p. ej., PEG-4000, PEG-6000); glicerol; glicina u otros aminoácidos; y lípidos. Una lista no exclusiva de excipientes aceptables se lista en la Tabla 1.

45 **Tabla 1. Lista de excipientes**

Excipiente	Intervalo de pH
Acetato	
Sódico	2,5 - 7,0
Ácido acético	2,5 - 7,2
Ácido acético glacial	3,5 - 7,0
Amonio	6,8 - 7,8
Sulfato amónico	-
Hidróxido amónico	-

ES 2 779 006 T3

Arginina	7,0 - 7,4
Ácido aspártico	5,0 - 5,6
Ácido bencenosulfónico	3,25 - 3,65
Benzoato sódico/ácido	3,5 - 6,9
Bicarbonato, sódico	5,5 - 11,0
Ácido bórico/sodio	-
Carbonato, sódico	4,0 - 11,0
Citrato	
Ácido	2,5 - 9,0
Sódico	3,0 - 8,5
Disódico	6,1
Trisódico	6,1
Dietanolamina	9,5 - 10,5
Gluconodeltalactona	5,5 - 7,0
Glicina/HCl de glicina	2,5 - 10,8
Histidina/HCl de histidina	5,0 - 6,5
Ácido clorhídrico	Intervalo amplio
Ácido bromhídrico	3,5 - 6,5
Lactato sódico/ácido	2,7 - 5,8
Lisina (L)	-
Ácido maleico	3,0 - 5,0
Meglumina	6,5 - 11,0
Ácido metanosulfónico	3,2 - 4,0
Monoetanolamina	8,0 - 9,0
Fosfato	
Ácido	6,5 - 8,5
Potásico monobásico	6,7 - 7,3
Potásico dibásico	6,7 - 7,3
Sódico monobásico	2,5 - 8,0
Sódico dibásico	2,5 - 8,3
Sódico tribásico	-
Hidróxido sódico	Intervalo amplio
Succinato sódico/disódico	5,0 - 6,0
Ácido sulfúrico	3,0 - 7,0
Tartrato sódico/ácido	2,5 - 6,2
Trometamina (Tris)	6,5 - 9,0
Adaptado de: Nema, S y cols. (2011). Excipients and their role in approved injectable products: current usage and future directions. PDA J Pharm Sci y Tech, 65, 287-332.	

**Ejemplos**

**Ejemplo Comparativo 1. Preparación de Tampones**

Las siguientes composiciones de tampón representativas se prepararon al mezclar los ingredientes indicados posteriormente. Los tampones usados en los Ejemplos Comparativos 2 y 3 y los Ejemplos 4-6 posteriores se prepararon de un modo similar, las cantidades de componentes ácidos y básicos modificadas, si fuera necesario, para obtener los parámetros de pH especificados en la presente.

5

**Tabla 2. Componentes de tampón de citrato sódico 50 mM, pH 5**

Componente	Cantidad por ml
Dihidrato de Citrato Sódico	9,32 mg
Monohidrato de Ácido Cítrico	3,85 mg
Agua	c. s. hasta 1.0 ml

**Tabla 3. Componentes de tampón de acetato sódico 50 mM, pH 5.5**

Componente	Cantidad por ml
Trihidrato de Acetato Sódico	5,92 mg
Ácido Acético Glacial	0,384 mg
Agua	c. s. hasta 1.0 ml

**Tabla 4. Componentes de tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 7**

Componente	Cantidad por ml
Monohidrato Monobásico de Fosfato Sódico	4,79 mg
Fosfato Sódico Dibásico Anhidro	9,26 mg
Agua	c. s. hasta 1.0 ml

Se puede usar agua desionizada y/o destilada en lugar de agua.

10

#### **Ejemplo Comparativo 2. Estabilidad e integridad de cloruro de 1-desoxinojirimicina en solución tamponadora de fosfato sódico 100 mM.**

15

Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de fosfato sódico. La concentración de 1-DNJ-HCl era 60 mg/ml; la concentración de tampón de fosfato sódico era 100 mM a pH 4.89. La formulación se almacenó a 60°C durante 4 días. Se usó solución de 1-DNJ-HCl en agua como un control. La velocidad de reacción para moléculas pequeñas tales como 1-DNJ-HCl sigue generalmente la ecuación de Arrhenius en la que la velocidad de reacción casi se dobla para cada incremento de 10°C en la temperatura. Así, bajo este modelo, la velocidad de reacción a 60°C sería 2<sup>5</sup> o 32 veces la velocidad de reacción a 10°C. Por lo tanto, durante 4 días a 60°C, el 1-DNJ-HCl se degradaría en aproximadamente el mismo porcentaje que durante 128 días (4\*32) a 10°C.

20

La estabilidad de 1-DNJ-HCl se midió mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en fase normal (NP-HPLC). El 1-DNJ-HCl se registró mediante cromatogramas UV y mediante cromatogramas de detector de aerosol cargado (CAD). La fase móvil consistía en ACN/acetato amónico 30 mM (90/10, v/v). El caudal era 1,0 ml/min con 5 µl de inyección a 400°C. La absorbancia UV se midió a 220 nm. Los ajustes del detector CAD eran 0,24 MPa (35,0 psi), Ganancia: 100 pA.

#### **Resultados:**

25

Los resultados se muestran en la Figura 1. El 1-DNJ-HCl todavía estaba presente en la solución tamponadora de fosfato sódico después de 4 días a 60°C. Adicionalmente, los cromatogramas tanto UV como CAD detectaban la presencia de nuevos compuestos en la solución tamponadora de fosfato. Los picos, correspondientes a los nuevos compuestos, son destacados por las flechas rojas en la Figura 1. Adicionalmente, se observaba una decoloración de la solución tamponadora de fosfato. No se detectaban nuevos compuestos en la solución acuosa de 1-DNJ-HCl de control. La solución acuosa permanecía transparente después de 4 días a 60°C.

30

La inclusión de 1-DNJ-HCl en un tampón de fosfato sódico en este Ejemplo daba como resultado la decoloración de 1-DNJ-HCl. Por otra parte, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) indicaba la presencia de compuestos adicionales en la formulación de 1-DNJ-HCl en el tampón de fosfato sódico. La presencia de compuestos adicionales indicaba que el 1-DNJ-HCl no es estable en el tampón de fosfato sódico bajo las condiciones de este Ejemplo.

35

#### **Ejemplo Comparativo 3. Estabilidad e integridad de cloruro de 1-desoxinojirimicina en solución tamponadora de acetato sódico 50 mM.**

Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de acetato sódico. La concentración de 1-DNJ-HCl era 60 mg/ml; la concentración de tampón de acetato sódico era 50 mM a pH 5,5. La formulación se almacenó a 60°C durante 4 días. Se usó como control solución de 1-DNJ-HCl en agua. La velocidad de reacción para moléculas pequeñas tales como 1-DNJ-HCl sigue generalmente la ecuación de Arrhenius, en la que la velocidad de reacción casi se dobla para cada incremento de 10°K en la temperatura. Así, la velocidad de reacción, bajo este modelo, a 60°C sería 2<sup>5</sup> o 32 veces la velocidad de reacción a 10°C. Por lo tanto, durante 4 días a 60°C, el 1-DNJ-HCl se degradaría aproximadamente en el mismo porcentaje que durante 128 días a 10°C.

La estabilidad de 1-DNJ-HCl se midió mediante NP-HPLC. La presencia de 1-DNJ-HCl se registró mediante un detector de absorbancia UV y mediante un detector de aerosol cargado. La fase móvil consistía en ACN/acetato amónico 30 mM (90/10, v/v). El caudal era 1,0 ml/min con inyección de 5 µl a 400°C. La absorbancia UV se midió a 220 nm. Los ajustes del detector CAD eran 0,24 MPa (35,0 psi), Ganancia: 100 pA.

**Resultados:**

Los resultados se muestran en la Figura 2. El 1-DNJ-HCl todavía estaba presente en la solución tamponadora de acetato sódico después de 4 días a 60°C. Adicionalmente, los cromatogramas tanto UV como CAD detectaban la presencia de nuevos compuestos en la solución tamponadora de acetato. Los picos, correspondientes a los nuevos compuestos, son destacados por las flechas rojas en la Figura 2. Adicionalmente, se observaba una decoloración de la solución tamponadora de acetato. No se detectaban nuevos compuestos en la solución acuosa de 1-DNJ-HCl de control. La solución acuosa permanecía transparente después de 4 días a 60°C.

**Ejemplo 4. Estabilidad e integridad de cloruro de 1-desoxinojirimicina en solución tamponadora de citrato sódico 50 mM con EDTA bajo atmósfera de nitrógeno.**

Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico que incluye además EDTA. La concentración de 1-DNJ-HCl era 60 mg/ml; la concentración de tampón de citrato sódico era 50 mM a pH 4,6. La concentración de EDTA era 0,05% p/v. Algunas muestras se almacenaron bajo la atmósfera de nitrógeno (esencialmente nitrógeno al 100%) mientras que otras se almacenaron bajo aire. La formulación se almacenó a 60°C durante 8 días.

La estabilidad de 1-DNJ-HCl se midió mediante NP-HPLC. La presencia de 1-DNJ-HCl se registró mediante un detector de absorbancia UV y mediante un detector de aerosol cargado. La fase móvil consistía en ACN/acetato amónico 30 mM (90/10, v/v). El caudal era 1,0 ml/min con inyección de 5 µl a 400°C. La absorbancia UV se midió a 220 nm. Los ajustes del detector CAD eran 0,24 MPa (35,0 psi), Ganancia: 100 pA.

**Resultados:**

Los resultados se muestran en la Figura 3. El 1-DNJ-HCl todavía estaba presente en la solución tamponadora de citrato sódico después de 8 días a 60°C. No se detectaban nuevos compuestos en las muestras almacenadas bajo atmósfera de nitrógeno. La solución permanecía transparente sin decoloración visible. Una combinación de atmósfera de nitrógeno y EDTA conservaba la estabilidad y la integridad de AT2220. Las muestras almacenadas bajo aire mostraban la presencia de nuevos compuestos en la solución tamponadora de acetato. La cantidad de estos compuestos era inferior que en los Ejemplos 1 y 2, basándose en el número y el tamaño de los picos adicionales. Los picos correspondientes a los nuevos compuestos son destacados mediante las flechas rojas en la Figura 3. Adicionalmente, se observaba una ligera decoloración de la formulación tamponadora de citrato, almacenada bajo aire.

**Ejemplo 5. Estabilidad e integridad de cloruro de 1-desoxinojirimicina en solución tamponadora de citrato 50 mM.**

Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico. La concentración de 1-DNJ-HCl era 60 mg/ml; la concentración de tampón de citrato sódico era 50 mM a pH 4,7. La formulación se almacenó a 60°C durante 8 días. Se usó como control solución de 1-DNJ-HCl en agua.

La estabilidad de 1-DNJ-HCl se midió mediante NP-HPLC. La presencia de 1-DNJ-HCl se registró mediante un detector de absorbancia UV y mediante un detector de aerosol cargado. La fase móvil consistía en ACN/acetato amónico 30 mM (90/10, v/v). El caudal era 1,0 ml/min con inyección de 5 µl a 400°C. La absorbancia UV se midió a 220 nm. Los ajustes del detector CAD eran 0,24 MPa (35,0 psi), Ganancia: 100 pA.

**Resultados:**

Los resultados se muestran en la Figura 4. El 1-DNJ-HCl todavía estaba presente en la solución tamponadora de citrato sódico después de 8 días a 60°C. Basándose en estos resultados, no parece requerirse EDTA para la estabilidad de la formulación de 1-DNJ-HCl. No se detectaban nuevos compuestos en la solución acuosa de 1-DNJ-HCl de control. No se observaba decoloración en la solución acuosa después de 8 días a 60°C.

**Ejemplo 6. Estabilidad e integridad de cloruro de 1-desoxinojirimicina en solución tamponadora de citrato sódico 50 mM bajo atmósfera de nitrógeno.**

Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico. La concentración de 1-DNJ-HCl era 60 mg/ml; la concentración de tampón de citrato sódico era 50 mM a pH 5.0. La formulación se almacenó a 60°C durante 17 días. Las muestras se almacenaron bajo la atmósfera de nitrógeno (esencialmente nitrógeno al 100%). Se usó como control solución de 1-DNJ-HCl en agua. La velocidad de reacción para moléculas pequeñas tales como 1-DNJ-HCl sigue generalmente la ecuación de Arrhenius, en la que la velocidad de reacción casi se dobla para cada incremento de 10°K en la temperatura. Así, la velocidad de reacción a 60°C sería 2<sup>5</sup> o 32 veces la velocidad de reacción a 10°C. Por lo tanto, durante 17 días a 60°C, AT2220, bajo este modelo, se degradaría aproximadamente en el mismo porcentaje que durante 17 multiplicado por 32 días o aproximadamente 17 meses.

La estabilidad de 1-DNJ-HCl se midió mediante NP-HPLC. La presencia de 1-DNJ-HCl se registró mediante un detector de absorbancia UV y mediante un detector de aerosol cargado. La fase móvil consistía en ACN/acetato amónico 30 mM (90/10, v/v). El caudal era 1,0 ml/min con inyección de 5 µl a 400°C. La absorbancia UV se midió a 220 nm. Los ajustes del detector CAD eran 0,24 MPa (35,0 psi), Ganancia: 100 pA.

**Resultados:**

Los resultados se muestran en la Figura 4. El 1-DNJ-HCl todavía estaba presente en la solución tamponadora de citrato sódico después de 17 días a 60°C bajo atmósfera de nitrógeno. No se detectaban nuevos compuestos en la solución acuosa de 1-DNJ-HCl de control. No se observaba decoloración en la solución acuosa después de 17 días a 60°C.

En resumen, las formulaciones de 1-DNJ-HCl en tampones de fosfato sódico y acetato sódico daban como resultado decoloración. Por otra parte, la HPLC indicaba la presencia de compuestos adicionales en la formulación de 1-DNJ-HCl en el tampón de fosfato sódico y acetato sódico. En contraste, la formulación de 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico no mostraba decoloración y mostraba de poca a ninguna presencia de compuestos adicionales. Basándose en los resultados de estos Ejemplos, la formulación 1-DNJ-HCl es la más estable en tampón de citrato sódico.

El almacenamiento de muestras bajo atmósfera de nitrógeno (esencialmente nitrógeno al 100%) conserva la estabilidad e integridad de la formulación de cloruro de 1-desoxinojirimicina más que el almacenamiento bajo aire. (Véanse los ejemplos 3 y 5).

Basándose en los resultados de estos Ejemplos, la presencia de EDTA no es necesaria para conservar la estabilidad y la integridad de formulaciones de cloruro de 1-desoxinojirimicina. (Véanse los ejemplos 4 y 5).

**Ejemplo 7. Medida de la osmolalidad de cloruro de 1-desoxinojirimicina en tampón de citrato sódico.**

La molalidad del cloruro de 1-desoxinojirimicina (1-DNJ-HCl) se determinó mediante depreciación del punto de congelación. La concentración de cloruro de 1-desoxinojirimicina variaba de 30 mg/ml a 60 mg/ml. La concentración de citrato sódico variaba de 20 a 50 mM.

**Resultados:**

Los resultados se presentan posteriormente en la Tabla 5.

**Tabla 5. Osmolalidad del cloruro de 1-desoxinojirimicina**

1-DNJ-HCl (mg/ml)	Osmolalidad (mOsm/kg)						
	Concentración del Tampón de Citrato Sódico						
	50 mM	45 mM	40 mM	35 mM	30 mM	25 mM	20 mM
60	654	638	623	607	592	576	560
55	613	597	581	566	550	535	519
50	571	555	540	524	509	493	477
45	530	514	498	483	467	452	436
40	488	472	457	441	426	410	394
35	447	431	415	400	384	369	353
30	405	389	374	358	343	327	311

Los resultados muestran que una concentración de 1-DNJ-HCl de 30 mg/ml (que da como resultado una concentración de 1-DNJ libre de 25 mg/ml) en tampón de citrato sódico 50 mM dará como resultado una osmolalidad de 405

mOsm/kg. Idealmente, la osmolalidad de la formulación para la formulación parenteral sería 280-320 mOsm/kg de modo que la formulación fuera isotónica con el tejido elegido o la sangre. Generalmente, se considera que una osmolalidad de aproximadamente 500 mOsm/kg o menos es aceptable para pruebas clínicas ya que no provoca efectos perjudiciales sobre la salud cuando se administra a un ser humano, tales como irritación.

5 **Ejemplo 8. Estabilidad de la Formulación de 1-DNJ-HCl a Diferentes Temperaturas (Apariencia y Color).**

Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico. La concentración de 1-DNJ-HCl era 30 mg/ml (que da como resultado una concentración de 1-DNJ libre que era 25 mg/ml); la concentración de tampón de citrato sódico era 50 mM a pH 5.0. Se elaboraron dos partidas que contenían cada una aproximadamente mil muestras. La partida L-12-026 se almacenó durante 6 meses y la partida E-13-014 se almacenó durante 3 meses. Las muestras se almacenaron bajo la atmósfera de nitrógeno (esencialmente nitrógeno al 100%). Se usó como control solución de 1-DNJ-HCl en agua. Las muestras se almacenaron a tres temperaturas diferentes: 5°C ± 3°C, 25°C ± 2°C o 40°C ± 2°C. A los 1, 3 y 6 meses, las muestras de cada partida se recogieron y se midió la estabilidad del producto. Se midió la apariencia y el color en unidades APHA. Una apariencia por debajo de 100 unidades APHA se considera generalmente aceptable para pruebas clínicas como una indicación de estabilidad.

15 **Resultados:**

Los resultados se presentan posteriormente en las Tablas 6.1-6.3. Todas las muestras aparecen como soluciones incoloras transparentes.

Tabla 6.1 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Apariencia y el Color en Condiciones de Almacenamiento de 5°C ± 3°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
	0	0	0	0
E-13-014	Conforme	Conforme	Conforme	-
	0	0	0	

20 Tabla 6.2 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Apariencia y el Color en Condiciones de Almacenamiento de 25°C ± 2°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
	0	0	<10	0
E-13-014	Conforme	Conforme	Conforme	-
	0	0	0	

Tabla 6.3 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Apariencia y el Color en Condiciones de Almacenamiento de 40°C ± 2°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme
	0	0	<10	10
E-13-014	Conforme	Conforme	Conforme	-
	0	0	0	

25 Los resultados muestran que la formulación de 1-DNJ-HCl sigue siendo sorprendentemente estable. No se observa decoloración durante 6 meses de almacenamiento a temperaturas que varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 42°C.

**Ejemplo 9. Estabilidad de la Formulación de 1-DNJ-HCl a Diferentes Temperaturas (Osmolalidad).**

Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico, bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 8. Las muestras se almacenaron a dos temperaturas diferentes:  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  o  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A los 1, 3 y 6 meses, se recogieron muestras de cada partida y se midió la osmolalidad. La osmolalidad inicial de la muestra era aproximadamente 405 mOsm/kg. Una osmolalidad de aproximadamente 300- 500 mOsm/kg se considera generalmente aceptable para pruebas clínicas.

**Resultados:**

Los resultados se presentan posteriormente en las Tablas 7.1 - 7.2.

Tabla 7.1 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Osmolalidad en Condiciones de Almacenamiento de  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	403	403	403	404
E-13-014	403	405	405	-

Tabla 7.2 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Osmolalidad en Condiciones de Almacenamiento de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
E-13-014	403	407	407	

Los resultados muestran que la formulación presenta una estabilidad notable. La osmolalidad permanece inalterada después de un almacenamiento durante 3 y 6 meses a temperaturas que varían de aproximadamente  $2^{\circ}\text{C}$  a aproximadamente  $27^{\circ}\text{C}$ . Por otra parte, no se observa una tendencia a disminuir la osmolalidad. Sin querer limitarse a una teoría particular, los datos indican que la osmolalidad no está cambiando significativamente durante períodos de almacenamiento de aproximadamente un año o más.

**Ejemplo 10. Estabilidad de la Formulación de 1-DNJ-HCl a Diferentes Temperaturas (Materia en partículas).**

Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico, bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 8. Las muestras se almacenaron a dos temperaturas diferentes:  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  o  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . A los 1, 3 y 6 meses, se recogieron muestras de cada partida y se midió la presencia de materia en partículas como número de partículas por recipiente. Las partículas de dos tamaños se consideraban separadamente: partículas mayores o iguales a  $10\ \mu\text{m}$  y partículas mayores o iguales a  $25\ \mu\text{m}$ . La presencia de partículas mayores o iguales a  $10\ \mu\text{m}$  en la cantidad de menos o igual a aproximadamente 6000 por recipiente de 10 ml se considera generalmente aceptable para pruebas clínicas. La presencia de partículas mayores que o iguales a  $25\ \mu\text{m}$  en la cantidad de menos de o igual a aproximadamente 600 por recipiente de 10 ml se considera generalmente aceptable para pruebas clínicas.

**Resultados:**

Los resultados se presentan posteriormente en las Tablas 8.1 - 8.2. Se muestra el número de partículas de cada muestra,

Tabla 8.1 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Materia en Partículas en Condiciones de Almacenamiento de  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026 $\geq 10\ \mu\text{m}$ :	5	7	12	181
L-12-026 $\geq 25\ \mu\text{m}$ :	<1	3	0	9
E-13-014 $\geq 10\ \mu\text{m}$ :	181	5	7	-
E-13-014 $\geq 25\ \mu\text{m}$ :	9	1	1	

Tabla 8.2 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Materia en Partículas en Condiciones de Almacenamiento de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
E-13-014 $\geq 10\mu\text{m}$ :	181	1	3	-
E-13-014 $\geq 25\mu\text{m}$ :	9	0	1	-

5 Los resultados muestran que la formulación presenta una estabilidad notable. No existe un incremento de materia en partículas de ningún tipo después de un almacenamiento durante 3 y 6 meses a temperaturas que varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 27°C. Por otra parte, el incremento en la materia en partículas es mayor que o igual a 25  $\mu\text{m}$ . Indica que las partículas no se agregan para formar partículas mayores. Sin querer limitarse por una teoría particular, los datos indican que la cantidad de partículas no se está incrementando durante períodos de almacenamiento de aproximadamente un año o más.

#### Ejemplo 11. Estabilidad de la Formulación de 1-DNJ-HCl a Diferentes Temperaturas (pH).

10 Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico, bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 8. Las muestras se almacenaron a tres temperaturas diferentes: 5°C  $\pm$  3°C, 25°C  $\pm$  2°C o 40°C  $\pm$  2°C.. A los 1, 3 y 6 meses, se recogieron muestras de cada partida y se midió el pH. El pH inicial de la solución era 5,0. Mantener el pH en el intervalo de aproximadamente 4,8 a aproximadamente 5,4 se considera una indicación aceptable de estabilidad.

#### Resultados:

Los resultados se presentan posteriormente en las Tablas 9.1-9.3.

15 Tabla 9.1 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para el pH en Condiciones de Almacenamiento de 5°C  $\pm$  3°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	5,1	5,0	5,0	5,0
E-13-014	4,9	4,9	5,0	-

Tabla 9.2 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para el pH en Condiciones de Almacenamiento de 25°C  $\pm$  2°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	5,1	5,0	5,0	5,0
E-13-014	4,9	5,0	5,0	-

Tabla 9.3 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Apariencia y el Color en Condiciones de Almacenamiento de 40°C  $\pm$  2°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	5,1	5,0	5,0	5,0
E-13-014	4,9	4,9	5,0	-

20 Los resultados muestran que la formulación presenta una estabilidad notable. No existe cambio de ningún tipo en el pH después de un almacenamiento durante 3 y 6 meses a temperaturas que varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 42°C. Sin querer limitarse por una teoría particular, los datos indican que el pH de la formulación no se está incrementando durante períodos de almacenamiento de aproximadamente un año o más.

#### Ejemplo 12. Estabilidad de la Formulación de 1-DNJ-HCl a Diferentes Temperaturas (Concentración).

25 Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico, bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 8. Las muestras se almacenaron a tres temperaturas diferentes: 5°C  $\pm$  3°C, 25°C  $\pm$  2°C o 40°C  $\pm$  2°C.. A los 1, 3 y 6 meses, se recogieron muestras de cada partida y se midió la concentración de 1-DNJ como una base libre. La concentración inicial de 1-DNJ como una base libre en la solución era aproximadamente 25 mg/ml (correspondiente a 30 mg/ml de 1-DNJ HCl).

Mantener la concentración de 1-DNJ como una base libre en el intervalo de aproximadamente 22 a aproximadamente 27 mg/ml (90-110%) se considera una indicación aceptable de estabilidad.

**Resultados:**

Los resultados se presentan posteriormente en las Tablas 10.1-10.3.

- 5 Tabla 10.1 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para el pH en Condiciones de Almacenamiento de 5°C ± 3°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	26,9(110%)	25,5 (104%)	25,6 (104%)	26,0 (106%)
E-13-014	25,7(103%)	26,1 (104%)	27,0 (108%)	-

Tabla 10.2 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para el pH en Condiciones de Almacenamiento de 25°C ± 2°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	26,9(110%)	25,7 (105%)	25,6 (104%)	25,9 (106%)
E-13-014	25,7(103%)	25,2 (101%)	25,7 (103%)	-

- 10 Tabla 10.3 Datos de Estabilidad del Producto Farmacológico para la Apariencia y el Color en Condiciones de Almacenamiento de 40°C ± 2°C.

Partida	Tiempo (Meses)			
	0	1	3	6
L-12-026	26,9(110%)	25,5 (104%)	24,4 (99%)	26,2 (107%)
E-13-014	25,7(103%)	25,6 (102%)	25,1 (100%)	-

- 15 Los resultados muestran que la formulación presenta una estabilidad notable. No existe un cambio significativo en la concentración después de un almacenamiento durante 3 y 6 meses a temperaturas que varían de aproximadamente 2°C a aproximadamente 42°C. Un valor de concentración alto en un momento inicial estaba provocado por una variabilidad de inyecciones estándar de referencia y no se determinaba que estuviera relacionado con la formulación o la estabilidad. No existe un patrón visible para el incremento o la disminución de la concentración. Sin querer limitarse por una teoría particular, los datos indican que la concentración de la formulación no se está incrementando durante períodos de almacenamiento de aproximadamente un año o más.

**Ejemplo 13. Potencial Hemolítico de la Formulación de 1-DNJ-HCl en Sangre Entera de Ser Humano, Rata y Mono Cynomolgus.**

- 20 Se disolvió 1-DNJ-HCl en tampón de citrato sódico. La concentración de 1-DNJ-HCl era 30 mg/ml (la concentración de 1-DNJ libre resultante era 25 mg/ml); la concentración de tampón de citrato sódico era 50 mM a pH 5,0. La formulación de 1-DNJ-HCl se añadió a muestras de sangre entera de ser humano varón, rata y mono cynomolgus. Se mezclaron 500 µM de formulación de 1-DNJ-HCl con 500 µM de la muestra de sangre. El tampón servía como un control negativo, mientras que Triton-X 100 (agente de lisis) servía como un control positivo. Adicionalmente, se usó una muestra de sangre sin adiciones como un control negativo.

- 25 Las muestras se almacenaron a 4°C. Las muestras de sangre se incubaron a 37°C durante 30 minutos con la formulación de 1-DNJ-HCl, después de lo cual las muestras se centrifugaron. La cantidad de hemoglobina en el sobrenadante procedente de cada muestra centrifugada se midió usando un estuche para ensayos de hemoglobina disponible comercialmente (BioAssay Systems, QuantiChrom™ Hemoglobin Assay Kit) y el lector de microplacas Tecan.

**Resultados:**

Los resultados se presentan posteriormente en la Tabla 11.

Tabla 11. Potencial Hemolítico de 1-DNJ-HCl en Sangre Entera

Especie	Muestras: 500 µl de volumen de sangre se mezclaron con 500 µl de lo siguiente:	Dilución	OD Media (n=4)	Desv Est. (mg/dl)	Hemoglobina (mg/dl)	% de lisis de RBC
<b>Ser Humano</b>						
	30 mg/ml de AT2220	1	0,0755	0,005	19	0,0%
	Vehículo	1	0,0706	0,005	18	0,0%
	-	1	0,2568	0,030	64	0,7%
	0,1% de Triton X-100	100	0,2768	0,002	6899	100,0%
<b>Mono</b>						
	30 mg/ml de AT2220	1	0,0649	0,004	16	0,1%
	Vehículo	1	0,0488	0,001	12	0,0%
	-	1	0,2989	0,036	74	1,3%
	0,1% de Triton X-100	100	0,2000	0,004	4984	100,0%
<b>Rata</b>						
	30 mg/ml de AT2220	1	0,3535	0,078	88	-0,3%
	Vehículo	1	0,4304	0,041	107	0,0%
	-	1	0,5634	0,021	140	0,5%
	0,1% de Triton X-100	100	0,2567	0,007	6398	100,0%

Los resultados muestran que la formulación presenta una falta sorprendente de potencial hemolítico. No se detectaba hemólisis de eritrocitos en la sangre entera de ser humano, rata Sprague Dawley o mono Cynomolgus con las mezclas de vehículo o formulación de 1-DNJ-HCl no diluida. La formulación de 1-DNJ-HCl y su vehículo no daba como resultado ninguna hemólisis detectable en sangre entera procedente de cualquiera de las tres especies probadas en este ensayo. Sin querer limitarse por una teoría particular, los datos indican que la formulación no está provocando efectos perjudiciales sobre la salud tales como dolor o irritación cuando se administra al sujeto. La formulación de 1-DNJ-HCl presenta una seguridad notable ya que no provoca irritación vascular.

Los expertos en la técnica apreciarán, o serán capaces de determinar usando experimentación solo habitual, que aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, se entiende que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y las aplicaciones de la presente invención. Por lo tanto, se ha de entender que se pueden realizar numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que se pueden idear otras disposiciones sin apartarse del alcance de la presente invención según se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

En las reivindicaciones, artículos tales como "un" "uno(a)" y "el(la)" pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o son de otro modo pertinentes para un producto o procedimiento dado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en o es pertinente de otro modo para un producto o procedimiento dado. La invención incluye realizaciones en las que más de uno o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en o son pertinentes de otro modo para un producto o procedimiento dado. Por otra parte, se ha de entender que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que uno o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etc., procedentes de una o más de las reivindicaciones listadas se introducen en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que dependa de otra reivindicación se puede modificar para incluir una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación de base.

Cuando los elementos se presentan como listas, p. ej., en el formato de grupos de Markush, se ha de entender que cada subgrupo de los elementos también se divulga, y cualesquiera elemento o elementos se pueden retirar del grupo. Se debe entender que, en general, cuando se hace referencia a que la invención, o aspectos de la invención, comprende elementos, características, etc. particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten en, o consisten esencialmente en, estos elementos, características, etc. Con propósitos de simplicidad, esas realizaciones no se han indicado específicamente de forma literal en la presente. Se apunta que el término "que comprende" está destinado a ser abierto y permite la inclusión de elementos o etapas adicionales.

5 Cuando se dan intervalos, se incluyen los extremos. Por otra parte, se ha de entender que a menos que se indique otra cosa o sea evidente otra cosa a partir del contexto y el conocimiento de un experto normal en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos indicados en diferentes realizaciones de la invención, hasta la décima de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

10 Además, se ha de entender que cualquier realización particular de la presente invención que se encuentre dentro de la técnica anterior se puede excluir explícitamente de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Puesto que se considera que estas realizaciones son conocidas por un experto normal en la técnica, se pueden excluir aunque la exclusión no se indique explícitamente en la presente. Cualquier realización particular de las composiciones de la invención (p. ej., cualquier resto de elección como diana, cualquier enfermedad, trastorno y/o afección, cualquier agente de conexión, cualquier método de administración, cualquier aplicación terapéutica, etc.) se puede excluir de una cualquiera o más reivindicaciones, por cualquier razón, ya esté relacionada o no con la existencia de técnica anterior.

15 Las publicaciones analizadas anteriormente y a lo largo del texto se proporcionan solamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente se debe considerar una admisión de que los inventores no estén autorizados para anteceder esta divulgación en virtud de la divulgación anterior.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica estable que comprende:
  - a) un agente activo seleccionado de 1-desoxinojirimicina o N-butil-desoxinojirimicina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y
  - 5 b) un tampón de citrato sódico,

en donde el tampón está presente a una concentración de 20 mM a 75 mM, y

en donde la composición farmacéutica estable es autoestable durante al menos aproximadamente un año bajo una atmósfera seleccionada de nitrógeno, aire o una de sus combinaciones, y una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 42°C y es capaz de ser administrada parenteralmente, preferiblemente capaz de ser administrada una o más de subcutáneamente e intravenosamente, a un ser humano sin efectos perjudiciales para la salud.
- 10 2. La composición farmacéutica estable según la reivindicación 1, en la que el agente activo es hidrocloreto de 1-desoxinojirimicina.
3. La composición farmacéutica estable según la reivindicación 1, en la que el agente activo es N-butil-desoxinojirimicina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15 4. La composición farmacéutica estable según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición farmacéutica está a un pH de 4,6 a 5,5, preferiblemente de aproximadamente 5.
5. La composición farmacéutica estable según la reivindicación 4, en la que el agente activo está presente a una concentración de 1 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente de 1 mg/ml a 60 mg/ml, más preferiblemente de 25 mg/ml a 30 mg/ml.
- 20 6. La composición farmacéutica estable según la reivindicación 5, en la que el tampón está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM.
7. La composición farmacéutica estable según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la cantidad total de agente activo es aproximadamente 300 mg y el volumen total de la composición es aproximadamente 10,5 ml.
- 25 8. La composición farmacéutica estable según la reivindicación 1, que comprende además un agente quelante.
9. La composición farmacéutica estable según la reivindicación 8, en la que el agente quelante es EDTA.
10. La composición farmacéutica estable según la reivindicación 9, en la que el agente activo está presente a una concentración de 30 mg/ml o 25 mg/ml, el tampón está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM, y el EDTA está presente a una concentración de aproximadamente 0,05% en peso por volumen.
- 30 11. Un método para incrementar la estabilidad de un agente activo seleccionado de 1-desoxinojirimicina o N-butil-desoxinojirimicina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en una formulación para una administración parenteral a un ser humano, que comprende introducir un tampón de citrato sódico en el agente activo para preparar la formulación y almacenar la formulación bajo una atmósfera seleccionada de nitrógeno, aire o una de sus combinaciones, preferiblemente una atmósfera de nitrógeno, y a una temperatura de 2°C a 42°C, en donde el tampón está presente a una concentración de 20 mM a 75 mM.
- 35 12. El método según la reivindicación 11, en el que la formulación de 1-desoxinojirimicina o N-butil-desoxinojirimicina es autoestable durante al menos aproximadamente un año.
13. El método según la reivindicación 12, en el que la formulación de 1-desoxinojirimicina o N-butil-desoxinojirimicina es autoestable a una temperatura de 2°C a 8°C o de 23°C a 27°C o de 38°C a 42°C.
- 40 14. Un estuche para la administración parenteral, preferiblemente para la administración intravenosa o subcutánea, a un ser humano de una composición farmacéutica estable, que comprende:
  - a) un agente activo seleccionado de 1-desoxinojirimicina o N-butil-desoxinojirimicina, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, y
  - b) un tampón de citrato sódico,

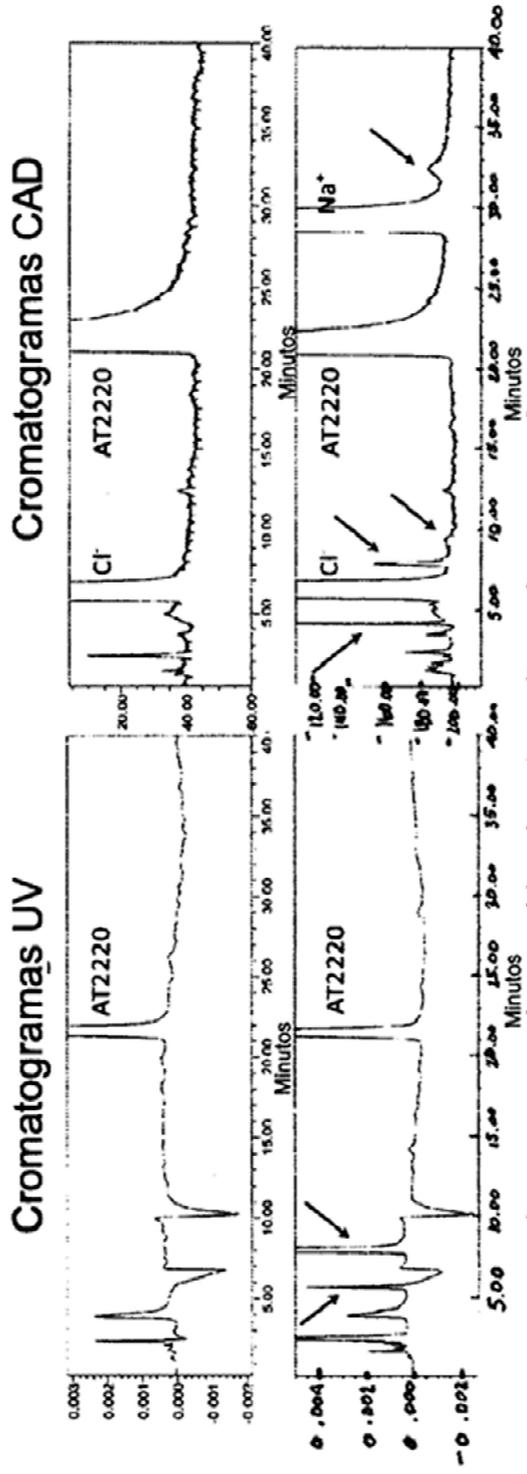
45 en donde el tampón está presente a una concentración de 20 mM a 75 mM, y

en donde la composición es autoestable durante al menos aproximadamente un año bajo una atmósfera seleccionada de nitrógeno, aire o una de sus combinaciones, preferiblemente una atmósfera de nitrógeno, y una temperatura de 2°C a 42°C.

Figura 1

**Desarrollo del Método Analítico de HCl de AT2220**

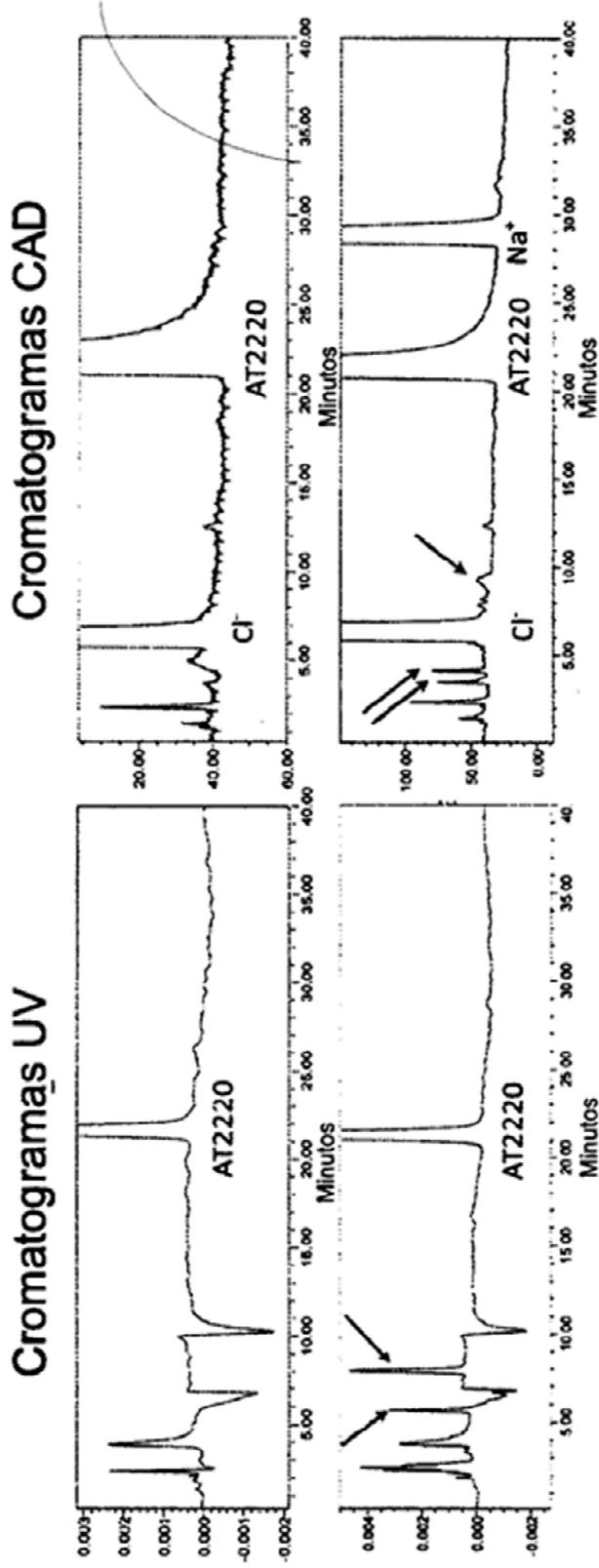
Fase Nº 1: HCl de AT2220 en Agua frente a en Tampón de Fosfato Sódico 100 mM (60°C x 4 días)



HCl de AT2220 en agua como un control (superior) frente a en tampón de fosfato sódico (inferior)

**Figura 2**  
**Desarrollo del Método Analítico de HCl de AT2220**

Fase Nº 2: HCl de AT2220 en Agua frente a en Tampón de Acetato Sódico 50 mM (60°C x 4 días)



HCl de AT2220 en agua como un control (superior) frente a en tampón de acetato sódico (inferior)

**Figura 3**  
**Desarrollo del Método Analítico de HCl de AT2220**

Fase Nº 3: HCl de AT2220 en Tampón de Citrato Sódico 50 mM + 0,05% de EDTA cargado con N<sub>2</sub> frente a cargado con Aire (60-C x 8 días)

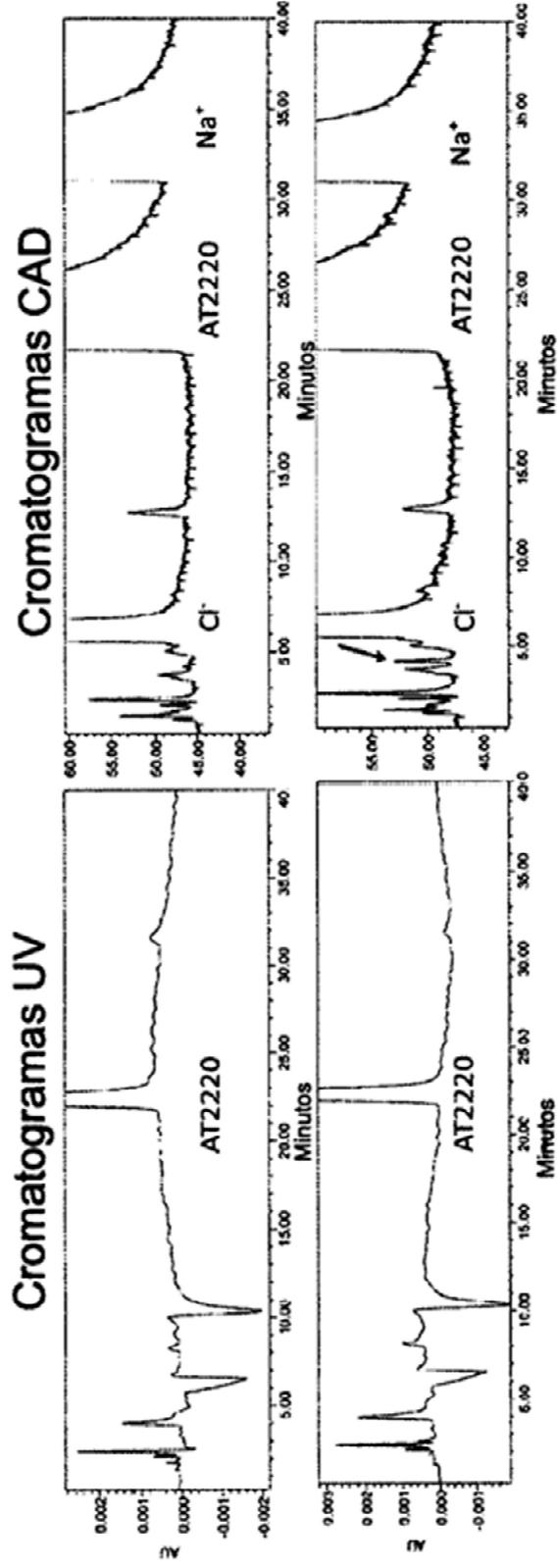
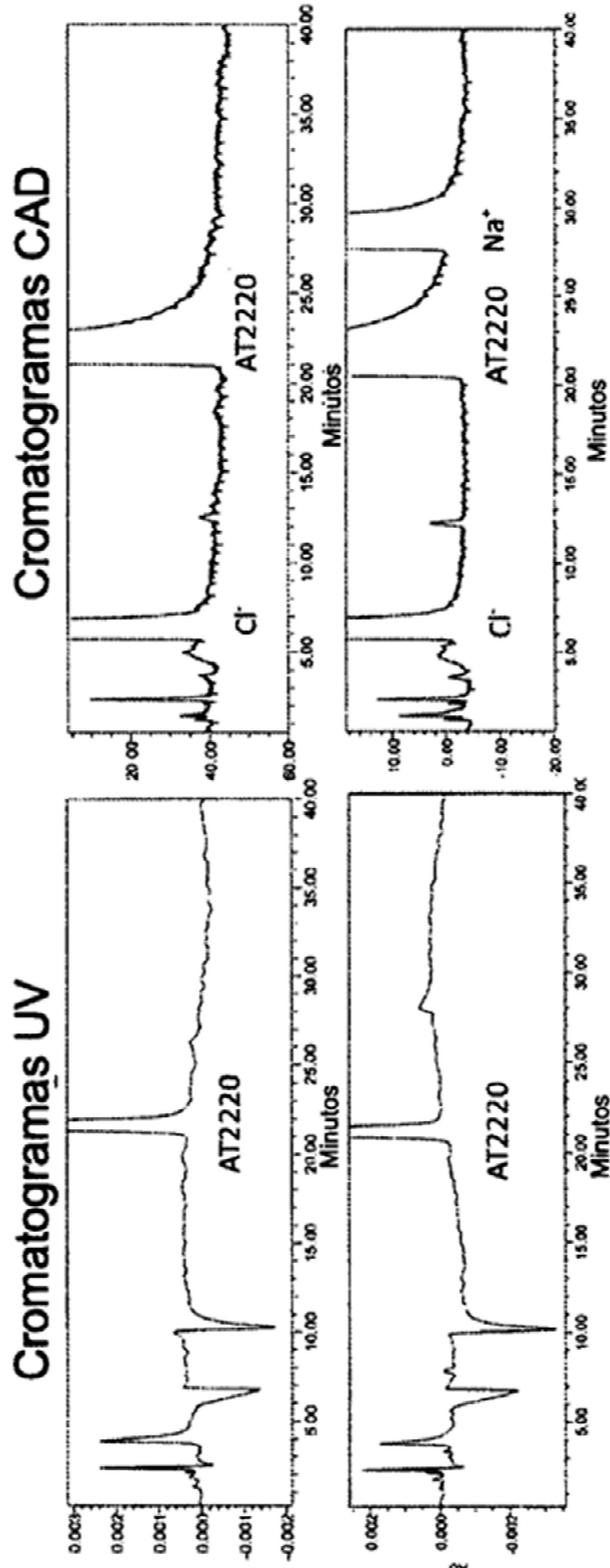


Figura 4

**Desarrollo del Método Analítico de HCl de AT2220**

Fase N° 4: HCl de AT2220 en Tampón de Citrato Sódico 50 mM (60°C x 8 días)

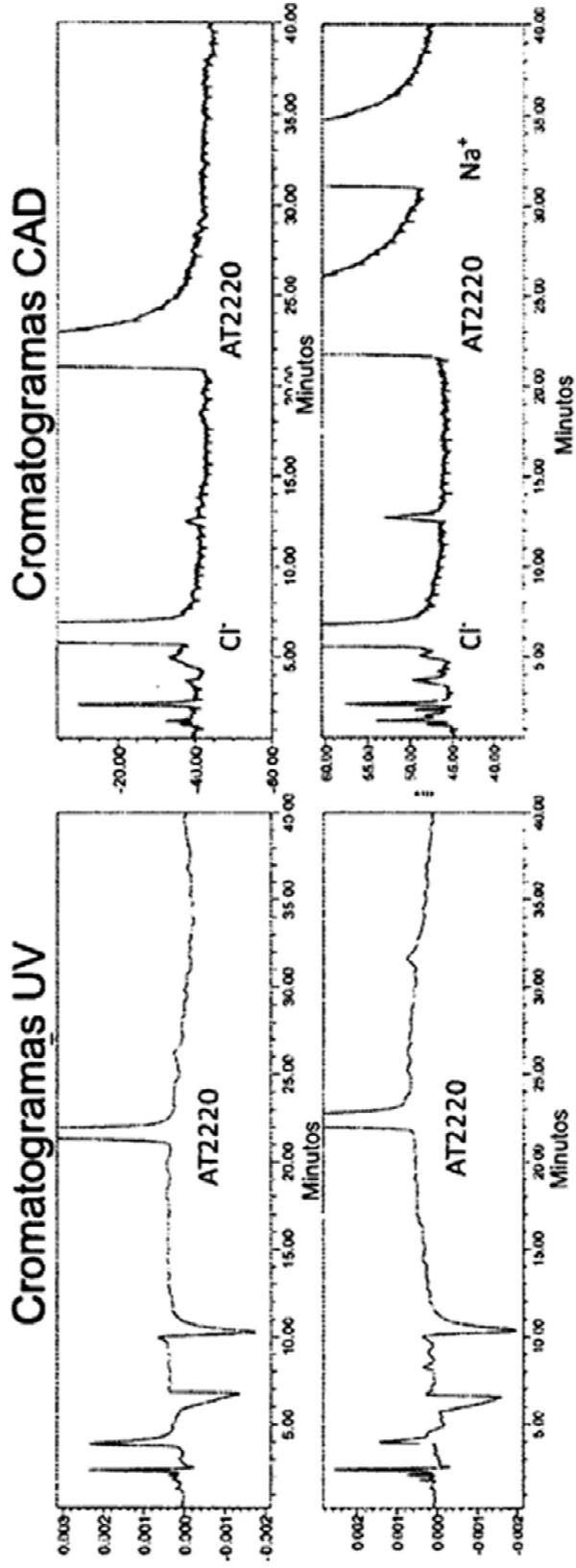


HCl de AT2220 en agua como un control (superior) frente a en tampón de citrato sódico (inferior)

Figura 5

**Desarrollo del Método Analítico de HCl de AT2220**

Fase Nº 5: HCl de AT2220 en Tampón de Citrato Sódico 50 mM (60°C x 17 días)



HCl de AT2220 en agua como un control (superior) frente a un tampón de citrato sódico (inferior)