

Experimental Report 1: Bioavailability and Patient Compliance

1. Comparison of bioavailability for SEDDS and solid dispersion formulations (new data)

A single dose comparative bioavailability study of NRC-AN-019 in beagle dogs by oral route was studied (study no. PK-NRC-031).

The test item, NRC-AN-019 tablets prepared by solid dispersion technology corresponding to example 61 of the application, is compared with an NRC-AN-019 liquid formulation corresponding to example 26 in WO 2012/120328 A1 (prepared by SEDDS technology).

A total number of twelve dogs, divided into two groups were used. Each group consists of three male and three female dogs. In period I, group 1 animals were treated with NRC-AN-019 (solid dispersion tablet formulation) whereas group 2 animals were treated with NRC-AN-019 (liquid SEDDS formulation). After nine days of wash out period, in period II, group 1 animals were treated with NRC-AN-019 (liquid SEDDS formulation) whereas group 2 animals were treated with NRC-AN-019 (solid dispersion tablet formulation).

All the animals were fasted (food but not water) overnight (about fifteen hours) prior to administration of the test item. The tablet and liquid formulations were administered by oral route. The solid dispersion tablet formulation was administered at a dose level of 28 mg/kg body weight. The liquid SEDDS formulation was administered at a dose level of 14 mg/kg (1.4 mL/kg) body weight. After administration of the test item, 10 mL drinking water was administered orally. Food and water was provided to the animals after two hours of dosing.

A total of thirteen blood samples were collected from each period and each animal from the cephalic vein in 2 mL K2 EDTA vacutainers. The pre-dose blood sample of 2.0 mL (0.0 hr) was collected before dosing on day 1 from all the animals. The post-dose blood samples (2.0 mL each) were collected on day 1 at 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0 and 12.0 hours in each period. 24 hr sample was collected on day 2. A wash out period of at least nine days between treatments was given.

Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4°C and plasma was separated, immediately transferred and stored at -20 ± 3°C. Then, subsequent analytical procedure was followed with the use of liquid chromatography mass spectrometry technique. The areas under the blood drug concentration versus time curves are calculated by the trapezoidal rule. The analysis was done with respect to AUC (area under curve), C_{max} (maximum concentration) and T_{max} (time of maximum concentration).

The mean AUC (ng.hr/mL) and C_{max} (ng/mL) values obtained are shown in the following table.

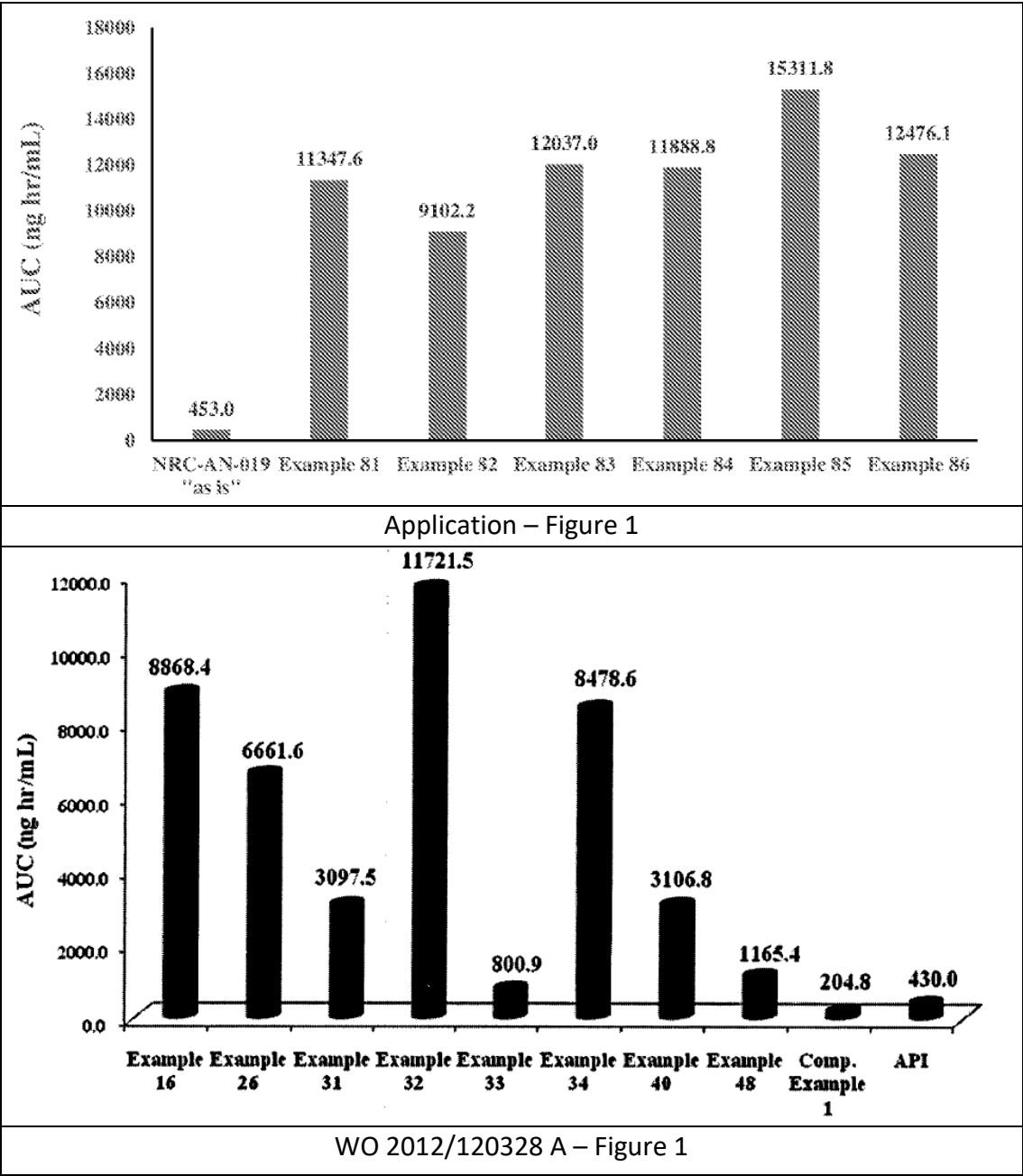
product	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-t} (ng.hr/mL)	AUC _{0-inf} (ng.hr/mL)	T _{max} (hr)
solid dispersion	594.4	4003.2	4916.7	4.2
SEDDS formulation	638.3	3537.6	4425.8	3.0

2. Comparison of bioavailability for SEDDS and solid dispersion formulations (application as filed and WO 2012/120328 A)

The application as filed sets out in Figure 1 bioavailabilities achieved from the NRC-AN-019 solid dispersion formulations of examples 81 to 86 in an albino wistar rat model. The dosage used was 40 mg/kg.

WO 2012/120328 A also sets out in Figure 1 bioavailabilities achieved from various NRC-AN-019 SEDDS formulations in an equivalent albino wistar rat model. The dosage used was 20 mg/kg.

Figure 1 from WO 2012/120328 A and Figure 1 from the present application are set out below. It can be seen that the solid dispersions delivered *at least as good* bioavailability as the SEDDS formulations, with each solid dispersion out performing most or all of the SEDDS formulations.



3. Patient compliance for SEDDS formulations

Patient compliance with administration of the known SEDDS formulation as disclosed in WO 2012/120328 A1 has been assessed.

Patients complained about the SEDDS formulation's awkward unpleasant taste which could remain for many hours after dosing, on occasion resulting in nausea and vomiting in those already compromised by their illness. Such problems with unpleasant taste were not observed with the solid dispersion formulation disclosed in the present application, for example the tablets of examples 98 to 107.

Experimental Report 2: Drug Loading

Comparison of drug loading for SEDDS and solid dispersion formulations

Dosage forms comprising NRC-AN-019 were produced using SEDDS technology (according to WO 2012/120328 A1) or using solid dispersion technology (according to the invention).

- The maximum drug loading that could be achieved a SEDDS was around **10 mg of NRC-AN-019 per 1000 mg of the SEDDS**.
- The maximum drug loading that could be achieved a solid dispersion was at least **100 mg of NRC-AN-019 per 800 mg of the solid dispersion**.

On this basis, the following dosage forms were prepared.

Technology	Mass of NRC-AN-019	Mass of dosage form	% drug loaded per gram
SEDDS	228.2 mg	22.36 g	1.0 wt%
Solid dispersion	459.2 mg	5.69 g	8.1 wt%

It can therefore be seen that an eight-fold increase in drug loading (8.1 % vs 1.0 %) can be achieved using solid dispersion technology for NRC-AN-019 compared with use of a SEDDS formulation.

Colombian Patent Application No. NC2018/0007112

NATCO PHARMA LTD

Our Ref: N413840EP RCS/GAB

Experimental Report 3: Stability

Stability of solid dispersion

An NRC-AN-019 solid dispersion according to the invention was stored in high density polyethylene bottles with a desiccant.

After storage of the bottles for 3 years at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$, the stability of solid dispersion was found to be superior compared to a liquid SEDDS formulation.

The solid dispersion did not exhibit any sign of crystallinity (as evidenced by XRD analysis after accelerated stability studies at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH} \pm 5\%$ and $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{ RH} \pm 5\%$) and contained at least about 98% of the initial active ingredient content (as evidenced by HPLC analysis).

In contrast, after 1 year of storage growth of crystals of the active ingredient were observed for the SEDDS formulation. After 2 years storage the SEDDS formulation contained about 69.8% of the initial active ingredient content (as evidenced by HPLC analysis).

Reporte Experimental 1: Biodisponibilidad y Cumplimiento de requerimientos del paciente

1. Comparación de biodisponibilidad en formulaciones SEDDS y dispersiones sólidas (datos nuevos)

Se realizó un estudio comparativo de biodisponibilidad en una dosis única de NRC-AN-019 administrada por vía oral en perros Beagle (estudio No. PK-NRC-031).

Los elementos estudiados, tabletas de NRC-AN-019, fueron preparados mediante tecnología de dispersión solida de acuerdo con el ejemplo 61 del Capítulo Descriptivo. Estos fueron comparados con una formulación líquida de NRC-AN-019 correspondiente al ejemplo 26 en la solicitud WO 2012/120328 A1 (preparada por tecnología SEDDS).

El estudio se realizó sobre un total de 12 perros, divididos en dos grupos. Cada grupo conformado por 3 machos y 3 hembras. En un periodo I, el grupo de animales 1 fue tratado con NRC-AN-019 en formulación de dispersión sólida en tableta, mientras que el grupo de animales 2 fue tratado con NRC-AN-019 en formulación líquida SEDDS. Luego de nueve días de un periodo de lavado, en el periodo II, el grupo de animales 1 fue tratado con NRC-AN-019 en formulación líquida SEDDS, mientras que el grupo de animales 2 fue tratado con NRC-AN-019 en formulación de dispersión solida en tableta.

Todos los animales se encontraban en ayuno (con comida pero no agua) durante la noche (aprox. 15 horas) previo a la administración del elemento de estudio. La tableta y las formulaciones líquidas fueron administradas por vía oral. La formulación de dispersión solida en tableta fue administrada en una dosis de 28 mg/kg del peso corporal. Por el contrario, las formulaciones líquidas SEDDS fueron administradas en una dosis de 14 mg/kg (1.4mL/kg) del peso corporal. Luego de la administración del elemento de estudio, se administró oralmente 10 mL de agua potable. Una vez cumplido dos horas después de la administración, se suministró agua y comida a los animales.

Se recolectó un total de 13 muestras de sangre de la vena cefálica de cada animal y en cada periodo, y se almacenaron en Vacutainers K2 EDTA de 2mL. Las muestras de sangre pre-dosis de 2mL (0.0 horas) fueron recolectadas de todos los animales, previo a las dosis administradas en el día 1. Las muestras de sangre post-dosis de 2mL cada una, fueron recolectadas en el día 1 a la hora 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 10.0 y 12.0 en cada periodo. En el día 2 se recolectó una muestra correspondiente a las 24 horas. Se administró un periodo de lavado de al menos 9 días entre cada tratamiento.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C y el plasma fue separado e inmediatamente transferido y almacenado a $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se realizó un procedimiento analítico con el uso de la técnica de espectrometría de masas con cromatografía líquida. Se calculó el área bajo la curva de concentración del medicamento en sangre vs tiempo, mediante la regla trapezoidal. El análisis se realizó con respecto al AUC (área bajo la curva), C_{max} (Concentración máxima) y T_{max} (tiempo de máxima concentración).

Los valores del promedio de AUC (ng.hr/mL) y el C_{max} (ng/mL) se muestran en la tabla a continuación:

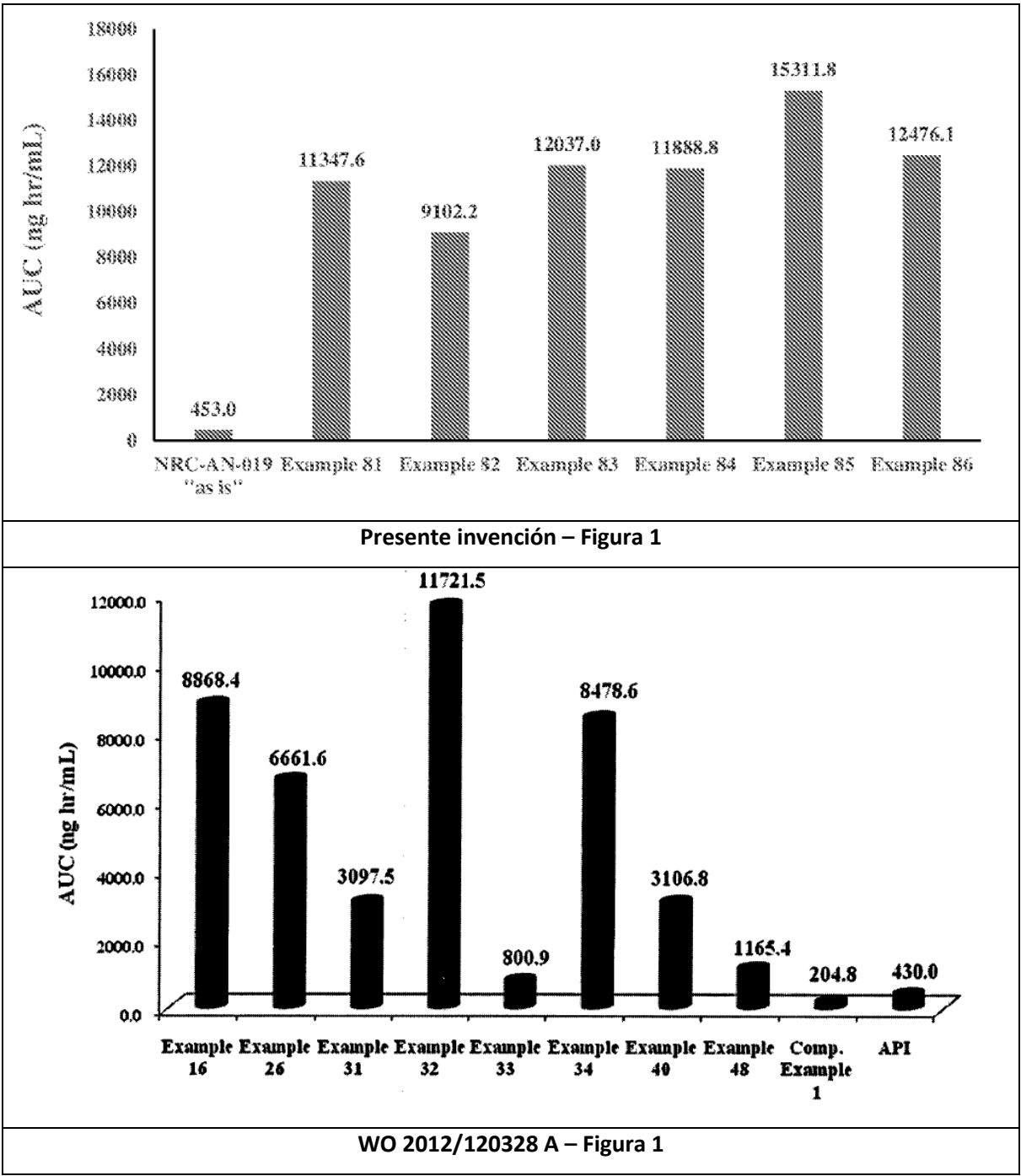
Producto	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng.hr/mL)	$\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ (ng.hr/mL)	T_{max} (hr)
Dispersión solida	594.4	4003.2	4916.7	4.2
Formulación SEDDS	638.3	3537.6	4425.8	3.0

2. *Comparación de biodisponibilidad en formulaciones SEDDS y dispersiones sólidas (datos radicados en la presente solicitud y en WO 2012/120328 A)*

La presente solicitud muestra en la Figura 1 la biodisponibilidad alcanzada en las formulaciones de dispersión solida de NRC-AN-019 de los ejemplos 81 a 86 en un modelo de ratas albinas wistar. La dosis empleada fue de 40 mg/kg.

La solicitud WO 2012/120328 A también muestra en su Figura 1 la biodisponibilidad alcanzada en varias formulaciones NRC-AN-019 en un modelo equivalente de ratas albino wistar. La dosis empelada fue de 20 mg/kg.

La Figura 1 de WO 2012/120328 A y la Figura 1 de la presente invención se presentan a continuación. Allí se puede observar que las dispersiones solidas administradas poseen al menos una biodisponibilidad tan buena a la obtenida en las formulaciones SEDDS, superando incluso muchas o todas a aquellas obtenidas en las formulaciones SEDDS.



3. Cumplimiento de los requerimientos del paciente en formulaciones SEDDS

Se estudió el cumplimiento de los requerimientos del paciente en las formulaciones SEDDS divulgadas en WO 2012/120328 A1.

Los pacientes se quejaron del sabor extraño y desagradable de las formulaciones SEDDS, el cual podía permanecer por muchas horas luego de ser administrado, en ocasiones resultando en náusea y vómito en aquellos pacientes comprometidos por su enfermedad. Dichos problemas de mal sabor no se observaron con las formulaciones de dispersiones sólidas de la presente invención, por ejemplo en las tabletas de los ejemplos 98 a 107.

Reporte Experimental 2: Carga de Fármaco

Estudio comparativo de carga de fármaco para las formulaciones SEDDS y dispersiones sólidas

Se prepararon formas de dosis que comprenden NRC-AN-019 mediante tecnología SEDDS de acuerdo con la invención WO 2012/120328 A1, o mediante tecnología de dispersiones solidas de acuerdo con la presente invención.

- La carga máxima de fármaco que se pudo obtener en formulaciones SEDDS fue aproximadamente de **10 mg de NRC-AN-019 por 1000 mg de SEDDS**.
- La carga máxima de fármaco que se pudo obtener en formulaciones de dispersión solida fue de al menos **100 mg de NRC-AN-019 por 800 mg de la dispersión sólida**.

Con base a lo anterior, se prepararon las siguientes formas de dosis:

Tecnología	Peso de NRC-AN-019	Peso de la forma de dosis	% medicamento cargado por gramo
SEDDS	228.2 mg	22.36 g	1.0 wt%
Dispersión sólida	459.2 mg	5.69 g	8.1 wt%

La anterior tabla muestra un incremento de ocho veces en la carga de fármaco alcanzado (8.1% vs 1%) mediante el uso de tecnología de dispersión sólida para NRC-AN-019, cuando se compara con los valores obtenidos para una formulación SEDDS.

Reporte Experimental 3: Estabilidad

Estabilidad de la dispersión sólida

Se almacenó en botellas de polietileno de alta densidad una dispersión sólida de acuerdo con la presente invención junto con un disecante.

Luego de almacenar las botellas por 3 años a $25 \pm 2^\circ\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\% \text{ HR}$, se encontró que la estabilidad de las dispersiones solidas era superior a las de las formulaciones líquidas SEDDS.

La dispersión solida no presentó ninguna señal de cristalinidad (evidenciado mediante análisis de rayos X luego de un estudio acelerado a $25 \pm 2^\circ\text{C}/60\% \text{ HR} \pm 5\%$ y $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/75\% \text{ HR} \pm 5\%$), y presentó un contenido de al menos 98% del contenido inicial del ingrediente activo (evidenciado mediante HPLC).

En contraste, las formulaciones SEDDS presentaron crecimiento de cristales del ingrediente activo luego de 1 año de almacenamiento. Luego de 2 años de almacenamiento, las formulaciones SEDDS contenían aproximadamente 69.8% del contenido inicial del ingrediente activo (evidenciado por HPLC).