COMPOSICIONES DE ÉSTER DE COLINA DE ÁCIDO LIPOICO Y MÉTODOS PARA ESTABILIZAR EN PRODUCTOS FARMACOLÓGICOS FARMACÉUTICAMENTE RELEVANTES

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a composiciones farmacéuticamente compatibles que comprenden éster de colina de ácido lipoico y composiciones y métodos específicos para estabilizar las composiciones y minimizar la irritación del tejido ocular cuando se aplican como gotas para los ojos. Las composiciones de este documento se contemplan como terapias para (sin limitación) trastornos oculares como presbicia, ojo seco, cataratas y degeneración macular relacionada con la edad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El éster de colina del ácido lipoico (LACE, conforme a sus siglas en inglés) es un derivado sintetizado químicamente del ácido R–α–lipoico.

El ácido lipoico, también conocido como ácido tióctico, es un ácido graso de ocho carbonos con una unión de disulfuro que se une a los carbonos 6 y 8 para formar un anillo de 1,2–ditiolano. El ácido forma isómeros ópticos, de los cuales el isómero R–α–lipoico es el más activo biológicamente.

El éster de colina de ácido lipoico (LACE, estructura química, ver Figura 1) se diseñó para penetrar en las membranas biológicas con la incorporación del grupo de cabeza de colina catiónica. Mientras que el ácido lipoico no penetra la córnea, el derivado del éster de colina del ácido lipoico penetra la córnea, es hidrolizado por esterasas corneales y es transformado en el ácido lipoico biológicamente activo. LACE se ha formulado como una solución oftálmica que se aplica dos veces al día como una gota para el ojo para tratar la presbicia.

LACE, que es un profármaco que consiste en ácido lipoico y colina, es una molécula única para tratar la presbicia. El ácido lipoico (LA) es el ingrediente activo, y el grupo de cabeza de la colina sirve para ayudar a la permeabilidad en el ojo. Los enlaces

entre LA y la colina son hidrolizados por las esterasas en la película lagrimal y la córnea después de que se administra la gota ocular. El ácido lipoico libre entra en el ojo y finalmente llega al cristalino. Allí es reducido a ácido dihidrolipoico por oxidorreductasas endógenas, que luego causan la hidrólisis de las proteínas citosólicas dentro de las células lenticulares alargadas superficiales. Esta escisión de proteínas permite un flujo libre de citosol y la reversión de los procesos oxidativos asociados con la rigidización del cristalino relacionada con la edad. Se espera que las soluciones oftalmológicas preparadas a partir de LACE permitan la acomodación y mejoren el foco de visión cercana en las personas con presbicia, la pérdida de la acomodación relacionada con la edad.

La presbicia es una incapacidad relacionada con la edad para enfocarse en objetos cercanos; esta afección es causada por cambios fisiológicos en la microestructura del cristalino que producen la pérdida de flexibilidad en el autoajuste de la longitud focal y la curvatura del cristalino para enfocar el objeto visual. Esta afección se corrige con lentes correctivos. Se ha informado que el éster de colina del ácido lipoico ("LACE") (véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense Nro. 8.410.462) puede restaurar la visión de cerca.

En apoyo de esta afirmación, existen estudios *ex–vivo* que demostraron que el ablandamiento del cristalino se puede inducir farmacológicamente en cristalinos de donantes humanos utilizando el agente reductor de disulfuro proteico ditiotreitol (DTT), y en cristalinos de ratón, con ácido lipoico.

Este mecanismo de acción permite contemplar el tratamiento de múltiples enfermedades y trastornos oculares. Estos trastornos son, entre otros, presbicia, degeneración macular relacionada con la edad, cataratas y ojo seco.

Un problema que ha hecho que la formulación de LACE sea problemática ha sido la propensión a desestabilizarse mediante la apertura del anillo de la unión de ditiolano para formar especies oxidadas que comprometen la actividad de la molécula. A temperatura ambiente, LACE se degrada rápidamente en especies oxidadas (ver “Cromatograma de HPLC de solución oftálmica de LACE con productos de

degradación", ver la FIGURA 2). Incluso cuando se almacena a temperaturas refrigeradas, la oxidación rápida se produce en el almacenamiento tan pronto como en 1 semana, lo que comprende la utilidad de la molécula como producto farmacológico. Para que la solución oftálmica de LACE (también conocida como Solución Oftálmica EV06) sea utilizada en su máximo potencial como producto farmacológico, fue fundamental que la formulación acuosa se estabilizara durante el almacenamiento y durante el uso.

Otra cuestión que desconcertó para el desarrollo farmacéutico de las soluciones oftálmicas de LACE fue la incidencia de la irritación de la superficie ocular observada *in vivo* en un modelo de irritación de conejo. La invención detalla parámetros inesperados que causaron o contribuyeron a la irritación ocular, y procesos para eliminar o minimizar estos parámetros. Estos parámetros no estaban relacionados con la composición de la formulación o las propiedades de la sustancia farmacológica, factores que normalmente se correlacionaban o se atribuían a la irritación ocular.

Las composiciones y los métodos descriptos describen formulaciones y métodos para estabilizar las formulaciones de LACE oftálmicas a largo plazo.

También se describen descubrimientos no anticipados en cuanto a la causa de la irritación de las formulaciones de LACE formuladas bajo ciertas condiciones del proceso. La causa de la irritación se correlacionó con la agregación de las moléculas de sal de LACE en el agua, como parte de las interacciones hidrófobas con las moléculas de agua circundantes y las interacciones iónicas con el contraanión (cloruro o yoduro). Los parámetros críticos del proceso se identificaron como factores clave en la generación de soluciones oftálmicas finales y confortables de cloruro de LACE (solución oftálmica EV06). Para la sal de cloruro, las condiciones del proceso final minimizaron la formación de las especies de degradación y minimizaron la formación de especies que se atribuyeron a la irritación ocular.

Con LACE–yoduro, la simple optimización del proceso no generó soluciones confortables. La especie agregada de LACE no se pudo dispersar cuando la forma

de sal era yoduro, debido a la estabilización de la especie agregada por el ion de yoduro más grande.

Una vez disuelta en una solución acuosa, para la sal de yoduro de LACE, la agregación no se pudo dispersar una vez formada, y se asentó como una especie agregada termodinámicamente que era aproximadamente 39–41% del pico de yoduro de LACE. Se realizaron correlaciones para especies asociativas e irritación ocular. El segundo aspecto de la invención es la estabilización de un producto farmacológico de yoduro de LACE mediante la generación de complejos de inclusión en ciclodextrinas.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN.

La invención propuesta logra dos objetivos principales: (a) generar soluciones oftálmicas de LACE que sean estables durante por lo menos un año a temperaturas de almacenamiento refrigeradas de 2–5ºC, y (b) generar formulaciones (tanto LACE–cloruro como LACE–yoduro) que no sean irritantes para el ojo.

La estructura química de LACE dicta dos puntos de degradación. Uno es la apertura del anillo de diotiolano, y el otro es la degradación oxidativa e hidrolítica. Como se mencionó anteriormente, LACE interactúa con el oxígeno para generar rápidamente especies oxidadas. En el agua, LACE también es susceptible a la hidrólisis de la unión de éster para generar ácido lipoico y colina. La tasa a la que se produce la hidrólisis se correlaciona con la temperatura; la hidrólisis es menor a temperaturas y pH más bajos.

Se llevaron a cabo estudios con derivados de solución oftálmica de LACE, también llamada solución oftálmica EV06, almacenados en frascos con gotero de LDPE (polietileno de baja densidad, conforme a sus siglas en inglés) permeable, que son permeables a los gases. En este documento se describen métodos que los inventores han desarrollado para minimizar la oxidación de la solución de LACE compuesta durante el almacenamiento.

Además, los extensos estudios de compatibilidad de mezclas de excipientes con LACE establecieron la criticidad de ciertos excipientes como factores estabilizadores,

el rol del pH en la estabilización de la hidrólisis de LACE en agua, así como el efecto de los agentes de ajuste de osmolalidad, tales como el cloruro de sodio y glicerol. Lo más importante fue que el efecto estabilizador de la alanina para LACE, a diferencia del citrato, fosfato y borato, se ha descripto en la invención propuesta.

Mientras se buscaban las causas de la irritación, se descubrió que LACE, cuando se disuelve en agua, forma micelas y agregados micelares, comunes a los compuestos que son de naturaleza anfifílica. Como definición, los ejemplos de compuestos formadores de micelas son fosfatidil colina, fosfatidil colina pegilada, estearato de PEG (polietilenglicol), sorbitol, etc. Aunque el fenómeno de formación de micelas de LACE no es inesperado debido a la naturaleza anfifílica de la molécula, la formación de estos agregados a temperaturas más bajas fue sorprendente. La presencia de los agregados se midió mediante un método RP–HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, conforme a sus siglas en inglés) desarrollado internamente. La medición se podría realizar tanto con HPLC–UV (cromatografía líquida de alto rendimiento con detector de UV, conforme a sus siglas en inglés) como con HPLC–ELSD (cromatografía líquida de alto rendimiento con detector de diseminación de luz evaporativa, conforme a sus siglas en inglés). Tanto las sales de cloruro como de yoduro de LACE forman agregados micelares en soluciones acuosas, aunque el yoduro de LACE forma agregados más estables en agua, debido a la interacción más fuerte del contraión de yoduro y la molécula de LACE catiónica. La concentración de equilibrio de los agregados de yoduro LACE es de 39–41% del pico de API. En comparación, la concentración de equilibrio de cloruro de LACE es <1%, después de la dispersión con agitación.

A. CLORURO DE LACE EN SOLUCIONES ACUOSAS.

Las soluciones acuosas de cloruro de LACE formaron estructuras de tipo gel a temperaturas refrigeradas (2–5ºC). También se espera que el número y la agregación de estos conjuntos micelares aumenten con el aumento de la concentración del fármaco formador de micelas. Los inventores han correlacionado

la extensión de la agregación micelar de LACE con la irritación de la superficie ocular, un resultado inesperado y sorprendente, ya que los vehículos micelares a menudo se contemplan como sistemas de suministro de fármacos para compuestos insolubles. Por lo tanto, esta es la primera explicación de irritación correlacionada con los agregados micelares. Una vez descubierto, este fenómeno debía minimizarse mediante métodos de composición para correlacionarse con la comodidad.

La formación de agregados micelares parecía estar correlacionada con la temperatura de la composición (FIGURA 4). La formación de autoensamblajes es un fenómeno termodinámico, correlacionado con una reducción eficiente de la energía libre de superficie para lograr un estado de energía minimizado. Cuando LACE se combinó en agua a una temperatura más baja (5ºC), se formaron agregados que tenían una consistencia de tipo gel. Las composiciones formuladas a temperaturas refrigeradas fueron extremadamente irritantes para el ojo. El estado agregado podría cuantificarse mediante un método de RP–HPLC (ver el cromatograma que se muestra en las FIGURAS 12A–12B). Una serie de experimentos de investigación demostró la no presencia de polímeros u oligómeros, cuando se midió mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, conforme a sus siglas en inglés) exhaustiva. Otras investigaciones evaluaron la irritación ocular como una función de los procesos realizados en presencia de aire ambiente o en presencia de nitrógeno. No hubo correlación de irritación con el aire o el nitrógeno. Ambos fueron igualmente confortables cuando se formularon a temperatura ambiente, aunque los productos de degradación fueron superiores en presencia de aire. Cuando LACE se combinó a temperatura ambiente, la agregación micelar fue menor según lo cuantificado por el método de HPLC. LACE combinado a temperatura ambiente generó soluciones que eran confortables y no irritantes.

Tampoco se anticipó el "desenredo" de los agregados micelares. Los agregados formados en las composiciones acuosas de LACE se podrían "desenredar", ya que las soluciones se dejaron equilibrar en la mesa de trabajo a temperatura ambiente,

según lo medido por HPLC. Experimentos adicionales mostraron que la mezcla vigorosa logró la desagregación. Por lo tanto, se demostró que estas especies no eran especies permanentes con uniones covalentes, sino más bien un autoensamblaje de agregados de LACE que parecía tener una menor concentración a temperatura ambiente, en comparación con los 5ºC. Las soluciones acuosas de LACE, cuando se congelan, forman una consistencia fibrosa. Estas soluciones, cuando se llevaron a temperatura ambiente y se almacenaron a esta temperatura, se vieron como soluciones homogéneas nuevamente, lo que dio aún más crédito al concepto de dependencia de la temperatura del autoensamblaje.

Sin embargo, una vez compuestas, las soluciones de LACE libres de agregados pudieron almacenarse en condiciones refrigeradas para minimizar la degradación oxidativa e hidrolítica. Se estableció a través de estudios de estabilidad que la temperatura de almacenamiento ideal de LACE es de 2–5ºC, para minimizar los eventos de degradación.

Se determinó que las condiciones ideales de composición estaban a temperatura ambiente (22–25ºC), a fin de producir la solución menos irritante, y se determinó que la condición ideal de almacenamiento era entre 2–5ºC, para lograr una solución oftálmica estable y confortable de LACE para la presbicia.

A fin de ayudar adicionalmente a la estabilización de soluciones oftálmicas preparadas a partir de LACE, se colocaron paquetes de barredores de oxígeno en bolsas Mylar impermeables con las botellas oftálmicas de LDPE para evitar la degradación inducida por la oxidación. Los extensos estudios de estabilidad demostraron el logro de la estabilidad de un año de soluciones oftálmicas EV06.

También se describen en esta invención propuesta formas de realización de diversas composiciones que estabilizan el LACE, que incluyen otros tipos de preparaciones acuosas que incluyen liposomas, emulsiones compuestas para el propósito principal de estabilización del fármaco.

B. YODURO DE LACE EN SOLUCIONES ACUOSAS.

El yoduro LACE en soluciones acuosas forma agregados micelares (al igual que el

cloruro de LACE) que causan irritación en el tejido ocular. Los experimentos a continuación describen algunos de los métodos de formulación para interrumpir la micelización.

En los experimentos en los que o bien se añadió cloruro de sodio a una formulación de yoduro de LACE existente, o se utilizó una solución que contenía cloruro de sodio para disolver el API (ingrediente farmacéutico activo, conforme a sus siglas en inglés) de yoduro LACE, el pico de "especies asociativas" no se redujo significativamente.

En experimentos en los que se utilizó un cosolvente tal como etanol o propilenglicol para suspender el API antes de la adición de un vehículo acuoso, hubo una reducción muy significativa en el porcentaje de especies asociativas. La adición de un solvente orgánico a una formulación existente también disminuyó el pico de especies asociativas, en menor medida.

Estos resultados apuntan a estrategias de formulación que puedan interferir con la interacción hidrófoba entre las moléculas de LACE como un medio para controlar las especies asociativas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 ilustra la estructura química del éster de colina del ácido lipoico (LACE).

La FIGURA 2 ilustra gráficos de especies micelares de LACE a los 8,1 minutos, a 1, 3 y 4 horas de la mezcla de la Formulación KW–LACE–01–86–2.

La FIGURA 3 ilustra gráficos de especies micelares de LACE a los 8,1 minutos, a las 6, 8 y 24 horas de la mezclar de la Formulación KW–LACE–01–86–2.

La FIGURA 4 es un gráfico que ilustra que las especies de LACE micelares son más altas cuando se mezclan a temperaturas refrigeradas.

La FIGURA 5 es un gráfico que ilustra que las concentraciones altas de LACE micelar (indicadas por un pico grande entre 7,9 y 8,5 minutos en la traza de HPLC) se correlacionan con el cloruro de LACE aglomerado.

La Figura 5B es un gráfico que ilustra que una concentración de LACE micelar inferior se correlaciona con el cloruro de LACE no aglomerado.

La FIGURA 6 es un gráfico que ilustra el efecto de la alanina en función del pH.

La Figura 7 es un gráfico que ilustra la estabilidad de formulaciones libres de BAC y libres de glicerol.

La FIGURA 8 es un gráfico que ilustra la estabilidad de formulaciones que contienen sulfito.

La FIGURA 9 es un gráfico que ilustra la estabilidad de las composiciones LACE libres de BAC.

La Figura 10 es un gráfico que ilustra la estabilidad de las composiciones LACE libres de glicerol.

La Figura 11 es un gráfico que ilustra el efecto de composiciones tamponadas sobre la estabilidad de LACE.

La FIGURA 12A es un gráfico que ilustra la correlación de la puntuación de irritación (en un modelo de irritación de conejo) con el % de especies micelares de LACE medido por HPLC–UV.

La FIGURA 12B es un gráfico que ilustra la correlación de la puntuación de irritación (en un modelo de irritación de conejo) con el % de especies micelares de LACE medido por HPLC–ELSD.

La Figura 12C es una curva típica de glicerol.

La FIGURA 13A es un gráfico de HPLC de FK–LACE–02–15, 1,92% de yoduro de LACE (Lote 092309), con 1,8% de NaCl agregado (T = 0 horas).

La FIGURA 13B es un gráfico de HPLC de FK–LACE–02–15, 1,92% de yoduro de LACE (Lote 092309), con 1,8% de NaCl agregado (T = 4 horas).

La FIGURA 13C es un gráfico de HPLC de yoduro de LACE (lote 011510), disuelto en un tampón de pH 4,5 con 1,8% de NaCl.

La FIGURA 14 es un gráfico de HPLC de yoduro de LACE (lote 011510), disuelto en etanol al 78%.

La FIGURA 15 es un gráfico de HPLC de yoduro de LACE (Lote 011510), disuelto en

propilenglicol al 10%.

La FIGURA 16 es un gráfico de HPLC de yoduro de LACE formulado en sulfobutil éter ciclodextrina.

La FIGURA 17 es un gráfico de HPLC de yoduro de LACE formulado con polipropilenglicol para interrumpir la micelización.

La FIGURA 18 es un gráfico que ilustra el efecto de HP–*B*–CD sobre la oxidación de yoduro de LACE.

La FIGURA 19 es un gráfico que ilustra el efecto de HP–*B*–CD sobre las impurezas totales de yoduro de LACE.

La FIGURA 20 es un gráfico que compara la formulación original de cloruro de LACE y yoduro de LACE HP–*B*–CD.

La FIGURA 21 es un cálculo de la energía de activación de la formación de especies oxidadas (yoduro de LACE/HP–*B*–CD frente a cloruro de LACE formulación sin HP–*B*–CD).

La FIGURA 22 es un cálculo de la energía de activación de la formación de ácido lipoico (yoduro de LACE/HP–*B*–CD frente a cloruro de LACE formulación sin HP–*B*–CD).

La FIGURA 23 es una célula de Franz para estudios de permeabilidad de la córnea.

La FIGURA 24 es una permeabilidad del ácido lipoico en el Estudio 1 (Córneas 1–3: 1,92% LACE–I con 7,4% HP–*B*–CD; Córneas 4–6: 1,5% LACE–Cl, sin HP–*B*–CD).

La FIGURA 25 es un gráfico que muestra la permeación de LACE en el Estudio 1.

La FIGURA 26 es un gráfico que muestra la permeación de LACE en el Estudio 2

La FIGURA 27 es un gráfico que ilustra el ácido lipoico extraído de las córneas en el Estudio 2 (Córneas 1–3: formulación de yoduro de LACE al 3,0%; Córneas 4–6: formulación de yoduro de LACE al 4,5%).

La FIGURA 28 es un gráfico que muestra la permeación de LACE en el Estudio 3.

La FIGURA 29 es un gráfico que ilustra el ácido lipoico extraído de las córneas en el Estudio 3 (Córneas 1–3: formulación de yoduro de LACE/HP–*B*–CD al 3,0%; Córneas 4–6: formulación de yoduro de LACE/sin HP–*B*–CD al 4,5%).

La FIGURA 30 es un gráfico que muestra la permeación de LACE en el Estudio 4.

La FIGURA 31 es un gráfico que ilustra el ácido lipoico extraído de las córneas en el Estudio 4 (Córneas 1–3: formulación de yoduro de LACE/HP–*B*–CD al 1,92%; Córneas 4–6: formulación de yoduro de LACE/sin HP–*B*–CD al 1,92%).

La FIGURA 32 es un gráfico que ilustra el cambio a lo largo del tiempo en el porcentaje de área de las especies asociativas en función de la cantidad de HP–*B*–CD en la formulación [expresada como equivalencia molar (M. E) en relación con un mol de LACE].

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

A. DEFINICIONES DE TÉRMINOS.

Se entiende que el término "EV06", "LACE" o "éster de colina del ácido lipoico" tiene la siguiente estructura química como se muestra en la Figura 1.

Como se usa en este documento, las formulaciones de LACE se refieren a formulaciones de éster de colina de ácido lipoico. Por ejemplo, la formulación de 1,5% de cloruro de LACE se refiere a una formulación que tiene 1,5% de cloruro de éster de colina de ácido lipoico en peso de la formulación. Alternativamente, la solución oftálmica de EV06, 1,5%, se refiere a una formulación comprendida de 1,5% de sal de cloruro de éster de colina de ácido lipoico. Yoduro de LACE al 3% se refiere a una solución que está comprendida de 3% de yoduro de LACE en peso de la formulación.

Como se usa en este documento, un "derivado" del éster de colina del ácido lipoico se entiende como cualquier compuesto o una mezcla de compuestos, excluyendo el ácido lipoico y la colina, formados a partir de la reacción del éster de colina del ácido lipoico con un excipiente farmacéutico no acuoso.

Como se usa en el presente documento, el término "autoensamblaje" denota un ensamblaje termodinámico de moléculas para lograr el estado de energía más estable. Un ejemplo de autoensamblaje son las micelas formadas en agua, típicamente formadas por moléculas con un componente hidrófobo y un componente

hidrófilo. El componente hidrófilo de la molécula se encuentra en la superficie de las micelas, mientras que el interior contiene las partes hidrófobas; para LACE, el grupo de cabeza de colina está sobre la superficie de la micela.

A menos que se indique específicamente o sea obvio en el contexto, como se usa en el presente documento, el término "excipiente" se refiere a un excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "tratar" se refiere a administrar una terapia en una cantidad, manera o modo efectivo para mejorar una afección, un síntoma o parámetro asociado con una enfermedad o con un trastorno.

El término "prevenir" se refiere a impedir que un paciente contraiga un trastorno, hacer que un paciente permanezca libre de un trastorno durante un período de tiempo más largo, o detener la progresión de un trastorno, o bien hasta un grado estadísticamente significativo, o hasta un grado detectable para el experto en la técnica.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a aquella cantidad de un ingrediente activo (por ejemplo, LACE o sus derivados), que logra la prevención o el retraso de la aparición, o el alivio de los síntomas, de una enfermedad o un trastorno ocular (por ejemplo, presbicia) en un sujeto, o la obtención de un resultado biológico deseado, como una amplitud acomodativa mejorada u otro parámetro adecuado que indique el estado de la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término "estabilidad en almacenamiento" o "estable en almacenamiento" se entiende como un carácter o una caracterización de una composición o de un ingrediente activo (por ejemplo, LACE o sus derivados) que permanece sustancialmente sin cambios durante el almacenamiento. Se conocen métodos para determinar dicha estabilidad en almacenamiento; por ejemplo, la estabilidad en almacenamiento puede medirse por HPLC para determinar el porcentaje de la composición o del ingrediente activo (por ejemplo, éster de colina de ácido lipoico) que permanece o que ha sido degradado en una formulación después del almacenamiento de la formulación durante un cierto período de tiempo.

Por ejemplo, la composición farmacéutica estable al almacenamiento puede referirse a una composición, que después de almacenarse según el estándar farmacéutico (ICH), tiene por lo menos el 90% (por ejemplo, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más del 99%) del ingrediente activo (por ejemplo, éster de colina del ácido lipoico) presente en la composición, según se mide por HPLC.

Como se usa en este documento, el término "tiempo de retención relativo" o "RRT" de un compuesto se puede calcular utilizando la ecuación "RRT = $(t_2 – t_0)/(t_1 – t_0)$", donde t_0 = tiempo vacío, t_1 = tiempo de retención del éster de colina del ácido lipoico, y t_2 = tiempo de retención del compuesto, medido por HPLC.

El término "sujeto" como se usa en el presente documento generalmente se refiere a un animal (por ejemplo, una mascota) o un ser humano, incluido un humano sano o un paciente con ciertas enfermedades o trastornos (por ejemplo, presbicia).

COMPOSICIONES DE LACE Y FORMAS DE REALIZACIÓN

Como se describe en el presente documento, la invención propuesta proporciona formas de realización de composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de éster de colina del ácido lipoico, excipientes, tampones y condiciones que son compatibles, y métodos y procesos que producen soluciones biocompatibles (no irritantes) y estables adecuadas como gotas oculares oftálmicas.

La concentración de éster de colina del ácido lipoico o sus derivados en la composición farmacéutica puede ser cualquier concentración de 0,01–0,1%, 0,1% a 10% (por ejemplo, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados), en peso de la composición. En algunas formas de realización, la concentración del éster de colina del ácido lipoico en la composición farmacéutica es del 1%. En algunas formas de realización, la concentración del éster de colina del ácido lipoico en la composición farmacéutica es del 3%. En algunas formas de realización, la concentración del éster de colina del ácido lipoico en la composición farmacéutica es del 4%. El rango preferido de LACE en la composición es 1–3%. Dentro de este rango, el rango de composición preferido es 1,5–5%. La forma de sal de LACE puede ser yoduro o

cloruro.

En otra forma de realización, las composiciones eficaces en la invención propuesta son formulaciones acuosas que contienen LACE (cloruro o yoduro), y alanina, donde la alanina está en concentraciones entre 0,1–0,5%, 0,5% –1%, 1% –1,5%, 1,5%–3%, 1,5–5%. Dentro de este rango, la composición preferida es alanina al 0,5% y LACE al 1,5%. Otra forma de realización preferida es 0,5% de alanina y 1,5–4% de yoduro de LACE o cloruro de LACE.

En una forma de realización preferida, la forma eficaz de la sal de LACE y la composición que contiene alanina contiene cloruro de benzalconio como conservante en concentraciones entre 30–150 ppm.

En otra forma de realización, la forma eficaz de sal de LACE y la composición del producto farmacológico que contiene alanina no contiene conservante.

En otra forma de realización, otros conservantes tales como policuartenio, polihexametileno Biguanida (PHMB), Sofzia se incluyen en la formulación acuosa de LACE como conservantes en concentraciones aprobadas por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) para uso humano. Otros conservantes pueden ser 2–fenil etanol, ácido bórico, edetato disódico.

Debido a que las soluciones micelares autoensambladas de sal de LACE disuelta en agua en altas concentraciones pueden demostrar alguna irritación, un método para producir soluciones biocompatibles puede ser la encapsulación en liposomas. En este caso, LACE estará contenido en el interior de los liposomas. Los liposomas son generalmente biocompatibles con la superficie ocular. En otro ejemplo, la sal de LACE se encapsula formando complejos con una ciclodextrina, tal como la ciclodextrina de sulfobutiléter o la ciclodextrina de hidroxipropil beta.

En otra forma de realización, la composición farmacéutica tiene glicerol en concentraciones de 0,1%–10%. En una forma de realización preferida, la composición tiene una concentración de glicerol de 0,1–5%.

En algunas formas de realización, el conservante es cloruro de benzalconio, y la fuente de energía bioquímica es alanina. En algunas formas de realización, el éster

de colina del ácido lipoico tiene un contraión seleccionado del grupo que consiste en cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, metanosulfonato, nitrato, maleato, acetato, citrato, fumarato, hidrógeno fumarato, tartrato (por ejemplo, (+)–tartrato, (–)–tartrato, o una mezcla de los anteriores), bitartrato, succinato, benzoato y aniones de un aminoácido tal como ácido glutámico.

El agente tampón adecuado puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica que pueden lograr un pH deseado (por ejemplo, descripto en el presente documento) para la composición farmacéutica. Los ejemplos no limitativos incluyen tampones de fosfato (por ejemplo, monohidrato monobásico de fosfato de sodio, fosfato de sodio dibásico anhidro), tampón de acetato, tampón de citrato, tampones de borato y HBSS (solución salina equilibrada de Hank). Las cantidades adecuadas de un agente tampón pueden calcularse fácilmente sobre la base de un pH deseado. En cualquiera de las formas de realización descriptas en el presente documento, el agente tampón está en una cantidad que es aceptable como un producto oftálmico. Sin embargo, en algunas formas de realización, la composición farmacéutica no incluye un agente tampón. En algunas formas de realización, el pH de la solución acuosa o de la composición farmacéutica final se ajusta con un ácido (por ejemplo, ácido clorhídrico) o una base (por ejemplo, hidróxido de sodio) al rango de pH deseado (por ejemplo, como se describe aquí).

En otras formas de realización, el sistema de tampón podría seleccionarse de tampones de borato, tampones de fosfato, tampones de calcio y combinaciones y mezclas de los anteriores. En la forma de realización preferida, el tampón es un tampón de aminoácido. En otra forma de realización preferida, el tampón de aminoácido comprende alanina.

En algunas formas de realización, el éster de colina del ácido lipoico tiene un contraión seleccionado del grupo que consiste en cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, metanosulfonato, nitrato, maleato, acetato, citrato, fumarato, hidrógeno fumarato, tartrato (por ejemplo, (+)–tartrato, (–)–tartrato, o una mezcla de los anteriores), succinato, benzoato y aniones de un aminoácido tal como el ácido glutámico. Otros

contraiones son el estearato, el propionato y el furoato.

En algunas formas de realización, la formulación oftálmica tiene un pH de 4 a 8. En algunas formas de realización, la formulación oftálmica tiene un pH de 4,5. En algunas formas de realización, la formulación oftálmica comprende por lo menos un ingrediente seleccionado del grupo que consiste en una fuente de energía bioquímicamente aceptable, un conservante, un agente tampón, un agente para la tonicidad, un surfactante, un agente modificador de la viscosidad y un antioxidante.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica contiene un antioxidante. En algunas formas de realización preferidas, el antioxidante comprende ascorbato. En otra forma de realización preferida, el antioxidante contiene glutatión. El antioxidante adecuado puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos incluyen ácido ascórbico, estearato de ácido L–ascórbico, alfatioglicerol, ácido etilendiaminatetraacético, ácido eritórbico, clorhidrato de cisteína, N–acetilcisteína, L–carnitina, ácido cítrico, acetato de tocoferol, dicloroisocianurato de potasio, dibutilhidroxitolueno, 2,6–di– t–butil–4–metilfenol, lecitina de soja, tioglicolato de sodio, tiomalato de sodio, vitamina E natural, tocoferol, pastiminato de ascorbilo, pirosulfito de sodio, butilhidroxianisol, 1,3–butilenglicol, pentaeritritil tetrakis [3–(3,5–di–t–butil–4–hidroxifenil)]propionato, galato de propilo, 2–mercaptobencimidazol y sulfato de oxiquinolina. La cantidad adecuada de antioxidante puede estar en el rango de 0,1% a 5% (por ejemplo, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En cualquiera de las formas de realización descriptas en el presente documento, el antioxidante está en una cantidad que es oftálmicamente aceptable.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se prepara mediante la combinación en un entorno inerte, tal como nitrógeno de alta pureza o argón. En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica se combina en un entorno de nitrógeno con menos de 2 ppm de oxígeno.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se prepara por

combinación a temperaturas entre 20–25ºC.

En una forma de realización preferida, la molécula sólida de LACE se tritura hasta un polvo fino. Preferiblemente, la molécula sólida de LACE se tritura hasta un polvo sin aglomeraciones. En una forma de realización, el tamaño de partícula será inferior a 500 micrones. En otra forma de realización preferida, el tamaño de partícula será inferior a 100 micrones.

En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica se prepara mediante la desaireación inicial de la solución acuosa mantenida a temperatura ambiente (20–25ºC), luego, la disolución de los excipientes en la solución, seguido de la adición lenta de LACE sólido en partes bajo una disolución vigorosa bajo rociado lento de nitrógeno.

En una forma de realización, la composición farmacéutica se agita vigorosamente durante 4 horas a 24 horas. En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica se agita vigorosamente de 4 a 8 horas. En otra forma de realización preferida, la composición farmacéutica se agita vigorosamente durante 8 horas.

La composición farmacéutica preparada por cualquiera de los métodos puede tener una estabilidad en almacenamiento de por lo menos 3 meses (por ejemplo, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año o más de 1 año).

La composición farmacéutica también puede tener perfiles favorables de degradante relacionado con el fármaco (por ejemplo, impurezas totales relacionadas con el fármaco, o la cantidad de una impureza relacionada con el fármaco específico) después del almacenamiento a 5ºC durante un cierto período de tiempo. Se conocen herramientas analíticas (por ejemplo, HPLC) para medir la cantidad de degradante relacionado con el fármaco en una formulación.

Una fuente de energía bioquímicamente aceptable adecuada puede ser cualquiera de las conocidas en la técnica. Por ejemplo, la fuente de energía bioquímicamente aceptable puede ser cualquiera de las que pueden facilitar la reducción al participar como un intermediario de las vías metabólicas de energía, en particular, la vía metabólica de la glucosa. Ejemplos no limitativos de fuentes de energía

bioquímicamente aceptables adecuadas incluye aminoácidos o sus derivados (por ejemplo, alanina, glicina, valina, leucina, isoleucina, 2–oxoglutarato, glutamato y glutamina, etc.), un azúcar o sus metabolitos (por ejemplo, glucosa, glucosa–6–fosfato (G6P)), piruvato (p. ej., piruvato de etilo), lactosa, lactato o sus derivados), un lípido (p. ej., un ácido graso o sus derivados, como mono–, di– y tri–glicéridos y fosfolípidos), y otros (por ejemplo, NADH). La cantidad adecuada de una fuente de energía bioquímicamente aceptable puede estar en el rango de 0,01% a 5% (por ejemplo, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En algunas formas de realización, la fuente de energía bioquímica es piruvato de etilo. En algunas formas de realización, la fuente de energía bioquímica es alanina. En algunas formas de realización, la cantidad de piruvato de etilo o alanina está en el rango de 0,05% a 5% (por ejemplo, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%), o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En algunas formas de realización, la cantidad de alanina es del 0,5% en peso de la composición. En cualquiera de las formas de realización descriptas en el presente documento, la fuente de energía bioquímicamente aceptable está en una cantidad que es oftálmicamente aceptable.

Los conservantes adecuados pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos incluyen cloruro de benzalconio (BAC), cetrimonio, clorobutanol, edetato disódico (EDTA), policuaternio–1 (Polyquad®), polihexametileno biguanida (PHMB), complejo de oxicloro estabilizado (PURITE®), perborato de sodio y Sofzia®. La cantidad adecuada de un conservante en la composición farmacéutica puede estar en el rango de 0,005% a 0,1% (por ejemplo, 0,005, 0,01, 0,02%, 0,05%, 0,1%, o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En algunas formas de realización, el conservante es cloruro de benzalconio. En algunas formas de realización, el cloruro de benzalconio está en una cantidad de 0,003% a 0,1% (por ejemplo, 0,003, 0,01, 0,02%, 0,05%, 0,1%, o cualquier rango sobre la base de estos

estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En algunas formas de realización, el cloruro de benzalconio está en la cantidad de 0,01% en peso de la composición. En cualquiera de las formas de realización descriptas en el presente documento, el conservante está en una cantidad que es oftálmicamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está libre de conservante.

Los agentes para la tonicidad adecuados pueden ser cualquiera de los conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol, dextrosa, glicerol, propilenglicol y sus mezclas. La cantidad adecuada de agente para la tonicidad en la composición farmacéutica es cualquier cantidad que pueda lograr una osmolalidad de 200–460 mOsm (por ejemplo, 260–360 mOsm, o 260–320 mOsm). En algunas formas de realización, la composición farmacéutica es una composición isotónica. En algunas formas de realización, la cantidad de agente para la tonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio) es de 0,1% a 5% (por ejemplo, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En cualquiera de las formas de realización descriptas en el presente documento, el agente para la tonicidad está en una cantidad que es oftálmicamente aceptable.

El surfactante adecuado puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica, que incluyen los surfactantes iónicos y surfactantes no iónicos. Ejemplos no limitativos de surfactantes no iónicos útiles incluyen ésteres grasos de polioxietileno (por ejemplo, polisorbato 80 [poli(oxietileno)sorbitano monooleato], polisorbato 60 [poli(oxietileno)sorbitano monoestearato], polisorbato 40 [poli(oxietileno)sorbitano monopalmitato], poli(oxietileno)sorbitano monolaurato, poli(oxietileno)sorbitano trioleato, o polisorbato 65 [poli(oxietileno)sorbitano triestearato]), aceites de ricino hidrogenados de polioxietileno (por ejemplo, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 50, o aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 60), polioxietileno polioxipropileno glicoles (por ejemplo, polioxietileno (160)

polioxipropileno (30) glicol [Pluronic F681], polioxietileno (42) polioxipropileno (67) glicol [Pluronic P123], polioxietileno (54) polioxipropileno (39) glicol [Pluronic P85], polioxietileno (196) polioxipropileno (67) glicol [Pluronic F1271], o polioxietileno (20) polioxipropileno (20) glicol [Pluronic L–441]), polioxil 40 estearato, ésteres grasos de sacarosa, y una de sus combinaciones. En algunas formas de realización, el surfactante es polisorbato 80. La cantidad adecuada de surfactante en la composición farmacéutica puede estar en el rango de 0,01% a 5% (por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En algunas formas de realización, el surfactante es polisorbato 80, y la cantidad de polisorbato 80 está en el rango de 0,05% a 5% (por ejemplo, 0,05, 0,1, 0,2%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En algunas formas de realización, la cantidad de polisorbato 80 es 0,5% en peso de la composición. En cualquiera de las formas de realización que se describen en la presente solicitud el surfactante se presenta en una cantidad que es oftálmicamente aceptable. Sin embargo, en algunas formas de realización, la composición farmacéutica está libre de surfactante.

El agente modificador de la viscosidad adecuado puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica. Ejemplos no limitativos incluyen geles de carbopol, agentes celulósicos (por ejemplo, hidroxipropil metilcelulosa), policarbófilo, polivinil alcohol, dextrano, gelatina, glicerol, polietilenglicol, poloxámero 407, polivinil alcohol y polivinil pirrolidona y sus mezclas. La cantidad adecuada de agente modificador de la viscosidad puede encontrarse en el rango de 0,1% a 5% (por ejemplo, 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, o cualquier rango sobre la base de estos valores numéricos especificados) en peso de la composición. En cualquiera de las formas de realización que se describen en esta solicitud, el agente modificador de la viscosidad se presenta en una cantidad que es oftálmicamente aceptable. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica está libre de un agente modificador de la viscosidad (por ejemplo, un agente modificador de la viscosidad polimérico tal como

hidroxipropil metilcelulosa).

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se caracteriza por uno o más de los siguientes:

(a) tener una concentración de la sal de éster de colina de ácido lipoico de 0,1% a 10% (por ejemplo, 0,1%, 1,0%, 1,5%, 3%, 4%, 5%, o cualquier rango entre los valores numéricos especificados) en peso de la composición;

(b) tener una concentración de un conservante (por ejemplo, cloruro de benzalconio) de 0,003% a 0,1% (por ejemplo, 0,01%) en peso de la composición;

(c) tener una fuente de energía bioquímica (por ejemplo, alanina) de 0,1% a 5% (por ejemplo, 0,5%) en peso de la composición; y

(d) tener una concentración de glicerol de 0,5% a 5% (por ejemplo, 2,7%) en peso de la composición;

(e) tener una concentración de hidroxipropil beta ciclodextrina de 1% a 20% en peso de la composición;

(f) tener una concentración de hidroxipropil metil celulosa (HPMC) de 0,1–0,5% en peso de la composición.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica consiste esencialmente en 1–3% en peso de glicerol, 0,5% en peso de alanina, 0,005–0,01% en peso de cloruro de benzalconio, 1–3% en peso de éster de colina de ácido lipoico, y agua, donde el pH de la composición farmacéutica es 4,3 a 4,7.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica consiste esencialmente en 1–3% en peos de glicerol, 0,5% en peso de alanina, 1–30% de hidroxipropil beta ciclodextrina, 0,005–0,01% en peso de cloruro de benzalconio, 1–3% en peso de una sal farmacéutica de éster de colina de ácido lipoico, y agua, donde el pH de la composición farmacéutica es 4,3 a 4,7.

En otra forma de realización, la forma de sal farmacéutica de éster de colina de ácido lipoico es un cloruro.

En otra forma de realización, la forma de sal farmacéutica de éster de colina de ácido lipoico es un yoduro.

En otra forma de realización, la forma de sal farmacéutica de éster de colina de ácido lipoico se encuentra en el grupo, sin limitación, de cloruro, bromuro, yoduro, mesilato, fosfato, tosilato, estearato, metanosulfonato.

En otra forma de realización, el agente mejorador de la viscosidad es metil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona.

En una forma de realización preferida, el agente mejorador de la viscosidad preferido es hidroxipropil metil celulosa en concentraciones de 0,1–0,5%.

En otra forma de realización, se agrega un antioxidante a fin de estabilizar LACE.

Los antioxidantes adecuados pueden ser ascorbatos, glutatión, histidina, metionina, cisteína.

En otra forma de realización, el pH de la composición es entre 4 y 5.

En una forma de realización, la composición oftálmica se dosifica a cada ojo del sujeto una vez por día, dos veces por día, tres veces por día y cuatro veces por día.

En algunas formas de realización, la invención también proporciona un sistema para almacenar una composición farmacéutica que comprende un ingrediente activo en una solución acuosa, donde el ingrediente activo (por ejemplo, éster de colina de ácido lipoico o sus derivados) es susceptible de hidrólisis en la solución acuosa. En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica se almacena en un frasco con gotero oftálmico de LDPE, se cubre con nitrógeno durante el proceso de llenado, se tapa, luego se empaqueta en una bolsa secundaria Mylar, impermeable al gas que contiene un absorbente de oxígeno.

En otra forma de realización, el frasco o la unidad con gotero es de tereftalato de polietileno (PET, conforme a sus siglas en inglés). En otra forma de realización, el frasco con gotero está construido de un material que tiene una baja permeabilidad al gas.

En otra forma de realización, el frasco o la unidad con gotero es una botella oftálmica de vidrio con una punta de gotero de polipropileno para dispensar en el ojo.

En otra forma de realización, el frasco con gotero puede construirse de cualquier material que tenga una baja permeabilidad al gas. En otra forma de realización, el

frasco con gotero puede ser una dosis unitaria, llenada por técnicas de sellado de relleno por soplado.

En una forma de realización, la composición farmacéutica se almacena a 2–5ºC, durante un período de 3 meses a 2 años.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Las composiciones farmacéuticas que comprenden éster de colina de ácido lipoico o sus derivados (por ejemplo, como se describe en el presente documento) pueden emplearse en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con el daño oxidativo. Se conocen enfermedades o trastornos asociados al daño oxidativo.

En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para tratar una enfermedad ocular en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar a un ojo del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones farmacéuticas descriptas en este documento.

En algunas formas de realización, las enfermedades oculares son presbicia, ojo seco, cataratas, degeneración macular (incluida la degeneración macular relacionada con la edad), retinopatías (incluida la retinopatía diabética), glaucoma o inflamaciones oculares. En algunas formas de realización, la enfermedad ocular es presbicia.

La cantidad adecuada de composiciones farmacéuticas para los métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad ocular en este documento puede ser cualquier cantidad terapéuticamente eficaz. En algunas formas de realización, el método comprende administrar al ojo del sujeto una cantidad de la composición farmacéutica efectiva para aumentar la amplitud acomodativa del cristalino en por lo menos 0,1 dioptrías (D) (por ejemplo, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,2, 1,5, 1,8, 2, 2,5, 3 o 5 dioptrías). En algunas formas de realización, el método comprende administrar al ojo del sujeto 1–5 gotas (alrededor de 40 uL por gota) de la composición farmacéutica. En algunas formas de realización, el ojo del sujeto se trata con la composición farmacéutica 1, 2, 3, 4, 5 o más de 5 veces por día, cada vez, con 1–5 gotas

(alrededor de 40 µL por gota). En algunas formas de realización, el cristalino o el ojo del sujeto se trata con la composición farmacéutica con 1, 2, 3, 4, 5 o más de 5 gotas cada vez. En algunas formas de realización, el ojo del sujeto se trata con la composición farmacéutica de la presente invención dos o tres veces por día, cada vez, con 1 o 2 gotas (alrededor de 40 uL por gota).

Los métodos incluyen métodos preventivos que pueden realizarse en pacientes de cualquier edad. Los métodos también incluyen métodos terapéuticos que se pueden realizar en pacientes de cualquier edad, en particular, en pacientes que tienen entre 20 y 75 años de edad.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no limitan el alcance de las formas de realización reivindicadas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Estructura química y propiedades generales del cloruro de éster de colina de ácido lipoico (LACE)

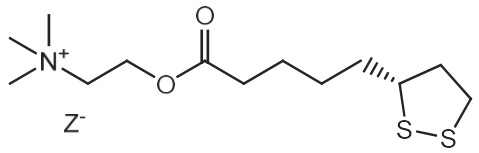

Tabla 1:

Propiedades generales del cloruro de éster de colina de ácido lipoico (LACE)

Apariencia:	
Perfil de solubilidad:	>50 mg/mL en agua > 4 mg/mL en acetonitrilo
pH solución	7–7,5
P Log	<2
Rotación específica:	70,3°

Rotación óptica:	0,338 a 25°C a 0,005 g/mL en acetonitrilo
Propiedades espectrales	UV A_{max} 333 nm
Higroscopicidad:	Altamente higroscópico
Cristalinidad:	Transición de fusión cristalina aguda no observada, mayormente amorfo
Polimorfos:	No se conocen en este momento
Tamaño de partícula:	D_{50}: 100–200 mm
Rango fusión/ebullición:	Transición térmica observada a 230–235ºC

Ejemplo 2

Cinética de las especies micelares correlacionadas con la duración de la mezcla de soluciones de proceso de cloruro de LACE

Los experimentos descriptos en esta sección demuestran que las especies micelares de cloruro de LACE se estabilizan y disminuyen con los tiempos de mezcla prolongados a 25ºC. Los resultados demostraron que la naturaleza reversible de estas especies es característica de los sistemas autoensamblados, como las micelas y los agregados micelares.

Las especies micelares formadas por autoensamblaje espontáneo de moléculas son impulsadas por la energía libre total del sistema equilibrado. El experimento demostró la cinética del logro de ese estado equilibrado con duraciones más largas de mezcla.

Objetivos:

o Establecer el intervalo de tiempo de proceso estableciendo si el crecimiento de las especies micelares se ha estabilizado.

o Establecer el "tiempo de mantenimiento":

Procedimiento:

o Dos lotes de 200 g de cloruro de LACE al 1,5% se prepararon a 25°C después de que el vehículo se desoxigenó con nitrógeno burbujeado. El nitrógeno se burbujeó continuamente durante la disolución de LACE.

o Se preparó un lote utilizando GMP Lote # 2 (G2-14LAC) tal como está, con aglomeraciones significativas; el otro se preparó usando una muestra de G2-14LAC que se había molido a un polvo fino con un mortero y pistadero.

o Después de la disolución de LACE y del ajuste de pH, los lotes se agitaron durante 24 horas con una capa constante de nitrógeno, manteniendo el oxígeno disuelto en ~ 1,6 ppm (frente a 8,2 ppm de solubilidad saturada). En puntos temporales de 1 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 9 h y 24 h, se retiraron alrededor de 5-15 ml con una jeringa y se filtraron en forma estéril en frascos con gotero (5 ml/frasco), sin recubrimiento de nitrógeno en el frasco (el aparato estaba en uso para los lotes a granel).

o Las muestras de todos los puntos de tiempo se diluyeron a 10 mg/g, y luego se inyectaron para el análisis de RP-HPLC con detección de ELSD dentro de los 30 minutos de la eliminación de la solución a granel.

o Después del punto de tiempo de 24 horas, las soluciones a granel se filtraron en forma estéril, y cada una se dividió en dos porciones de ~ 50 ml, una mantenida a 5°C, y la otra porción de 50 ml mantenida a 25°C. Todas las porciones se cubrieron con nitrógeno soplado en el recipiente.

o Al final del tiempo adicional de mantenimiento de 24 horas, se llenó con cada porción frascos con gotero con una capa de nitrógeno en el frasco.

<u>Observaciones sobre la disolución.</u>

o La porción aglomerada de G2-14LAC se añadió a la formulación KW-LACE-01-86-1 durante alrededor de 5 minutos, y algunas de las aglomeraciones necesitaron otros 20 minutos para disolverse.

o El polvo G2-14LAC se añadió a la formulación KW-LACE-01-86-2 durante alrededor de 15 minutos, porque cada espátula formó agregado a modo de una balsa delgada de material flotando sobre la superficie, que no se dispersó de inmediato. Por lo tanto, no se añadió otra porción hasta que las porciones anteriores fueran atraídas al

vórtice. El tiempo estimado para que una porción se disolviera fue de alrededor de 10 minutos, y el proceso completo llevó alrededor de 25 minutos.

Resultados.

o Un pico a RT = 8 minutos (correlacionado con la especie micelar) fue evidente en ambas formulaciones desde el primer punto de tiempo tomado.

o No hubo diferencias consistentes entre los dos lotes en el % de área del pico de los 8 min (especie micelar), aunque el segundo lote, preparado con cloruro de LACE en polvo, tuvo niveles más altos de la especie micelar en algunos puntos temporales.

o El % de área del pico de los 8 min se redujo significativamente a las 24 horas, como se muestra en la tabla a continuación.

o El pH final fue de 4,54, para ambos lotes.

Tabla 2:

Cinética de la formación y desaglomeración de especies micelares de LACE con mezcla extensa de cloruro de LACE

	Área porcentual de RT = 8 min pico amplio (LACE especie micelar)	
	Área total de LACE y picos relacionados (los resultados son para la 1ra inyección del vial de HPLC, a menos que se observe lo contrario)	
	KW–LACE–01–86–**1**	KW–LACE–01–86–**2**
	1,5% LACE, preparado a partir de G2–14LAC con aglomeraciones	1,5% LACE, preparado a partir de G2–14LAC molido
Tiempo de mezcla (horas)	% especie micelar a 8 minutos	% especie micelar a 8 minutos
1 hora	0,30%	0,63%
2 horas	0,51%	0,56%
3 horas	0,56%	0,67%
4 horas	0,50%	0,44%
6 horas	0,64%	0,70%
8 horas	0,47%	0,44%
9 horas	0,42%	0,44%
24 horas	0,07%	0,17%
48 h (5°C mantenim.)	No detectado	0,09%

48 h (25°C mantenim.)	No detectado	No detectado

Los resultados demuestran que las especies micelares de cloruro de LACE a 8,1 minutos se minimizan con los tiempos de mezcla extendidos. El pico a 8,1 minutos disminuye drásticamente con los tiempos de mezcla más largos.

Cada una de las soluciones también se midió para establecer los degradantes de éster de colina de ácido lipoico. Como se menciona anteriormente, el mecanismo de degradación de LACE es oxidativo e hidrolítico, lo que produce una especie oxidada e hidrolizada.

Tabla 3:

Análisis de impurezas (sustancias relacionadas) de solución oftálmica EV06 como una función de la mezcla

KW–LACE–01–86–1: G2–14LAC con aglomeraciones	Punto de tiempo	1 hora	3 horas	4 horas	6 horas	8 horas	9 horas
Compuestos relacionados	Especificación	RRT 0.50 0.28%	RRT 0.50 0.37%	RRT 0.50 0.38%	RRT 0.50 0.43%	RRT 0.50 0.47%	RRT 0.50 0.49%
		RRT 0.54 0.14%	RRT 0.54 0.16%	RRT 0.54 0.16%	RRT 0.54 0.17%	RRT 0.54 0.17%	RRT 0.54 0.18%
	Individual:	RRT 0.57 0.16%	RRT 0.57 0.18%	RRT 0.57 0.18%	RRT 0.57 0.19%	RRT 0.57 0.20%	RRT 0.57 0.20%
	Informe *2:* 0.1%	Ácido lipoico 0.02%	Ácido lipoico 0.03%	Ácido lipoico 0.03%	Ácido lipoico 0.03%	Ácido lipoico 0.03%	Ácido lipoico 0.03%
	(% Área)	RRT 1.61 0.17%	RRT 1.61 0.17%	RRT 1.61 0.16%	RRT 1.61 0.16%	RRT 1.61 0.16%	RRT 1.61 0.16%
	Total: Informe	**Total 0.77%**	**Total 0.91%**	**Total 0.91%**	**Total 0.98%**	**Total 1.02%**	**Total 1.05%**

KW–LACE–01–86–1: G2–14LAC con aglomeraciones	Punto de tiempo	24 horas	48 horas 5°C mantenim. luego de primeras 24 h	48 horas 25°C mantenim. luego de primeras 24 h
Compuestos relacionados	Especificación	RRT 0.50 0.65%	RRT 0.50 0.68%	RRT 0.50 0.89%
		RRT 0.54 0.20%	RRT 0.54 0.17%	RRT 0.54 0.21%
	Individual:	RRT 0.57 0.25%	RRT 0.57 0.20%	RRT 0.57 0.27%
	Informe *2:* 0.1%	Ácido lipoico 0.04%	Ácido lipoico 0.05%	Ácido lipoico 0.06%
	(% Área)	RRT 1.61 0.16%	RRT 1.61 0.17%	RRT 1.61 0.20%
	Total: Informe	**Total 1.31%**	**Total 1.27%**	**Total 1.61%**

Los datos muestran que los productos de degradación de LACE aumentan con el tiempo de mezcla extendido. Por lo tanto, las condiciones finales del proceso para la composición de la solución oftálmica EV06 implicaron un máximo de 8 horas para lograr una solución no irritante con degradantes minimizados.

Un experimento de mezcla similar realizado con yoduro de LACE no produjo una solución que tuviera una agregación mínima. De hecho, en el caso del yoduro de LACE, las especies agregadas fueron tan altas como del 39% del API al final de las 8 horas de mezcla.

Ejemplo 3

Correlación de la temperatura de mezcla con la presencia de especies de cloruro de LACE micelares

Los datos mostrados en la FIGURA 4 son de una solución de cloruro de LACE formulada en condiciones bajo argón y refrigeradas. La solución fue extremadamente irritante para la superficie ocular. El porcentaje de especies micelares fue de 8-10% del pico de API LACE principal (especies micelares indicadas por flecha, en el tiempo de retención de 7,9-8,1 minutos), una concentración que normalmente no se observa en soluciones mezcladas a temperatura ambiente.

Ejemplo 4

Correlación de las aglomeraciones con la formación de especies de LACE micelares

La FIGURA 5A es un cromatograma de RP-HPLC de solución oftálmica EV06 preparada a partir de un lote de cloruro de LACE que tenía "aglomeraciones" sólidas. La solución preparada a partir de este lote de API (ingrediente farmacéutico activo, sustancia de fármaco sólido LACE) mostró un mayor porcentaje (10-15%) de las especies micelares de LACE (mostradas con una flecha) que las soluciones preparadas a partir de un lote de API en polvo (FIGURA 5B).

Por lo tanto, aunque ambas soluciones parecían completamente disueltas, la solución formulada a partir de API no aglomerado tenía una menor concentración de especies micelares de LACE (ver Figura 5B). Cuando se correlaciona con la irritación ocular, la solución mostrada en la Figura 5A tuvo mayores puntajes para la irritación en un modelo de conejo. Esto llevó a la incorporación de procedimientos de desaglomeración para producir material en polvo, antes de la composición.

Ejemplo 5

Estudios de compatibilidad de excipientes con LACE

SÍNTESIS

El propósito de estos experimentos fue descubrir posibles variables desestabilizadoras en la formulación, a través de variaciones sistemáticas en la composición de la formulación y el microentorno (como el pH). El ácido lipoico y

cualquier derivado del ácido lipoico estarían sujetos a degradación y polimerización en calor, luz y oxígeno, lo que provocaría la apertura del anillo de ditiolano. Por lo tanto, la presencia de excipientes que pueden inducir la escisión de radicales libres oxidativos podría ser un factor desestabilizador. Las cuadrículas de formulación 1 y 2 investigaron sistemáticamente el efecto de los excipientes ya presentes en la formulación como posibles factores desestabilizadores.

La composición de formulación para LACE en estos experimentos contiene la sustancia farmacológica, alanina, glicerol, cloruro de benzalconio en agua purificada, en hidróxido de sodio 1 N o ácido clorhídrico 1 N agregado para lograr un pH entre 4,4-4,6 y una osmolalidad de 290-300 mOsm/kg. Los experimentos descriptos en este documento fueron estudios de compatibilidad para identificar excipientes que podrían estabilizar las soluciones oftálmicas de LACE.

La Cuadrícula de formulación # 1 evaluó las siguientes variables dadas en (a)-(e). Las formulaciones se prepararon en una caja de guantes inundada con nitrógeno y se filtraron en forma estéril. Todas las formulaciones se evaluaron en condiciones aceleradas a 57ºC y se evaluaron por HPLC para el ensayo y las impurezas a T = 0, 3,5 días y 7 días. Un total de 19 formulaciones fueron probadas en la Cuadrícula # 1.

(a) **Efecto del pH:** las formulaciones se prepararon a pH 3,5, 4 y 5, y se compararon con la formulación de control a pH 4,5. Como se muestra en la FIGURA 6, la tasa de degradación de LACE fue equivalente en todos los niveles de pH en el rango de 3,5-5.

(b) **Efecto de alanina:** El rol de la alanina en la formulación se dedujo mediante la comparación de las tasas de degradación con la formulación original (control). Como se muestra en la FIGURA 6, la ausencia de alanina parece acelerar la tasa de degradación de LACE. Por lo tanto, la alanina es un excipiente crítico en las formulaciones oftálmicas EV06.

(c) **Efecto del cloruro de benzalconio y glicerol:** se planteó la hipótesis de que los peróxidos contenidos en el glicerol podían catalizar la oxidación; de manera similar, se planteó la hipótesis de que BAK podría desestabilizar la sustancia de fármaco,

debido a la escisión de radicales libres y la posterior oxidación. Como se ve en la FIGURA 7, la formulación libre de cloruro de benzalconio fue sustancialmente más estable que el control. El prototipo libre de glicerol también fue más estable que el control. Además, el cloruro de sodio agregado a la formulación (en lugar de glicerol, para ajustar la osmolalidad) pareció tener un efecto desestabilizador (también mostrado en la FIGURA 7). En otro experimento con diversas combinaciones de glicerol, cloruro de sodio, sulfito y pH, donde todas las variaciones eran libres de cloruro de benzalconio, fue notable que todas las formulaciones libres de cloruro de benzalconio fueron más estables que el control (FIGURA 5). Los experimentos en las FIGURAS 7 y 9 demuestran que la eliminación del cloruro de benzalconio en LACE puede ser un método para estabilizar la formulación. Para composiciones oftálmicas EV06, la minimización del contenido de cloruro de benzalconio a 50 ppm puede tener un factor de estabilización importante. El cloruro de sodio demostró un efecto desestabilizador, por lo que el glicerol se consideró más adecuado como agente para la tonicidad en las composiciones finales EV06.

(d) **Efecto del sulfito:** se realizaron diversos experimentos con sulfito (FIGURA 8), con combinaciones de diversos niveles de sulfito. Se añadió sulfito a la formulación como un antioxidante (FIGURA 8), a diversos niveles de pH (4, 4,5) y concentraciones. La presencia de sulfito no pareció mejorar sustancialmente la estabilidad del LACE. No estuvo claro si se presentó un efecto perjudicial, ya que el 0,1% de sulfito en la formulación era equivalente al control.

(e) **Efecto del glicerol:** el efecto del glicerol se investigó en diversas combinaciones de formulaciones, mediante la eliminación sistemática del glicerol. Como se muestra en las FIGURAS 7 y 10, las combinaciones libres de glicerol parecieron ser más estables que el control. Sin embargo, debido al alto efecto desestabilizador del cloruro de sodio, se seleccionó el glicerol como el excipiente crítico para el ajuste de la tonicidad.

(f) **Efecto del tampón:** Se ensayaron diversas composiciones tamponadas. El tampón de acetato y el acetato + ácido bórico parecieron estabilizar la formulación.

EXPERIMENTOS.

a) Configuración del método de HPLC: el ensayo de HPLC consistió en un gradiente de fase móvil de 50 minutos compuesto por (A) 0,05 M de fosfato de sodio monobásico, 0,005 M de sal sódica de ácido 1-heptano sulfónico, 0,2% v/v de trietilamina, ajustado a pH 4,5 con ácido fosfórico; y (B) acetonitrilo. La columna analítica utilizada fue una YMC Pack ODS AQ (4,6 x 250 mm, 5 µm, 120 Å), P/N AQ125052546WT; la longitud de onda de detección analítica fue de 225 nm.

b) FORMULACIONES.

Las formulaciones se prepararon con mucho cuidado para asegurar que el API LACE no estuviera expuesto al oxígeno o al calor. El API se dividió en partes alícuotas en viales de vidrio limpios bajo una atmósfera inerte de N_2 dentro de la bolsa de guantes, y se almacenó envuelta en papel de aluminio en un congelador a -20°C hasta su uso. Las formulaciones se prepararon con excipientes de alta pureza y recipientes de vidrio estériles. Todos los excipientes se prepararon previamente en soluciones madre y se mezclaron antes de agregar el API y los ajustes finales de pH. Las formulaciones están tabuladas en el Apéndice A.

II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La FIGURA 6 es un gráfico del % de API frente al tiempo a 57ºC (sobre T = 0, 3,5 días y 7 días), que compara sistemáticamente las formulaciones que se prepararon a pH 3,5, 4, 4,5 (original), 5 y el control sin alanina. Incluso en T = 0, la formulación sin alanina se había degradado considerablemente en el contenido de API. Como se ve en la Figura 6, las formulaciones fueron equivalentes en estas condiciones a pH 3,5-5.

La FIGURA 7 es un gráfico de formulaciones que comparan las siguientes variables: (a) Control (original) frente al Control + 0,25% de cloruro de sodio, Control + 0,25% de cloruro de sodio sin glicerol, (b) Control (original) frente al control sin cloruro de benzalconio, (c) Control (original) frente a la formulación original sin glicerol.

Como se ve en la Figura 7, la adición de cloruro de sodio a la formulación original no estabilizó la formulación.

La FIGURA 8 muestra el efecto del sulfito sobre la estabilidad de LACE a 57°C. Las formulaciones que contenían sulfito se prepararon en concentraciones de sulfito al 0,05% y sulfito al 0,1% a pH 4 y 4,5. La adición de sulfito no estabilizó la formulación original.

La FIGURA 9 explora adicionalmente el efecto potencialmente estabilizador de la eliminación del cloruro de benzalconio. Las variaciones de formulación sin cloruro de benzalconio fueron superiores a la formulación original de control (pH 4,5). Las variaciones de la formulación fueron composiciones libres de BAC a pH 4, 4,5, sin glicerol/sin BAC + 0,9% de cloruro de sodio, sin BAC + 0,05% de sulfito a pH 4 y 4,5.

Las FIGURAS 7 y 10 comparan el efecto del glicerol, en diversas composiciones, como una función del pH, el sulfito y el cloruro de sodio. La formulación sin glicerol, sin BAC, en presencia de cloruro de sodio y sulfito y la formulación sin glicerina con BAC fueron superiores a la formulación original.

La FIGURA 11 exploró el uso de diversas composiciones tamponadas sobre la estabilidad de LACE. La formulación original (pH 4,5) se comparó con composiciones de tampón de acetato y borato a pH 7,5. El edetato de sodio agregado como un antioxidante no estabilizó la formulación. El tampón de acetato y el tampón de acetato más ácido bórico parecieron ser superiores a la formulación de control.

Para resumir, la eliminación de cloruro de benzalconio pareció mejorar la estabilidad de manera consistente. La eliminación del glicerol también puede ser un paso positivo. Se sabe que el glicerol tiene presencia residual de formaldehído que ocasionalmente conduce a la degradación del API. De manera interesante, la adición de edetato o sulfito no tuvo un efecto positivo. Otro antioxidante como el ascorbato de sodio puede tener un efecto positivo.

Tabla 4:

Formulaciones de experimentos de compatibilidad

Formulación # 1				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.1849	0.9253
Alanina	0.5	0.1	2.0254	0.5068
Glicerol	0.1	0.02	0.401	0.0996
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0378	0.0094
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	12.338	61.7409
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0815	0.0143
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	4.9149	24.5948
Total	100	20	19.9835	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4.5	4.55			

Formulación # 2				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.1977	0.9923
Alanina	0	0	0	0.0000
Glicerol	0.1	0.02	0.4009	0.0998
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0386	0.0097
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	14.4079	72.3176
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.1185	0.0209
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	4.7595	23.8894
Total	100	20	19.9231	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4.5	4.48			

Formulación # 3				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.1993	0.9935
Alanina	0.5	0.1	2.0227	0.5042
Glicerol	0.1	0.02	0.4031	0.0997
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0409	0.0102
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	12.414	61.8862
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0653	0.0114
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	4.9141	24.4977
Total	100	20	20.0594	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
3.5	3.59			
Formulación # 4				

Ingrediente	% p/p deseado	gramos necesarios	gramos usados	% p/p act.
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.2036	1.0357
Alanina	0.5	0.1	2.021	0.5141
Glicerol	0.1	0.02	0.4012	0.1013
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0402	0.0102
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	12.3097	62.6215
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0289	0.0052
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	4.6527	23.6691
Total	100	20	19.6573	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4	4.07			

Formulación # 5				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.2368	1.1813
Alanina	0.5	0.1	2.0239	0.5048
Glicerol	0.1	0.02	0.4016	0.0994
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.041	0.0102
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	12.3029	61.3746
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0129	0.0023
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	5.0265	25.0753
Total	100	20	20.0456	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
5	5.01			

Formulación # 6				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.2013	1.0040
Alanina	0.5	0.1	2.0216	0.5041
Cloruro de sodio	0.25	0.05	0.5282	0.2635
Glicerol	0.1	0.02	0.4025	0.0996
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.04	0.0100
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	11.8086	58.8963
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0208	0.0036
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	5.0268	25.0716
Total	100	20	20.0498	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4	4.01			

Formulación # 7				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.2004	0.9999
Alanina	0.5	0.1	2.0209	0.5042
Cloruro de sodio	0.9	0.18	1.8409	0.9186
Glicerol	0	0	0	0.0000
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0402	0.0100
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	10.9219	54.4961
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.009	0.0016
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	5.0083	24.9895
Total	100	20	20.0416	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4	4.12			

Formulación # 8				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.1956	0.9784
Alanina	0.5	0.1	2.022	0.5057
Sulfito de sodio	0.05	0.01	0.2068	0.0517
Glicerol	0.1	0.02	0.4005	0.0994
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0401	0.0100
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	12.16	60.8219
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.1008	0.5042
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	4.867	24.3438
Total	100	20	19.9928	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4	4.03			

Formulación # 9				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.2205	1.0953
Alanina	0.5	0.1	2.027	0.5035
Sulfito de sodio	0.05	0.01	0.2062	0.0512
Glicerol	0.1	0.02	0.3996	0.0985
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0392	0.0097
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	12.1982	60.5944
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0995	0.4943
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	4.9407	24.5429
Total	100	20	20.1309	100.0000
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4.5	4.03			

Formulación # 10				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.1973	0.9873
Alanina	0.5	0.1	2.0249	0.5066
Sulfito de sodio	0.1	0.02	0.4136	0.1035
Glicerol	0.1	0.02	0.4013	0.0996
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.041	0.0102
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	11.9708	59.9031
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.1921	0.9613
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.	4.7426	23.7325
Total	100	20	19.9836	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4.5	4.35			

Formulación # 11				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.2097	0.9746
Alanina	0.5	0.1	2.0437	0.4749
Cloruro de sodio	0.9	0.18	1.8022	0.8376
Sulfito de sodio	0.05	0.01	0.2116	0.0492
Glicerol	0	0	0	0.0000
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0384	0.0089
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	17.0628	79.3025
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.1477	0.0241
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.		
Total	100	20	21.5161	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
3.5	3.52			

Formulación # 12				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.1953	0.9703
Alanina	0.5	0.1	2.0402	0.5068
Cloruro de sodio	0.9	0.18	1.7998	0.8943
Sulfito de sodio	0.05	0.01	0.2135	0.0531
Glicerol	0	0	0	0.0000
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0423	0.0105
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	15.6996	78.0031
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.1362	0.0238
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.		
Total	100	20	20.1269	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4	4			

Formulación # 13				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.1997	0.9946
Alanina	0.5	0.1	2.0386	0.5077
Cloruro de sodio	0.9	0.18	1.8033	0.8982
Sulfito de sodio	0.05	0.01	0.2152	0.0536
Glicerol	0	0	0	0.0000
Cloruro de benzalconio	0.01	0.002	0.0397	0.0099
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	15.6858	78.1239
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0958	0.0168
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.		
Total	100	20	20.0781	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4.5	4.48			

Formulación # 14				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.1976	0.9873
Alanina	0.5	0.1	2.0425	0.5103
Glicerol	0.1	0.02	0.4158	0.1031
Cloruro de benzalconio	0	0	0	0.0000
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	17.3172	86.5237
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0413	0.0073
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.		
Total	100	20	20.0144	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4	4.05			

Formulación # 15				
Ingrediente	**% p/p deseado**	**gramos necesarios**	**gramos usados**	**% p/p act.**
Éster de colina de ácido lipoico (LACE)	1	0.2	0.215	1.0757
Alanina	0.5	0.1	2.0453	0.5117
Glicerol	0.1	0.02	0.4078	0.1012
Cloruro de benzalconio	0	0	0	0.0000
Agua ultrapura (1ra. adición)	75	15	17.2993	86.5545
1N NaOH	Usado para ajustar a pH deseado antes de adición de agua final		0.0192	0.0034
1N HCl				
Agua ultrapura (2da. adición)	c. s.	c. s.		
Total	100	20	19.9866	
pH deseado	**pH final**	**mOsm/L**		
4.5	4.52			

Ejemplo 6:

Correlación de la irritación ocular con el porcentaje de especies de LACE micelares

Las FIGURAS 12A y 12B proporcionan generalmente una instantánea de la correlación de la irritación con la especie de LACE micelar en una serie de lotes compuestos.

Ejemplo 7

Método de ajuste de osmolalidad con glicerol

o El rango de osmolalidad requerido para las formulaciones que contienen fármaco y placebo es de 280 a 320 mOsm/kg. Preferiblemente, todas las formulaciones de LACE deben estar dentro de 290–310 mOsm/Kg.

o Dado que LACE tiene contribuciones a la osmolalidad, cada formulación tendrá concentraciones variables de glicerol para lograr la osmolalidad requerida.

I. Síntesis: Composiciones finales ajustadas.

Tabla 4:

Composiciones finales de soluciones oftálmicas EV06 con concentraciones ajustadas de glicerol

Conc. LACE	Glicerol (%)	Alanina (%)	Cloruro de benzalconio (%)	Osmolalidad total real (mOsm/kg)
0%	2.07%	0.5%	0.005%	295
1%	1.56%	0.5%	0.005%	299
2%	1.07%	0.5%	0.005%	296
2.5%	0.80%	0.5%	0.005%	302
3.0%	0.53%	0.5%	0.005%	308

II. Detalle experimental:

A. Placebos que contienen glicerol.

Se preparó una serie de placebos. Todos los placebos y las soluciones que contienen LACE que se prepararon posteriormente contenían lo siguiente, con cantidades variables de glicerol:

• 0,5% (5 mg/g) de alanina

• 0,005% (0,05 mg/g) de cloruro de benzalconio

• Pequeñas cantidades de hidróxido de sodio 1 N, ácido clorhídrico 1 N, para ajustar el pH a 4,5

• Agua para inhalación (agregada para el peso final)

Tabla 5:

Placebo que contiene glicerol (efecto de la concentración de glicerol)

Porcentaje de glicerol	Osmolalidad (mOsm/kg)
0.5%	114
1.0%	172
1.5%	233
2.0%	292
2.5%	354

B. Formulaciones que contienen LACE.

Sobre la base de la curva típica que se muestra en la FIGURA 12C y los datos de las formulaciones que mostraron un adicional de 44-55 mOsm/kg (promedio de 48 mOsm/kg) por cada 1% de LACE, se preparó una serie de soluciones para confirmar la contribución osmótica real de LACE. El objetivo para la osmolalidad total fue de 300 mOsm/kg.

Tabla 6:

Concentraciones de glicerol para composiciones EV06

Conc. LACE	Osmolalidad objetivo sin LACE	% Glicerol para Osm objetivo	Osmolalidad total real (mOsm/kg)
0%	300	2.06%	295
1%	250	1.64%	308
2%	203	1.25%	324

Estos datos indican que el efecto de LACE sobre la osmolalidad es algo mayor que el esperado, del orden de 57-60 mOsm/kg por cada 1%. En consecuencia, se preparó

una serie completa de soluciones con osmolalidades objetivo ligeramente alteradas para las soluciones sin LACE y, por lo tanto, diferentes contenidos de glicerol objetivo. Todas las soluciones se prepararon utilizando la misma solución madre de alanina/cloruro de benzalconio, pH 4,5, que se usó en los placebos, de modo que la composición final fue consistentemente:

o 0,5% (5 mg/g) de alanina

o 0,005% (0,05 mg/g) de cloruro de benzalconio

o Pequeñas cantidades de hidróxido de sodio 1 N, ácido clorhídrico 1 N, para ajustar el pH a 4,5

o Agua para inhalación (agregada hasta el peso final de 5,0 g por formulación)

Tabla 7:

Ajuste de osmolalidad de las composiciones EV06

Conc. LACE (% Real)	Osmolalidad objetivo sin LACE	% Glicerol real usado para Osm objetivo	Osmolalidad total real (mOsm/kg)
0%	300	2.06%	295
1% (1.01%)	242	1.56%	299
2% (2.04%)	180	1.06%	296
2.5% (2.51%)	150	0.80%	302
3.0% (2.94%)	120	0.56%	308

C. Preparaciones estériles.

Sobre la base de estos resultados experimentales, se prepararon lotes de 10,0 g filtrados de manera estéril de cada formulación, con las siguientes composiciones objetivo, y se empaquetaron en frascos con gotero estériles (2 ml por frasco):

Tabla 8:

Cuadrícula de composición final de composiciones EV06

Conc. LACE	Glicerol (%)	Alanina (%)	Cloruro de benzalconio (%)
0%	2.07%	0.5%	0.005%
1%	1.56%	0.5%	0.005%
2%	1.07%	0.5%	0.005%
2.5%	0.80%	0.5%	0.005%
3.0%	0.53%	0.5%	0.005%

Ejemplo 8

Método de preparación de composiciones farmacéuticas de cloruro de LACE

Un método para preparar la composición farmacéutica de LACE es el siguiente:

o A temperatura ambiente, se agrega agua para inyección (WFI, conforme a sus siglas en inglés) al 80% del peso del lote al recipiente de composición de vidrio. El agua se purga con nitrógeno para lograr: *S10* ppm de oxígeno.

o Paso a paso, se agregan alanina, glicerol y BAK, y se mezclan hasta que se disuelven.

o El pH se ajusta a 4,4-4.6 con HCl o NaOH.

o El LACe se muele en un mortero con pistadero bajo nitrógeno para desaglomerar, y se agrega lentamente mientras se mezcla.

o Se agrega agua desoxigenada para inyección a fin de lograr el peso objetivo del lote final.

o El lote se mezcla durante un total de 8 horas para garantizar una dispersión y disolución completas.

o El pH puede ajustarse a 4,4-4,6 con NaOH o HCl si es necesario.

o La osmolalidad puede ajustarse a 290-310 con glicerol si es necesario.

o Después de 8 horas de mezcla, la solución del producto farmacológico EV06 a granel se filtra asépticamente a través de una cápsula de filtro de esterilización SHC de 0,5/0,2 µm, a una bolsa de contención.

o La solución de producto a granel en la bolsa de contención se mantiene a 5°C mediante refrigeración o baño de hielo.

o Se realiza la prueba del punto de burbujeo de filtro a fin de garantizar la integridad del filtro.

o La solución a granel filtrada estéril se transfiere asépticamente a la habitación Clase 100, y con ella se llenan frascos preesterilizados.

o Se aplican puntas y tapas estériles a los frascos bajo una capa de nitrógeno.

o Los frascos sellados se transfieren a bandejas, que se embolsan con una purga de nitrógeno y se transfieren inmediatamente al almacenamiento a 5°C.

Ejemplo 9

Estudios de estabilidad de formulaciones de cloruro de LACE

Los primeros prototipos de formulación contenían edetato de sodio y 0,01% de cloruro de benzalconio. Los estudios de estabilidad con y sin estos excipientes demostraron que el edetato de sodio no estabilizaba el LACE. La presencia de exceso de cloruro de benzalconio desestabilizó ligeramente el fármaco. Así, la formulación final no contiene edetato de sodio y 0,005% de cloruro de benzalconio. A través de pruebas microbiológicas, se demostró que 0,004% de cloruro de benzalconio en la composición de formulación actual es eficaz como conservante en el producto farmacológico.

En un esfuerzo por estabilizar aún más la formulación del fármaco, se realizaron estudios sistemáticos de estabilidad (5°C, 25°C y 40°C) en lotes de R&D de mediana escala con solución oftálmica EV06 embotellada en presencia y ausencia de paquetes barredores de oxígeno contenidos en bolsas zip-lock de papel aluminio impermeables al vapor. Las botellas de producto almacenadas a 5°C en presencia de un paquete barredor de oxígeno sellado en bolsas de aluminio resellables demostraron estabilidad a los 12 meses.

Se implementaron precauciones adicionales a lo largo del proceso de desarrollo para estabilizar la formulación final contra la degradación debido a la exposición al oxígeno ambiental y las condiciones no refrigeradas. Se implementaron la manipulación de la sustancia farmacológica bajo nitrógeno (exclusión de oxígeno y minimización de la humedad) y la composición bajo un manto de nitrógeno, para minimizar la exposición al oxígeno. Después de la composición, el producto se introdujo en una bolsa de contención impermeable al vapor y se almacenó en condiciones de refrigeración hasta que se produjo el embotellado. La bolsa de contención que contenía la solución a granel se mantuvo fría durante el llenado. Se colocó un manto de nitrógeno sobre la solución

de fármaco en cada botella, a fin de minimizar la exposición al oxígeno.

Tabla 9:

Sostén de estabilidad – Lote ECV–12JUN14–120–04

Tabla de estabilidad para solución oftálmica EV06, 3.0%

Recipiente: frasco con gotero de polietileno, 6 cc Cierre: Punta y tapa gotero

Recipiente secundario: Bolsa papel aluminio Adsorbente de oxígeno: Paquete adsorbente de oxígeno presente

Prueba	Método	Criterios acept.	T=0	2 Semanas	1 Mes	2 Meses	3 Meses	6 Meses	12 Meses
5°C									
Apariencia	ATM–1095	Sol. transp. amarillo pálido a amarillo, esencialmente libre de materia en partículas o extraña	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta
Ensayo, LACE	ATM–1405	90.0 – 110.0% de Declaración etiqueta	101.1%	107.1%	106.7%	98.9%	98.1%	95.0%	94.7%
Compuestos relacionados	ATM–1405	Informe individual *2:* 0.05% (% Área) Informe total	RRT 0.57:0.05% RRT 0.59:0.21% RRT 0.64:0.13% RRT 0.83:0.06% RRT 1.23:0.14% Total : 0.8%	RRT 0.58:0.17% RRT 0.63:0.09% RRT 0.66:0.17% RRT 0.83:0.06% RRT 1.23:0.16% LA: 0.06% Total : 0.7%	RRT 0.59:0.21% RRT 0.64:0.09% RRT 0.67:0.15% RRT 0.83:0.06% RRT 1.18:0.05% RRT 1.20:0.10% LA: 0.10% Total : 0.8%	RRT 0.61:0.10% RRT 0.66:0.07% RRT 0.86:0.07% RRT 1.21:0.08% RRT 1.27:0.09% LA: 0.17% Total : 0.6%	RRT 0.65:0.08% RRT 0.67:0.15% RRT 0.71:0.12% RRT 0.74:0.16% RRT 0.83:0.05% RRT 1.09:0.07% RRT 1.15:0.09% LA: 0.22% Total : 0.9%	RRT 0.61:0.34% RRT 0.67:0.21% RRT 0.69:0.23% RRT 0.84:0.06% RRT 1.14:0.08% RRT 1.20:0.10% LA: 0.32% Total: 1.3%	RRT 0.59:0.07% RRT 0.63:0.12% RRT 0.68:0.09% RRT 0.72:0.12% RRT 0.89:0.05% RRT 1.38:0.06% RRT 1.42:0.09% LA: 0.38% Total: 1.0%
Ensayo, conservante	ATM–1406	Informe	0.0447 mg/mL	0.0443 mg/mL	0.0446 mg/mL	0.0447 mg/mL	0.0440 mg/mL	0.0441 mg/mL	0.0504 mg/mL
pH	USP <791>	Informe	4.6	4.5	4.5	4.5	4.5	4.4	4.3
Osmolalidad	USP <785>	250–350 mOsm/kg	262 mOsm/kg	263 mOsm/kg	263 mOsm/kg	262 mOsm/kg	262 mOsm/kg	261 mOsm/kg	255 mOsm/kg
25°C ± 5°									
Apariencia	ATM–1095	Sol. transp. amarillo pálido a amarillo, esencialmente libre de materia en partículas o extraña	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	
Ensayo, LACE	ATM–1405	90.0 – 110.0% de Declaración etiqueta	101.1%	107.3%	107.0%	97.2%	98.9%	87.1%	
Compuestos relacionados	ATM–1405	Informe individual *2:* 0.05% (% Área) Informe total	RRT 0.57:0.05% RRT 0.59:0.21% RRT 0.64:0.13% RRT 0.67:0.21% RRT 0.83:0.06% RRT 1.23:0.14% Total : 0.8%	RRT 0.56:0.05% RRT 0.58:0.22% RRT 0.63:0.12% RRT 0.66:0.21% RRT 0.83:0.07% RRT 1.23:0.09% RRT 1.25:0.07% LA: 0.35% Total : 1.2%	RRT 0.59:0.27% RRT 0.64:0.12% RRT 0.67:0.18% RRT 0.83:0.07% RRT 1.20:0.16% RRT 1.35:0.09% LA:0.65% Total : 1.5%	RRT 0.59:0.18% RRT 0.66:0.09% RRT 0.86:0.07% RRT 1.21:0.08% RRT 1.27:0.19% LA: 0.94% Total : 1.6%	RRT 0.66:0.28% RRT 0.72:0.15% RRT 0.74:0.21% RRT 0.83:0.06% RRT 1.09:0.07% RRT 1.15:0.20% RRT 1.21:0.27% RRT 1.27:0.09% LA: 1.05% Total: 2.4%	RRT 0.61:0.58% RRT 0.69:0.30% RRT 0.84:0.06% RRT 1.14:0.08% RRT 1.20:0.29% RRT 1.26:0.51% RRT 1.34:0.18% LA: 1.18% Total: 3.2%	
Ensayo, conservante	ATM–1406	Informe	0.0447 mg/mL	0.0445 mg/mL	0.0447 mg/mL	0.0438 mg/mL	0.0435 mg/mL	0.0462 mg/mL	
pH	USP <791>	Informe	4.6	4.4	4.4	4.3	4.2	4.1	
Osmolalidad	USP <785>	250–350 mOsm/kg	262 mOsm/kg	264mOsm/kg	264mOsm/kg	263 mOsm/kg	261 mOsm/kg	259 mOsm/kg	

Compuestos relacionados: LA = < –R–Ácido lipoico (Norma USP Standard)

Ejemplo 10

Estudios de formulación para interrumpir la micelización del yoduro de LACE

Síntesis de los experimentos:

En los experimentos en los que se añadió cloruro de sodio a una formulación de yoduro de LACE existente, o se utilizó una solución que contenía cloruro de sodio para disolver el API de yoduro de LACE, el pico de "especies asociativas" no disminuyó significativamente.

En los experimentos en los que se utilizó un cosolvente tal como etanol o propilenglicol

para suspender el API antes de la adición de un vehículo acuoso, hubo una reducción muy significativa en el porcentaje de las especies asociativas. La adición de un solvente orgánico a una formulación existente también disminuyó el pico de especies asociativas, en menor medida.

Estos resultados apuntan a estrategias de formulación que pueden interferir con la interacción hidrófoba entre las moléculas de LACE como un medio para controlar las especies asociativas.

Antecedentes.

Se ha formulado la hipótesis de que la "especie asociativa" que hemos observado por RP-HPLC, que representa un gran porcentaje del API en los diversos lotes formulados preparados utilizando el yoduro de LACE, es un agregado micelar. Esto se sustenta en parte en la estructura de tipo surfactante de la molécula de LACE, y en la capacidad para disipar esta especie mediante dilución o agitación adicional, en el caso del cloruro de LACE.

En la literatura, el cloruro de sodio es un disruptor micelar conocido. Por lo tanto, se realizaron una serie de experimentos para evaluar si esta "especie asociativa" podría disiparse mediante la adición de cloruro de sodio u otros ingredientes que se esperaría interrumpan la especie asociativa por otros mecanismos, como las interacciones hidrófobas.

Resultados.

Como primera prueba de esta hipótesis, una formulación existente (lote FK-LACE-02-15), que se sabe que exhibe un gran pico de "especies asociativas", se mezcló con soluciones que contenían diversos niveles de cloruro de sodio (NaCl). La concentración final de LACE diluida se dirigió al nivel apropiado para el análisis RP-HPLC (12,8 mg/ml de LACE-yoduro).

La Tabla 10 muestra los resultados clave de este conjunto de experimentos, que no demostraron ningún cambio significativo en el nivel de especies asociativas a lo largo

del tiempo, incluso, en niveles de sal (NaCl) muy por encima de lo que sería aceptable en el ojo (debido a la muy alta osmolalidad).

La dilución de la formulación con acetonitrilo a la misma concentración final de yoduro de LACE, que produjo un total de ~33% de acetonitritrilo, condujo a una modesta disminución en el nivel de especies asociativas, desde un rango de 36-40% hasta 26% en 4 horas.

Tabla 10:

Adición de sal o solvente orgánico al lote FK-LACE-02-15

	% Especies asociativas a:		
Condición (ingrediente enumerado con concentración final)	**T=0**	**4 horas**	**24 horas**
Formulación como tal (dil. a 12.8 mg/g)	39.0%		
Form. + 0.9% NaCl	37.1%	38.3	37.2%
Form. + 1.8% NaCl	35.9%	(sin medición)	36.4%
Form. + 3.6% NaCl	36.2%	36.0	(sin medición)
Formulación + 33% Acetonitrilo	33.4%	25.8	23.7%

En el siguiente conjunto de experimentos, el API de yoduro de LACE se disolvió de diversas maneras para determinar si estas condiciones podrían prevenir la formación inicial de las especies asociativas y, por lo tanto, eliminar la semilla que permitía un mayor crecimiento de esta especie a lo largo del tiempo. Las condiciones ensayadas fueron:

Disolución en tampón pH 4,5 (alanina al 0,5%, BAK al 0,005%) con NaCl al 1,8%.

Disolución en etanol - el API no se disolvió en etanol puro, y formó una suspensión. Se añadió alrededor de 22% en volumen del tampón acuoso pH 4,5, lo que llevó a la disolución casi completa del API, con algo de calentamiento a 37°C.

Disolución/suspensión en propilenglicol, seguido de disolución en el tampón acuoso pH 4,5. Se añadió primero propilenglicol, que representó el 10% en peso de la solución

final.

Disolución en un tampón de pH 4,5 que contiene 0,6% de NaCl y 1,5% de propilenglicol (PG). El objetivo fue evaluar si la interrupción de las interacciones carga-carga (por NaCl) y las interacciones hidrófobas (por PG) tendrían un efecto sinérgico, utilizando concentraciones de cada uno que serían razonables en términos de osmolalidad.

Como se muestra en la Tabla 10, los experimentos con etanol y propilenglicol tuvieron éxito la eliminación o reducción significativa de las especies asociativas presentes en T = 0, en relación con los otros experimentos de disolución. Debe observarse que la solución se agregó al polvo de API, en lugar de la práctica de formulación de agregar API a la solución, lo que puede explicar por qué T = 0 fue alto en algunos de estos casos, pero no el día en que se prepararon los lotes formulados.

Tabla 10:

Experimentos con disolución directa de API de yoduro de LACE (Lote # 011510)

Método de disolución	**% Especies asociativas a T0**
Tampón con 1.8% NaCl	34.7%
Etanol (78% final), luego tampón (22%)	0.0%
Propilenglicol (10%), luego tampón (90%)	11.7%
Tampón con 0.6% NaCl, 1.5% PG	40.9%

Ejemplo 11

Estudios de formulación con ciclodextrinas para interrumpir la micelización del yoduro de LACE

Hipótesis.

Las especies asociativas pueden mitigarse mediante la inclusión de excipientes que interfieren con las interacciones hidrófobas entre las moléculas de LACE.

Se prepararon formulaciones que contenían polipropilenglicol, Dexolve-7 (sulfobutiléter-

beta-ciclodextrina) o hidroxipropil-beta-ciclodextrina y se analizaron para detectar especies asociativas y sustancias relacionadas.

Tabla 11:

Estudios de formulación para prevenir la micelización del yoduro de LACE en solución

ID Lote, Especies	Tamaño	Osmolalidad	% Especies	% Sustancias	%
FK-LACE-02-09 Lote control Igual a formulación LACE–Cl	160 g	278	32.9% (4 semanas)	1.33%	0.83%
FK-LACE-02-28 5.76% Dexolve	3 g	281	0.0% (24h)	TBD	No visible por RP–HPLC
FK-LACE-02-29 5% PPG	3 g	299	0.0% (72h)	6.69%	4.66%
FK-LACE-02-32 Igual al control	25 g	279	4.5% (24h) 3.6% (96h)	0.94%	0.21%
FK-LACE-02-33 5% PPG	25 g	273	13.2% (24 h) 14.2% (96h)	5.67%	5.15%
FK-LACE-02-36 5.76% Dexolve	25 g	281	0.0 % (72 h)	0.98%	0.09%
FK-LACE-02-37 5.0% HPCD	25 g	151*	0.0 % (72 h)	0.81%	0.11%

% especies oxo–LACE se muestra a T=0.

Ejemplo 12

Estabilidad mejorada en formulaciones de HP-B-CD/yoduro de LACE

Estos experimentos demuestran la mejora de la estabilidad lograda por la formulación de HP-*B*-CD/yoduro de LACE en comparación con la formulación sin HP-*B*-CD/yoduro de LACE.

Experimento # 1.

Se prepararon formulaciones que comprendían 3% de yoduro de LACE, o bien con (16,1% de HP*B*CD) o sin hidroxipropil-B-ciclodextrina (HP-B-CD) a una escala de 10 g.

Ambas formulaciones contenían 0,5% de alanina, pH 4,5, 50 ppm de cloruro de benzalconio y glicerol para el ajuste de la osmolalidad, y todas las soluciones tenían un pH de 4,2-4,5. En la formulación que contenía HP-B-CD, la ciclodextrina estaba presente en una relación molar de 1,5:1, en relación con la concentración de LACE. Las formulaciones se filtraron a través de una membrana de PVDF de 0,2 µm, y con 5 ml de cada formulación se llenó un frasco gotero de LDPE de 10 ml, y luego se cubrió con nitrógeno antes de insertar la punta del gotero y tapar el frasco. El frasco gotero no estaba en la bolsa de barrera en el momento del llenado.

Los frascos con gotero con las dos formulaciones se almacenaron a 25ºC en una incubadora de temperatura controlada, y se tomaron muestras de 0,5 ml (alrededor de 10 gotas) en cada punto de tiempo para el análisis de sustancias relacionadas (por HPLC). El manto de nitrógeno no se reabasteció, por lo que se introdujo algo de aire en el frasco con cada muestreo. Este experimento fue una investigación temprana de la estabilidad a temperatura ambiente (25 ± 0,1°C) sin protección contra el oxígeno, con muestreo continuo.

La FIGURA 18 muestra un curso temporal del aumento de las especies oxidadas de LACE durante 20 días a 25°C con muestreo repetido (cuadrado: LACE-I, formulación al 3%, 16,1% HP-*B*-CD; diamante: LACE-I , formulación al 3%, sin HP-*B*-CD). Los puntos de tiempo de muestreo fueron T-0, 1 día, 2 días, 8 días, 12 días y 17 días).

Estos datos (FIGURAS 18 y 19) demostraron que la ciclodextrina protegió LACE contra la oxidación, tanto inicialmente, de manera de producir cantidades más bajas de API oxidado durante la preparación, así como también bajo una condición de estrés acelerado con cantidades crecientes de oxígeno presente. La formulación con HP-*B*-CD se mantuvo dentro de la especificación de ≤2,0% de impurezas totales durante 17 días (sin incluir el ácido lipoico) en estas condiciones. Al final de los 20 días, la concentración de ácido lipoico fue de ~ 0,20%.

Ejemplo 13

Estabilidad comparativa entre la formulación clínica de cloruro de LACE y yoduro de LACE HP-B-CD

Para los estudios de estabilidad tanto en la formulación clínica de cloruro de LACE como en el prototipo de yoduro de LACE con una relación molar de 1:1 de HP-*B*-CD a LACE, las formulaciones se filtraron, se colocaron en frascos con gotero de LDPE, se cubrieron con nitrógeno, y luego se colocaron dentro de bolsas de papel aluminio de barrera con un barredor de oxígeno. Es probable que algo de oxígeno todavía estuviera presente en la bolsa al comenzar. Sin embargo, después del primer punto de tiempo después de T = 0, el aumento en las especies de LACE oxidadas se detiene, incluso a temperaturas elevadas, probablemente debido al agotamiento del oxígeno restante (FIGURA 20). La tasa de aumento de las especies oxidadas para el cloruro de LACE fue ligeramente más alta a 25ºC que a 5ºC, aunque no de manera significativa.

El prototipo de formulación de yoduro de LACE que contiene HP-*B*-CD muestra niveles más bajos de LACE oxidado al inicio (~ 0,11% para yoduro de LACE, en oposición al 0,3%, para cloruro de LACE), a pesar de estar preparado sin ningún manto de nitrógeno durante la disolución del API. Para la formulación clínica de cloruro de LACE, la solución se desoxigenó, y se mantuvo un manto de nitrógeno durante la disolución.

Además, después de que se cubrió con nitrógeno y se colocó dentro de la bolsa, la formulación del prototipo de yoduro de LACE mostró un aumento mucho menor en el porcentaje total de LACE oxidado antes de nivelarse. El alcance del aumento inicial dependió de la temperatura para ambas formulaciones. Esto permitió la estimación de la energía de activación para cada formulación mediante el modelado de Arrhenius. Para el prototipo de la formulación de yoduro de LACE con HP-*B*-CD, la energía de activación fue más del triple con respecto a la formulación original de LACE-Cl (FIGURA 21), lo que indica además que HP-*B*-CD estabiliza el LACE contra la oxidación.

Formulación	Energía de activación
LACE-Cl clínica	9.9 kJ/mol
Prototipo LACE-I con HPbCD	33.2 kJ/mol

Las energías de activación para el mecanismo de hidrólisis de la degradación de LACE, que produce el crecimiento de ácido lipoico, también se calcularon a partir de los datos de estabilidad (FIGURA 22). En contraste con el mecanismo de oxidación, las energías de activación para la hidrólisis tanto para la formulación LACE-Cl como para la formulación LACE-I fueron similares (65,6 kJ/mol y 69,4 kJ/mol, respectivamente) (FIGURA 21), lo que indica que la ciclodextrina no tiene impacto significativo sobre la hidrólisis.

Ejemplo 14

Estudios de permeabilidad corneal del cloruro de LACE y el yoduro de LACE

Una pregunta crítica fue si el fármaco formulado con hidroxipropil beta ciclodextrina (HP-*B*-CD) impregnaba adecuadamente el tejido corneal y era accesible a las esterasas corneales para liberar el fármaco activo, el ácido lipoico. Como se mencionó anteriormente, el ácido lipoico es el fármaco activo para esta indicación: la presbicia.

Los siguientes experimentos evaluaron: (a) la permeabilidad del éster de colina del ácido lipoico (LACE) a través de la córnea de ternero bovina a través de formulaciones de LACE-yoduro que contenían hidroxipropil-*B*-ciclodextrina (HP-*B*-CD) en diferentes concentraciones, y (b) la permeabilidad comparativa del cloruro de LACE frente al yoduro de LACE. Los experimentos se realizaron utilizando un aparato de difusión de células Franz que se muestra en la FIGURA 23.

El LACE se suministra a partir de estas formulaciones como una de dos sales: LACE-cloruro y LACE-yoduro. LACE es el profármaco, que viaja a través de la barrera corneal antes de hidrolizarse en ácido lipoico, el fármaco activo, a través de la acción de las esterasas oculares y a través de la hidrólisis pasiva del compuesto farmacológico en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, las concentraciones de LACE y ácido lipoico se

ensayaron en cada punto de tiempo para evaluar la permeabilidad.

Composiciones para la permeabilidad corneal, por Estudio #

	Estudio 1		**Estudio 2**		**Estudio 3**		**Estudio 4**	
(% p/p)	**AC-LACE-03-33**	**ECV-23Apr15-112-08**	**AC-LACE-03-36**	**AC-LACE-03-39**	**AC-LACE-03-39**	**ECV-23Apr15-112-08**	**AC-LACE-03-33**	**FK-LACE-02-32**
LACE-I	1.92	1.5% LACE-Cl	3.0	4.5	4.5	1.5% LACE-Cl	1.92	1.92
HP-JJ-CD	6.88	---	10.75	16.12	16.12	---	6.88	---
Alanina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
BAK	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
Glicerol	1.1	1.37	0.6	0.0	0.0	1.37	1.1	1.38
WFI	89.6	96.6	85.15	78.88	78.88	96.6	89.6	96.2

Procedimiento:

a. Seis globos oculares bovinos se diseccionan en una campana de flujo laminar estéril.

b. Las córneas se extraen del globo ocular, se enjuagan brevemente con agua destilada doble estéril y se sumergen en 3 ml de tampón de glutatión (glutatión al 0,1%, oxidado, fosfato sódico 6 mM, pH 7, filtrado estéril) en un plato de cultivo estéril.

c. Las córneas se mantienen a 5°C y se usan dentro de las 24 horas posteriores a la escisión.

d. Seis células de difusión vertical de Franz de 5 ml se limpian con agua destilada e isopropanol y se secan al aire en un gabinete de flujo laminar antes de la instalación.

e. Una pequeña barra de agitación se coloca dentro de la cámara de fluido receptor. La botella de fluido receptor (solución salina tamponada con fosfato 5 mM con Tween 20 al 0,1%, pH 7,4, filtrado estéril) se tara en una balanza analítica, y se añaden 4,5 ml de esto a cada célula de Franz. Se registra el peso exacto del fluido receptor inicial.

f. La córnea se enjuaga suavemente con tampón de glutatión con fluido receptor y

se coloca en el pedestal del donante. La cámara del donante se coloca encima de la córnea, y todo el conjunto se sujeta al pedestal con un sujetador metálico. En este punto, se agregan 0,5 ml de fluido receptor adicional a través del brazo de muestreo, hasta que el nivel del fluido alcanza el punto marcado en el brazo con una línea negra. El peso de esta adición también se registra.

g. El aparato de difusión de Franz se conecta a una unidad de calentamiento, y la temperatura se eleva a 37°C. Cuando se alcanza esa temperatura, la formulación ("la solución donante") se agrega a la cámara de donante.

h. Se añaden 0,2 ml de solución donante. Tanto la cámara del donante como el brazo de muestreo están cubiertos por parafilm cuando no están en uso, a fin de evitar la evaporación.

i. El muestreo se realiza a través de la pipeta Drummond y solo a través del brazo de muestreo. Se toman muestras de 200 a 300 µl de fluido receptor de cada célula en cada punto de tiempo.

j. La muestra se agrega a un vial de HPLC de vidrio ámbar con 0,3 ml de inserto de vidrio y se pesa. El volumen tomado del brazo de muestreo se reemplaza con fluido receptor nuevo.

k. Durante el muestreo, nunca se permitió que el nivel de líquido cayera por debajo del inicio del brazo de muestreo, de manera que se introdujeran burbujas de aire en la cámara de receptor. Si el fluido se había evaporado significativamente entre dos puntos temporales, se agregó y registró un reemplazo de muestreo previo, y el muestreo procedió de manera normal.

l Las muestras se almacenaron a 5°C, hasta el análisis de ensayo por HPLC.

m. Las córneas se extrajeron con homogeneización de molino de cuentas.

Estudio 1: El propósito de este estudio fue comparar la permeabilidad de AC-LACE-03-33, que contiene 1,92% de LACE-yoduro, con ECV-23April15-112-08, Demo # 6 (Frontage, 1,5% de LACE-Cloruro), para evaluar los efectos de HP-*B*-CD sobre el paso

de LACE a través de la córnea. Dada la diferencia en el peso molecular entre LACE-I y LACE-Cl, estas fueron concentraciones equivalentes de LACE. Por lo tanto, un cloruro de LACE al 1,5% fue equivalente a una formulación de yoduro de LACE al 1,92%. No se usó inhibidor de esterasa en el experimento.

Los resultados del Estudio 1 (FIGURAS 24 y 25) demostraron que la mayoría del producto farmacológico que impregnaba era ácido lipoico, que se había hidrolizado de LACE durante el paso a través de la córnea, o en la solución de receptor antes de la recolección del punto de tiempo. La especie permeada fue casi completamente ácido lipoico para la formulación de yoduro de LACE, con LACE algo más intacto impregnado con la formulación de cloruro de LACE. Esto es algo esperado debido al mayor tamaño iónico y el peso molecular de la molécula de yoduro de LACE, en comparación con la molécula de cloruro de LACE, posiblemente, de manera de producir un tiempo de permanencia más largo en la córnea y un mayor grado de hidrólisis al ácido lipoico. Los permeados se analizaron inmediatamente después de la recolección luego de cada punto de muestreo. El porcentaje total de fármaco permeado fue similar entre las formulaciones que contenían LACE-I y LACE-Cl, en 5-7% (sin incluir un valor atípico de alta permeabilidad para LACE-I).

Estudio 2: El propósito de este estudio fue evaluar la permeabilidad de dos formulaciones de LACE-I, con diferentes concentraciones de LACE-I: AC-LACE-03-36 (3% de LACE-yoduro/10,7% de HP-*B* -CD) y AC-LACE-03-39 (4,5% Lace-yoduro/16,1% HP-*B*-CD) (FIGURAS 26 y 27).

Los resultados del Estudio 2 mostraron que la mayor parte del fármaco permeado existía en el fluido receptor en su forma de ácido lipoico, pero en concentraciones más bajas en comparación con el estudio anterior, a pesar de que había concentraciones más altas de fármaco. Una porción significativa del fármaco estaba contenida dentro del tejido corneal debido al cultivo de córneas de ternero más gruesas (~ 1,5-1,8 mm en el Estudio 2, ~ 0,6-0,8 mm en el Estudio 1) disponibles para este estudio. Se extrajo un

rango del 1 al 5% de la cantidad total de ácido lipoico del tejido corneal, con un promedio del 3,4% extraído de las córneas expuestas a AC-LACE-03-36 (3,0% LACE-I/10,7% HP -*B*-CD) y 2,5% extraído de las córneas para AC-LACE-03-39 (4,5% LACE-I/16,1% HP-*B*-CD).

Estudio 3: Este estudio investigó la permeabilidad entre una formulación de yoduro de LACE que contenía HP-*B*-CD y una formulación de cloruro de LACE que no contenía HP-*B*-CD. El propósito de este estudio fue aprovechar los datos anteriores obtenidos en el Estudio 2, mediante el examen de la diferencia en la permeabilidad corneal de LACE entre AC-LACE-03-39 (4,5% LACE-I/16,1% HP-*B*-CD) y ECV- 23April15-112-08 (1,5% LACE-Cl, sin HP-*B*-CD) para determinar adicionalmente si la concentración de LACE era un impedimento para su permeación a través de la capa corneal.

La extracción de LACE/LA de la sección de contacto de la córnea se realizó mediante homogeneización de molino de cuentas, y reveló que se encontró una mayor masa de ácido lipoico en el tejido corneal expuesto a AC-LACE-03-39 (4,5% de LACE I/16,1% HP-*B*-CD) al concluir el estudio, aunque el aumento en la concentración dentro de las córneas fue significativamente menor que el aumento en la concentración de API administrada (FIGURAS 28 y 29). Por lo tanto, la dosis más alta de 4,5% de LACE-I puede no proporcionar una ventaja significativa en términos de fármaco permeado.

Estudio 4: Este estudio comparó el efecto de la hidroxipropil beta ciclodextrina sobre la permeabilidad, manteniendo constante la forma de la sal de LACE. En este estudio, ambas cohortes fueron LACE-yoduro.

Las formulaciones fueron FK-LACE-02-32 (1,92% LACE-I, sin HP-*B*-CD) y AC-LACE-05-21B (1,92% LACE-I, 1 equivalente molar de HP-*B*-CD) (7,4%)). El propósito de este estudio fue doble. El primer objetivo fue comparar directamente dos soluciones de LACE-I, de concentraciones iguales, de manera que el impacto de HP-*B*-CD sobre la permeación se examinara directamente. El segundo objetivo fue examinar el impacto de HP-*B*-CD sobre la retención del producto farmacológico dentro del tejido corneal.

Los datos de este estudio indican que HP-*B*-CD no tiene impacto sobre la retención corneal del fármaco; para ambas formulaciones, se extrajo en promedio 7% del total de LA (ácido lipoico) de las secciones de córnea (FIGURAS 30 y 31).

En términos de permeación a través de la capa corneal, las 3 córneas para FK-LACE-02-32 mostraron permeación de 4-6 horas en adelante, mientras que solo 1 córnea para AC-LACE-05-21B mostró permeación a partir del punto del tiempo de 4 horas. Sin embargo, el promedio del producto farmacológico permeado a las 28 horas fue similar, con 12,67 ± 5,62% del total de LA para FK-LACE-02-32, y 11,27 ± 9,78% del total de LA para AC-LACE-5-21B. La similitud en las concentraciones corneales extraídas, así como la permeación promedio similar a las 28 horas, muestran que el HP-*B*-CD no es un impedimento para que LACE-I ingrese al tejido corneal.

Todos los datos evaluados en conjunto demuestran que LACE-yoduro puede administrarse a la superficie ocular sin impedimento de transporte debido a su mayor tamaño molecular y al sistema de suministro (HP-*B*-CD). Además, los resultados del estudio demostraron un transporte eficiente de LACE a través de la córnea en todas las concentraciones investigadas. Asimismo, las altas concentraciones de ácido lipoico producidas en el fluido receptor para las concentraciones de LACE-yoduro/HP-*B*-CD demostraron la conversión de LACE en ácido lipoico por las esterasas de la córnea. LACE-cloruro, en contraste, mostró más de una mezcla de ácido lipoico y LACE, posiblemente, debido a su menor peso molecular.

Ejemplo 15

Especies asociativas como una función de la relación molar de LACE–I: HP–B–CD.

Los experimentos previos demostraron que hidroxipropil Beta ciclodextrina (HP–*B*–CD) podía interrumpir la micelización de LACE–I en solución acuosa. *Estos experimentos determinan la relación molar de LACE–yoduro a hidroxipropil Beta ciclodextrina (*HP–*B*–CD *necesaria para generar complejos de inclusión termodinámicamente estables.*

HP–β–CD + Lace–	⟷	**[HP–β–CD –Lace–Yoduro] (Complejo inclusión completo)**
HP–β–CD + Lace–	⟷	**[HP–β–CD –Lace–Yoduro] + HP–β–CD (Complejo inclusión completo)**
HP–β–CD + Lace–	⟷	**[HP–β–CD –Lace–Yoduro] + Lace–Yoduro (Complej. inclusión parcial**

El enfoque fue generar complejos de inclusión completos de LACE-yoduro en HP-*B*-CD, de modo de evitando así cualquier oportunidad de agregación de moléculas de LACE. Se prepararon varios lotes de formulación utilizando relaciones molares variables de LACE-yoduro a HP-*B*-CD, y se evaluó el crecimiento de especies agregadas a lo largo del tiempo. Las formulaciones se almacenaron a 5ºC. La formación de especies asociativas medida por HPLC de fase inversa se informó como el porcentaje de área con respecto al área de pico principal de LACE.

Los resultados establecieron que la formación de especies asociativas podría evitarse cuando hubiera por lo menos una equivalencia molar entre la concentración de LACE-I y HP-*B*-CD (como se muestra en la FIGURA 32).

Ejemplo 16

Correlación entre las especies agregadas y la irritación ocular in vivo

El Ejemplo 16 estableció la correlación entre la concentración de especies asociativas y la irritación ocular en un modelo *in vivo* (modelo Draize de conejo). Los datos mostraron que se podían obtener puntuaciones de irritación promedio de 0-0,5 cuando la relación de equivalente molar de LACE-yoduro:HP-*B*-CD era 1:1 o 1:1,5.

Tabla 12

Correlación entre las especies asociativas y la irritación ocular

Lote	% LACE–I (p/p)	Ciclodextrina	Relación molar CD a API	Especies asociativas (% área frente a LACE)	Especies asociativas (% in solución)*	Puntuaciones irritación promedio
FK–LACE–02–09	1.92	Ninguna	N/A	39%	0.75%	4.25
AC–LACE–03–18	1.92	HP–*y*–CD (6.0%)	1.0	6.4%	0.12%	0
AC–LACE–03–10C	4	HP–*B*–CD (7.8%)	0.54	8.4%	0.34%	4
AC–LACE–03–10D	4	HP–*B*–CD (5.0%)	0.35	24.9%	1.0%	6
AC–LACE–03–33	1.92	HP–*B*–CD (7.4%)	1.0	0.5%	0.01%	0
AC–LACE–03–36	3	HP–*B*–CD (10.7%)	1.0	1.3%	0.04%	0.5
AC–LACE–03–39	4.5	HP–*B*–CD (16.1%)	1.0	0.3%	0.014%	0
AC–LACE–03–54	3	HP–*B*–CD (16.1%)	1.5	0.6%	0.02%	0
FK–LACE–02–36	1.92	Dexolve (5.8%)	~ 0.8	BLOQ	0.0%	0

* Calculado multiplicando la concentración de LACE–I por % de área de especies asociativas

Ejemplo 18

SÍNTESIS DE ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE LACE–YODURO/HPBCD

Estudio #	Propósito/ Diseño	Lote#	Fecha inicio	Descripción de Formulación	Puntos de tiempo	Tabla	Discusión/Observ.
N/A	**Efecto de ciclodextrina frente a nada;** Condiciones: 5C, 25C Condiciones: viales de vidrio, sin bolsa, capa de nitrógeno	FK–LACE–02–32	13–abr–16	Sin HPbCD, formulación ctrl.	1 mes, 3 meses	#13	
		FK–LACE–02–36	13–abr–16	Dexolve, ~0.8 ME	1 mes, 3 meses		
		FK–LACE–02–37	13–abr–16	0.73 ME HP*B*CD	1 mes, 3 meses		
052516	**Efecto de ciclodextrinas frente a nada;** Condiciones: 25C, LDPE uso final simulado, en bolsa, capa de nitrógeno, barredores de oxígeno	AC–LACE–03–54	25–mayo–16	1.5:1 ME HP*B*CD, 3.0% LACE–I	1, 2, 8, 17, 20 días	#14	Demostró efecto protector de HPbCD
		AC–LACE–03–56	25–mayo–16	3.0% LACE–I, sin HPbCD			
0205	**Efecto de concentr. LACE–I y dif. relaciones HPbCD/LACE–I;** Condiciones: 5C, 25C, 40C LDPE, en bolsa, capa nitrógeno, barredores de oxígeno	AC–LACE–05–21	1–jul–16	1:1 ME HP*B*CD, 3.0% LACE–I	2 sem, 1, 2, 3 meses (3 meses el 1 oct)	#15	Estable a 5C
		AC–LACE–05–21B	1–jul–16	1:1 ME HP*B*CD, 1.92% LACE–I			Estable a 5C
		AC–LACE–05–23	1–jul–16	1.5:1 ME HP*B*CD, 3.0% LACE–I			Estable a 5C
		AC–LACE–05–23B	1–jul–16	1.5:1 ME HP*B*CD, 1.92% LACE–I			Estable a 5C
0214	**Estabilidad en lote preparado <u>sin purga N2</u> durante preparación;** Condiciones: 5C, 25C, 40C LDPE, en bolsa, capa nitrógeno, barredores de oxígeno	AC–LACE–05–39	12–jul–16	1:1 ME HPbCD, 3.0% LACE–I Cavasol HPbCD (mejor pureza)	2 sem, 1, 2, 3 meses (3 meses el 12 oct)	#16	Estable a 5C, 25C, y 40C; excepto ácido lipoico aumenta a temperaturas más altas
0225	Estabilidad en lote preparado con 0.23% HPMC; Condiciones: 5C, 25C, 40C LDPE, sin purga nitróg., LDPE, en bolsas, capa N_2, barredores O_2	AC–LACE–07–01	19–agos–16	1:1 ME HPbCD, 3.0% LACE–I Cavitron HPbCD (mejor pureza) 0.23% HPMC (Tipo 2910)	2 sem, 1, 3 meses (3 meses el 19 nov)	#17	1 mes el 19 sep

0226	Estabilidad en lote almacenado fuera de bolsa (5C, 25C) – RS solo	AC–LACE–05–39	19–agos–16	1:1 ME HPbCD, 3.0% LACE–I Cavasol HPbCD (mejor pureza)	2 sem., 1 mes (1 mes el 19 sep)		Datos T0 = 1 mes @ 5C, dentro de bolsa (de Estudio# 0214)
0220	**Estabilidad en LACE API (Lote R&D)** Condiciones: –20C, 5C, 25C	DG10_p100_060816	2–sep–16	N/A	3, 6, 12, 18, 24 meses (3 meses el 2 dic)		en viales ámbar, en bolsa
				ME = Equivalentes molares			

Tabla 13–1:

FK–LACE–02–32: 1,92% LACE–Yoduro Lote# 011510, Formulación estándar (sin ciclodextrina)

Ensayo	Especificación objetivo	T0 (RS: 4/08/2016)	T = 1 mes @ 5°C (17May2016)	T = 1 mes @ 25°C (17 mayo 2016)
Apariencia	Sol. transparente, ligeram. amarilla	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta
Ensayo API	19.2 mg/g ± 10% (17.18 – 21.12)	15.44 mg/g	12.53 mg/g *	16.32 mg/g
Sustancias relacionadas con API	Informe todas las impurezas >0.05%	Oxid. LACE (2 picos): RRT 0.48 0.13% RRT 0.52 0.09% RRT 1.84 0.21% RRT 2.00 0.18% RRT 2.29 0.19% Ácido lipoico (RP) <0.05%** Total Imp. 0.79%	Oxid. LACE (2 picos): RRT 0.48 0.88% RRT 0.52 0.47% RRT 1.84 — RRT 2.00 0.32% Ácido lipoico (RP) 0.05% ** Total Imp. 1.72%	Oxid. LACE (2 picos): RRT 0.45 2.78% RRT 0.52 1.32% Ácido lipoico (RP): 0.7% ** Resto ocultos por pico yoduro elución temprana debido a Dexolve en muestra previa. Total Imp. 4.80%
Especies asociativas	Informe (método RP–HPLC)	4.5%	36.2%	1.78%
pH	4.5 ± 0.5	4.66	5.26 *	4.70
Osmolalidad (mOsm/kg)	300 (280–320)	279	265	287

* Puede ser necesario repetir desde el segundo vial almacenado a 5°C, que no se ha muestreado tanto.

** Ácido lipoico estimado a partir del % de área del pico RRT 1.17 en el método RP-HPLC utilizado para la determinación de especies asociativas.

• Debido al repetido muestreo y/o a las condiciones de almacenamiento (que carecen de una bolsa de papel aluminio con absorbentes de oxígeno), esta formulación muestra cierta degradación oxidativa.

• A medida que aumentaron las especies asociativas (1 mes a 5°C), la osmolalidad disminuyó.

Tabla 13–2:

FK–LACE–02–37: 1,92% LACE–Yoduro lote# 011510, Formulación con 5% HP–JJ–CD (~0,75:1 relación molar de HPBCD:LACE)

Ensayo	**Especificación objetivo**	**T0 (RS: 4/11/2016)**	**T = 1 mes @ 5°C (17May2016)**	**T = 1 mes @ 25°C (17May2016)**	**API (Lote # 011510) RS analizado 22/3/2016**
Apariencia	Sol. transp. ligeram. amarilla	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta	Se ajusta
Ensayo API	19.2 mg/g ± 10% (17.18 – 21.12)	18.97 mg/g **	17.54 mg/g	17.57 mg/g	N/A
Sust. relacionadas con API	Informe todas las impurezas >0.05%	Oxid. LACE (3 pico): RRT 0.40 0.05% RRT 0.48 0.04% RRT 0.52 0.02% RRT 2.00 0.46% Ácido lipoico (RP) <0.05% Total Imp. 0.57%	Oxid. LACE (3 pico): RRT 0.45 0.05% RRT 0.48 0.20% RRT 0.52 0.10% RRT 2.00 0.54% Ácido lipoico (RP) 0.1% Total Imp. 0.99%	Oxid. LACE (2 picos): RRT 0.48 1.77% RRT 0.52 0.53% RRT 2.00 0.50% Ácido lipoico (RP) 1.1% Total Imp. 3.90%	Oxid. LACE (2 pico): RRT 0.48 0.08% RRT 0.52 0.04% RRT 1.74 0.24% RRT 2.00 0.20% Total Imp. 0.56%
Especies asociativas	Informe (método RP–HPLC)	0.0%	0.0% (09 mayo16 – 27 días)	0.18%	N/A
pH	4.5 ± 0.5	4.78	5.39 ***	4.81	N/A
Osmolalidad (mOsm/kg)	300 (280–320)	297	306	310	N/A

** Anteriormente informado 21,3 mg/g. Debido a problemas de bombeo en HPLC que causan un desplazamiento en los tiempos de retención, la curva típica utilizada en la determinación anterior ahora está en duda. El resultado informado aquí se sustenta en la curva típica actual aplicada a la ejecución de 22abr2016.

*** Es posible que deba repetirse desde el segundo vial almacenado a 5°C, que no se ha muestreado tanto.

Observaciones.

• A pesar de la manipulación repetida, las sustancias relacionadas en este lote no han aumentado sustancialmente.

• Esto se compara favorablemente con el lote FK-LACE-02-32 (sin ciclodextrina) que se colocó en estabilidad al mismo tiempo en las mismas condiciones de almacenamiento, y muestra mayores aumentos en las impurezas LACE oxidadas a 5°C y 25°C .

• Esta comparación indica que la ciclodextrina puede proteger parcialmente la molécula LACE contra la oxidación.

Tabla 14:

Estabilización de por LACE–Yoduro por Hidroxipropil Beta Ciclodextrina

AC–LACE–03–54	3.0% LACE–I, 16.1% HP*B*CD	**Condiciones**: Almacenado a 25ºC, frascos gotero LDPE, manto de N_2 inicialmente, sin bolsa o barredor de oxígeno				
	Especificaciones	T = 24 h	T = 48 h	T = 8 días	T = 17 días	T = 20 días
Sustancias relacionadas	Único desconocido: NMT 0.5% Total desconocidos: NMT 2.0% Ácido lipoico: NMT 1.0%	RRT 0.39 0.19% RRT 0.51 0.10% RRT 0.54 0.14% RRT 0.62 0.04% RRT 0.67 0.03% Lipoato 0.25% RRT 1.55 0.11% Ácido lipoico 0.30% **Total desc. 0.61%** **Total Imp. 1.16%**	RRT 0.39 0.19% RRT 0.51 0.09% RRT 0.54 0.14% RRT 0.62 0.04% RRT 0.67 0.04% Lipoato 0.29% RRT 1.55 0.10% Ácido lipoico 0.15% **Total desc. 0.60%** **Total Imp. 1.04%**	RRT 0.39 0.19% RRT 0.51 0.39% RRT 0.54 0.05% RRT 0.62 0.04% RRT 0.67 —— Lipoato 0.26% RRT 1.55 0.11% Ácido lipoico 0.11% **Total desc. 0.78%** **Total Imp. 1.15%**	RRT 0.39 0.12% RRT 0.51 1.04% RRT 0.54 0.14% RRT 0.62 0.13% RRT 0.67 —— Lipoato 0.24% RRT 1.55 0.11% Ácido lipoico 0.11% **Total desc. 1.54%** **Total Imp. 1.89%**	RRT 0.39 0.18% RRT 0.51 1.49% RRT 0.54 0.31% RRT 0.62 0.20% RRT 0.67 —— Lipoato 0.36% RRT 1.55 0.11% Ácido lipoico 0.21% **Total desc. 2.29%** **Total Imp. 2.86%**

AC–LACE–03–56	3.0% LACE–I, sin HP*B*CD	**Condiciones**: Almacenado a 25ºC, LDPE frascos gotero, manto de N_2 inicialmente, sin bolsa o barredor de oxígeno				
	Especificaciones	T = 24 h	T = 48 h	T = 8 días	T = 17 días	T = 20 días
Sustancias relacionadas	Único desconocido: NMT 0.5% Total desconocidos: NMT 2.0% Ácido lipoico: NMT 1.0%	RRT 0.39 0.36% RRT 0.63 0.48% RRT 0.71 0.14% RRT 0.76 0.17% Lipoato 0.18% RRT 1.55 0.14% Ácido lipoico 0.21% **Total desc. 1.29%** **Total Imp. 1.68%**	RRT 0.40 0.37% RRT 0.57 0.11% RRT 0.63 0.25% RRT 0.71 0.15% RRT 0.76 0.16% Lipoato 0.21% RRT 1.59 0.13% RRT 1.69 0.11% Ácido lipoico 0.17% **Total desc. 1.28%** **Total Imp. 1.66%**	RRT 0.41 0.35% RRT 0.51 0.38% RRT 0.57 0.82% RRT 0.64 0.36% RRT 0.68 0.37% Lipoato 0.17% RRT 1.57 0.07% Ácido lipoico 0.28% **Total desc. 2.35%** **Total Imp. 2.80%**	RRT 0.40 0.37% RRT 0.50 1.60% RRT 0.52 0.52% RRT 0.55 1.10% RRT 0.61 0.81% RRT 0.67 0.92% Lipoato 0.27% RRT 1.45 0.17% RRT 1.52 0.49% RRT 1.65 0.06% Ácido lipoico 0.07% **Total desc. 6.04%** **Total Imp. 6.38%**	RRT 0.41 0.26% RRT 0.51 2.84% RRT 0.59 0.82% RRT 0.62 0.85% RRT 0.67 —— Lipoato 0.24% RRT 1.45 0.21% RRT 1.52 0.51% RRT 1.67 0.05% Ácido lipoico 0.06% **Total desc. 5.54%** **Total Imp. 5.84%**

Tabla 15–1: (Estudio #0205)

Lote#	AC–LACE–05–21
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares de API:HPbCD	1:1
API Lote#	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa de N_2
Condiciones	5C

Lote # AC–LACE–05–21, 5°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem	4 Sem	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	303			307	310	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	33.0			31.0	32.6	–		
Sustancias relacionadas	Info. todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.51		0.06	0.12	0.21	–		0.19
		0.68	Lace oxidado	0.03	0.02	0.05			0.04
		1.00	API	98.95	99.40	99.07			99.13
		1.65		0.26	0.29	0.38			0.34
		1.86		0.08	0.08	0.13			0.17
		4.05	Ácido lipoico	0.50	ND	0.06			0.13
Total impurezas		1.05			0.60	0.93			0.87

Tabla 15–2: (Estudio #0205)

Efecto de concentración de LACE–I y diferentes relaciones molares de LACE–Yoduro/HP–B–CD

Lote#	AC–LACE–05–21
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares de API:HPbCD	1:1
API Lote#	
Cierre recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	25C

Lote # AC–LACE–05–21, 25°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	4 Sem.	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	303			308	304	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	33.0			30.8	32.5	–		
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.51		0.06	0.17	0.29	–		0.19
		0.68	Lace oxidado	0.03	0.85	1.87			0.04
		1.00	API	98.95	98.07	96.62			99.13
		1.65		0.26	0.37	0.32			0.34
		1.86		0.08	0.26	0.31			0.17
		4.05	Ácido lipoico	0.50	0.18	0.39			0.13
Total Impurezas		1.05			1.93	3.38			0.87

Tabla 15–3: (Estudio #0205)

Efecto de la concentración de LACE–I y diferentes relaciones molares de LACE–Yoduro/HP*B*CD

Lote#	AC–LACE–05–21
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares de API:HPbCD	1:1
API Lote#	
Cierre recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	40C

Lote # AC–LACE–05–21, 40°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	4 Sem.	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	303			312	310	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	33.0			30.8	32.1	–		
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.51		0.06	0.18	0.38	–		0.19
		0.68	Lace oxidado	0.03	6.46	8.18			0.04
		1.00	API	98.95	91.97	89.23			99.13
		1.65		0.26	0.22	0.26			0.34
		1.86		0.08	0.32	0.50			0.17
		4.05	Ácido lipoico	0.50	0.65	1.32			0.13
Total Impurezas		1.05			8.03	10.77			0.87

Tabla 15–4: (Estudio #0205)

Efecto de la concentración de LACE–I y diferentes relaciones molares de LACE–Yoduro/HPBCD

Lote #	AC–LACE–05–21B
Descripción	1.92% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	5C

Lote # AC–LACE–05–21, 5°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	4 Sem.	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.5			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	299			312	310	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	20.5			19.4	20.8	–		
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.51		0.07	0.11	0.20	–		0.19
		0.53		ND	ND	0.09			
		0.68	Lace ox.	0.03	ND	0.05			0.04
		1	API	99.35	99.37	99.01			99.13
		1.65		0.35	0.22	0.41			0.34
		1,86		0.09	0.13	0.19			0.17
		2,28		ND	0.08	ND			
		4,05	Ácido lipoico	ND	0.03	ND			0.013
Total Impurezas		0.65			0.63	0.99			0.87

Tabla 15–5: (Estudio #0205)

Efecto de la concentración de LACE–I y diferentes relaciones molares de LACE–Yoduro/HPBCD

Lote #	AC–LACE–05–21B
Descripción	1.92% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPBCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	25C

Lote # AC–LACE–05–21, 25°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	4 Sem.	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.5			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	299			308	305	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	20.5			19.5	20.7	–		
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.51		0.07	0.12	0.24	–		0.19
		0.53		ND	ND	0.11			
		0.68	LACE oxid	0.03	1.01	4.40			0.04
		1	API	99.35	97.91	94.04			99.13
		1.65		0.35	0.36	0.30			0.34
		1,86		0.09	0.31	0.47			0.17
		2,28		ND	0.09	ND			
		4,05	Ácido lipoico	ND	0.14	0.40			0.013
Total Impurezas		0.65			2.09	5.96			0.87

Tabla 15–6: (Estudio #0205)

Efecto de la concentración de LACE–I y diferentes relaciones molares de LACE–Yoduro/HP*B*CD

Lote #	AC–LACE–05–21B
Descripción	1.92% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	40C

Lote # AC–LACE–05–21B, 40°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	4 Sem.	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.5			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	299			312	308	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	20.5			19.6	20.4	–		
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.51		0.07	0.17	0.32	–		0.19
		0.53		ND	ND	0.15			
		0.68	LACE oxid	0.03	14.01	16.95			0.04
		1	API	99.35	84.49	89.46			99.13
		1.65		0.35	0.28	0.28			0.34
		1,86		0.09	0.27	0.51			0.17
		2,28		ND	0.10	ND			
		4,05	Ácido lipoico	ND	0.67	1.27			0.13
Total Impurezas		0.65			15.51	10.54			0.87

Tabla 15–7: (Estudio #0205)

Efecto de la concentración de LACE–I y diferentes relaciones molares de LACE–Yoduro/HP*B*CD

Lote #	AC–LACE–05–23
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1.5
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	5C

Lote # AC–LACE–05–23, 5°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	4 Sem.	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	297			300	298	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	32.0			32.2	32.2	–		
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.49		0.05	0.09	0.18	–		0.19
		0.52		ND	ND	0.06			
		0.61	LACE oxid	0.04	0.04	0.08			0.04
		1.00	API	99.10	99.29	98.45			99.13
		1.52		0.34	0.39	0.42			0.34
		1,73		0.07	0.08	0.17			0.17
		4,11	Ácido lipoico	0.28	ND	0.06			0.13
Total Impurezas		0.68			0.71	1.55			0.87

Tabla 15–8: (Estudio #0205)

Efecto de la concentración de LACE–I y diferentes relaciones molares de LACE–Yoduro/HPBCD

Lote #	AC–LACE–05–23
Descripción	1.92% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1.5
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	25C

Lote # AC–LACE–05–23, 5°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	4 Sem.	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	297			300	297	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	32.0			32.2	32.2	–		
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.49		0.05	0.09	0.21	–		0.19
		0.52		ND	ND	0.07			
		0.61	LACE oxid	0.04	0.04	3.56			0.04
		1.00	API	99.10	99.29	95.00			99.13
		1.52		0.34	0.39	0.32			0.34
		1,73		0.07	0.08	0.30			0.17
		4,11	Ácido lipoico	0.28	ND	0.38			0.13
Total Impurezas		0.68			0.71	5.00			0.87

Tabla 15–9: (Estudio #0205)

Efecto de la concentración de LACE–I y diferentes relaciones molares de LACE–Yoduro/HP*B*CD

Lote #	AC–LACE–05–23
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1.5
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	40C

Lote # AC–LACE–05–23, 40°C; Fecha inicio: 01/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	4 Sem.	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA	PASADA		
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6			–	–	–		
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	297			301	299	–		
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ	BLOQ		
Viscosidad	TBD	–			–	–	–		
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	32.0			32.2	32.2	–		
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.49		0.05	0.13	0.15	–		0.19
		0.61	LACE oxidado	0.04	27.07	21.07			0.04
		1.00	API	99.10	71.56	76.39			99.13
		1.52		0.34	0.23	0.29			0.34
		1.73		0.07	0.41	0.52			0.17
		4,11	Ácido lipoico	0.28	0.48	1.18			0.13
Total Impurezas		0.68			2.13	23.61			0.87

Tabla 16–1: (Estudio #0214)

Procesamiento "sin nitrógeno" de LACE–Yoduro en HP*B*CD: Efecto sobre la estabilidad

Lote #	AC–LACE–05–39
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	5C

Lote # AC–LACE–05–39, 5°C; Fecha inicio: 13/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	1 Mes	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA			
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.7			–	–			
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	304			302	298			
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ			
Viscosidad	TBD	–			–	–			
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	31.6			32.7	31.3			
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %		Área %	Área %
		0.51		0.08	0.16	0.09			0.10
		0.53		0.03	ND	0.03			ND
		0.68		ND	ND	0.04			0.04
		0.93		ND	ND	0.05			ND
		1.00	API	99.26	99.19	99.19			99.13
		1,36		0.10	ND	0.05			ND
		1.65		0.39	0.42	0.42			0.34
		1.86		0.04	0.09	0.07			ND
		2.28		ND	0.08	0.07			0.17
		4.05	Ácido lipoico	ND	ND	0.06			0.13
Total Impurezas		0.74			0.81	0.81			0.87

Tabla 16–2: (Estudio #0214)

Procesamiento "sin nitrógeno" de LACE–Yoduro en HP*B*CD: Efecto sobre la estabilidad

Lote #	AC–LACE–05–39
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	25C

Lote # AC–LACE–05–39, 25°C; Fecha inicio: 13/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	1 Mes	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA			
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.7			–	–			
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	304			300	299			
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ			
Viscosidad	TBD	–			–	–			
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	31.6			33.3	30.3			
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %		Área %	Área %
		0.51		0.08	0.20	0.17			0.10
		0.53		0.03	0.04	0.04			ND
		0.68		ND	ND	0.06			0.04
		0.93		ND	ND	0.04			ND
		1.00	API	99.26	99.82	98.46			99.13
		1,23		ND	ND	0.25			ND
		1.36		0.10	0.08	0.06			0.34
		1.65		0.39	0.41	0.40			ND
		1.86		0.04	0.11	ND			0.17
		2.228		ND	0.09	0.09			0.13
		4.05	Ácido lipoico	ND	0.043	0.43			
Total Impurezas		0.74			1.18	1.54			0.87

Tabla 16–3: (Estudio #0214)

Procesamiento "sin nitrógeno" de LACE–Yoduro en HP*B*CD: Efecto sobre la estabilidad

Lote #	AC–LACE–05–39
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	40C

Lote # AC–LACE–05–39, 40°C; Fecha inicio: 13/07/2016									
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	1 Mes	2 Meses	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA			
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.7			–	–			
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	304			302	302			
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	BLOQ			
Viscosidad	TBD	–			–	–			
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	31.6			33.7	31.1			
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %		Área %	Área %
		0.51		0.08	0.16	0.20			0.10
		0.53		0.03	ND	ND			ND
		0.68		ND	ND	0.12			0.04
		0.93		ND	ND	ND			ND
		1.00	API	99.26	97.93	97.19			99.13
		1,36		0.10	0.11	0.33			ND
		1.65		0.39	0.32	ND			0.34
		1.86		0.04	0.18	0.29			ND
		2.28		ND	0.06	0.08			0.17
		4.05	Ácido lipoico	ND	1.01	1.80			0.13
Total Impurezas		0.74			2.08	2.81			0.87

Tabla 17–1: (Estudio #0225)

Formulación de LACE–Yoduro en Cavitron HP*B*CD y 0,23% HPMC Efecto sobre la estabilidad

Lote #	AC–LACE–07–01
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	5C

Lote # AC–LACE–07–01, 5°C; Fecha inicio: 19/08/2016								
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem.	1 Mes	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA			
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6			-			
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	280			-			
Especies asociativas	TBD				-			
Viscosidad	TBD (cP)	10			–			
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	28.6			29.4			
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %		Área %
		0.50		0.04	0.12			0.20
		0.59		0.07	0.09			0.04
		0.74		0.02	0.04			
		0.86		0.08	0.04			
		0.91		0.02	ND			
		1,00	API	99.15	99.18			99.13
		1.13		0.08	0.15			
		1.27		0.38	0.32			0.34
		1.42		0.07	0.08			0.17
		3.07	Ácido lipoico	ND	ND			0.13
Total Impurezas		0.85			0.82			0.87

Tabla 17–2: (Estudio #0225)

Formulación de LACE–Yoduro en Cavitron HP*B*CD y 0,23% HPMC Efecto sobre la estabilidad

Lote #	AC–LACE–07–01
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	25C

Lote # AC–LACE–07–01, 25°C; Fecha inicio: 19/08/2016								
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem	1 Mes	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA						
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6						
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	280						
Especies asociativas	TBD							
Viscosidad	TBD	10						
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	28.6						
Sustancias relacionadas	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %		Área %
		0.50		0.04	0.15			0.20
		0.59		0.07	0.10			0.04
		0.74		0.02	0.02			
		0.86		0.08	0.025			
		0.91		0.02	ND			
		1.00	API	99.15	98.93			99.13
		1.13		0.08	ND			
		1.27		0.38	0.49			0.34
		1.42		0.07	0.07			0.17
		3.07	Ácido lipoico	ND	0.21			0.13
Total Impurezas		0.85			1.07			0.87

Tabla 17–3: (Estudio #0225)

Formulación de LACE–Yoduro en Cavitron HP*B*CD y 0,23% HPMC Efecto sobre la estabilidad

Lote #	AC–LACE–07–01
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, en bolsa, barredor de oxígeno, capa N2
Condiciones	40C

Lote # AC–LACE–07–01, 40°C; Fecha inicio: 19/08/2016								
Ensayo	Especificación	T = 0			2 Sem	1 Mes	3 Meses	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA						
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.6						
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	280						
Especies asociativas	TBD							
Viscosidad	TBD	10						
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	28.6						
Sustancias relacionadas	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %		Área %
		0.50		0.04	0.19			0.20
		0.59		0.07	0.14			0.04
		0.74		0.02	ND			
		0.86		0.08	ND			
		0.91		0.02	ND			
		1.00	API	99.15	98.19			99.13
		1.13		0.08	0.20			
		1.27		0.38	0.37			0.34
		1.42		0.07	0.08			0.17
		3.07	Ácido lipoico	ND	0.84			0.13
Total Impurezas		0.85			1.82			0.87

Tabla 18–1: (Estudio #0226)

Formulación de LACE–Yoduro en Cavitron HP*B*CD en relación molar 1:1 (almacenado sin protección de oxígeno (sin barredores de O2, sin capa N2, sin bolsa)

Efecto sobre la estabilidad

Lote #	AC–LACE–05–39
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, sin barredores de O2, sin capa N2, sin bolsa
Condiciones	5C

Lote # AC–LACE–05–39, 5°C; Barredores O2 eliminados: 19/08/2016									
Ensayo	Especificación	Embotellado inicial 13–7–16			T0 (barr. O2) 1 Mes	2 Sem (sin barr O2)	4 Sem (sin barr O2)	Ctrl. (barr O2 2 Meses)	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA			
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.7				–			
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	304			298	–			
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	–			
Viscosidad	TBD	–			–	–			
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	31.6			31.3	–			
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.51		0.08	0.09	0.13			0.10
		0.53		0.03	0.03	0.04			ND
		0.68		ND	0.04	0.06			0.04
		0.93		ND	0.05	ND			ND
		1.00	API	99.26	99.19	97.78			99.13
		1,2		ND	ND	0.105			ND
		1,36		0.10	0.05	0.39			ND
		1.65		0.39	0.42	0.35			0.34
		1.86		0.04	0.07	ND			ND
		2.28		ND	0.07	ND			0.17
		4.05	Ácido lipoico	ND	0.06	0.15			0.13
Total Impurezas		0.74			0.81	1.22			0.87

Tabla 18–2: (Estudio #0226)

Formulación de LACE–Yoduro en Cavitron HP*B*CD en relación molar 1:1

(almacenado sin protección de oxígeno (sin barredores O2, sin capa N2, sin bolsa)

Efecto sobre la estabilidad (5<, 25<)

Lote #	AC–LACE–05–39
Descripción	3% LACE–I/ HP*B*CD
Equivalentes molares molares de API:HPbCD	1:1
API Lote #	
Cierre de recipiente	LDPE, sin barredores O2, sin capa N2, sin bolsa
Condiciones	25C

Lote # AC–LACE–05–39, 25°C; Barredores O2 eliminados: 19/08/2016									
Ensayo	Especificación	Embotellado inicial 13–7–16			T0 (barr.O2 1 Mes)	2 Sem (sin barr O2)	4 Sem (sin barr O2)	Ctrl. (barr O2 2 Meses)	API
Apariencia	Transparente, amarillo claro	PASADA			PASADA	PASADA			
pH	4.5 (4.0–5.0)	4.7				–			
Osmolalidad	300 (280–320) mOsm	304			298	–			
Especies asociativas	TBD	BLOQ			BLOQ	–			
Viscosidad	TBD	–			–	–			
Ensayo, API	30 (27–33) mg/g	31.6			31.3	–			
Sustancia relacionada	Informe todas las impurezas > 0.05 %	RRT	Impureza	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
		0.51		0.08	0.09	0.37			0.10
		0.53		0.03	0.03	0.16			ND
		0.68		ND	0.04	0.19			0.04
		0.93		ND	0.05	ND			ND
		1.00	API	99.26	99.19	98.47			99.13
		1,2		ND	ND	0.105			ND
		1,36		0.10	0.05	0.15			ND
		1.65		0.39	0.42	0.38			0.34
		1.86		0.04	0.07	ND			ND
		2.28		ND	0.07	ND			0.17
		4.05	Ácido lipoico	ND	0.06	ND 0.29			0.13
Total Impurezas		0.74			0.81	1.53			0.87

Ejemplo 19

Método de formulación para la solución de producto farmacológico LACE-yoduro

Secuencia de proceso general.

LACE-I / HPbCD (Sin HPMC).

1. En un vaso de precipitados, agregar en orden: WFI, alanina, glicerol, HP-*B*-CD y solución de cloruro de benzalconio (BAK 0,005 g/mL en WFI).

2. Colocar el vaso en la agitadora magnética para combinar excipientes.

3. Ajustar el pH usando HCl 1 N, pH objetivo 4,5.

4. Colocar el vaso de precipitados en recipiente encamisado conectado al circulador de calefactor/refrigerador de agua ajustado a 25°C (agregar agua destilada al recipiente encamisado para lograr una conductividad térmica). Sumergir la paleta mezcladora Scilogix y agitar a aproximadamente 500 r. p. m.

5. Agregar API en pequeños incrementos mientras se agita. Una vez completada la adición del API, dejar que la formulación se agite durante 45–60 minutos para asegurar una disolución completa.

6. Retirar el vaso de precipitados del aparato de mezcla y pesar. Agregar WFI para tener en cuenta cualquier pérdida debida a la evaporación.

7. Filtrar la formulación (0,2 uM PVDF).

LACE-I con 0,23% de HPMC (proceso de dos soluciones).

A. Solución 1: 1,16% (p/p) solución de hipromelosa 2910 en WFI.

1. En un vaso de precipitados añadir WFI.

2. Colocar el vaso de precipitados en recipiente encamisado conectado al circulador de calefactor/refrigerador de agua ajustado a 90°C (agregar agua destilada al recipiente encamisado para lograr una conductividad térmica). Sumergir la paleta mezcladora Sciolgex y agitar a aproximadamente 400 r. p. m.

3. Una vez que WFI está a 2: 70°C, comenzar a agregar Hipromelosa 2910 para dispersar. Aumentar la velocidad de mezcla a 650 r. p. m.

4. Una vez que se haya agregado toda la HPMC, reducir la temperatura del circulador calefactor/refrigerador de agua hasta 10°C y continuar mezclando.

5. Cuando la solución se haya enfriado y se vuelva transparente y viscosa, retirar el vaso de precipitados del aparato de mezcla y pesar. Agregar WFI para tener en cuenta cualquier pérdida debida a la evaporación.

B. Solución 2 - Formulación LACE sin HPMC.

1. En un vaso de precipitados, agregar en orden: WFI, alanina, glicerol, HP-*B*-CD.

2. Colocar el vaso de precipitados en recipiente encamisado conectado al circulador de calefactor/refrigerador de agua ajustado a 25°C (agregar agua destilada al recipiente encamisado para lograr una conductividad térmica). Sumergir la paleta mezcladora Sciolgex y agitar a aproximadamente 500 r. p.m.

3. Ajustar el pH usando HCl 1 N a 4,18.

4. Agregar API en pequeños incrementos mientras se agita. Una vez completada la adición del API, dejar que la formulación se agite durante 45–60 minutos para asegurar una disolución completa.

5. Agregar la solución de BAK (BAK 0,005 g/mL en WFI).

6. Retirar el vaso de precipitados del aparato de mezcla y pesar. Agregar WFI para tener en cuenta cualquier pérdida debida a la evaporación.

7. Medir el pH y ajustar, si es necesario.

C. Combinar Soluciones 1 y 2.

1. Pesar una porción designada de la Solución 1 en un vaso de precipitados.

2. Colocar el vaso de precipitados en recipiente encamisado conectado al circulador de calefactor/refrigerador de agua ajustado a 25°C (agregar agua destilada al recipiente encamisado para lograr una conductividad térmica). Sumergir la paleta mezcladora Sciolgex y agitar a aproximadamente 130 r. p. m.

3. Agregar la solución 2 a la solución 1 mientras se mezcla.

4. Retirar el vaso del aparato de mezcla.

5. Filtrar por esterilización utilizando un filtro PVDF de 0,2 µM.