

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 882**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 31/65 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
A61P 31/02 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2016** **PCT/US2016/023646**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016** **WO16154232**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2016** **E 16714168 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020** **EP 3273940**

54 Título: **Composición farmacéutica de tetraciclina para uso dermatológico**

30 Prioridad:

23.03.2015 US 201562137216 P
22.10.2015 US 201562245262 P
04.11.2015 US 201562251001 P
13.12.2015 US 201562266650 P
15.01.2016 US 201662279654 P
04.03.2016 US 201662304119 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2021

73 Titular/es:

BIOPHARMX, INC. (100.0%)
1098 Hamilton Court
Menlo Park CA 94025, US

72 Inventor/es:

CHEN, XIN;
HERMSMEIER, MAIKO C.;
LAC, DIANA;
THOMAS, DOUGLAS W.;
YAM, NOYMI y
YAMAMOTO, AKIRA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 846 882 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica de tetraciclina para uso dermatológico

5 **Campo**

Esta divulgación se refiere generalmente a composiciones farmacéuticas y métodos para preparar dichas composiciones, así como a usos relacionados. Los usos incluyen, por ejemplo, el tratamiento de diversas afecciones y enfermedades dermatológicas, entre otras cosas. Más particularmente, esta divulgación está dirigida a composiciones tópicas estables que comprenden, por ejemplo, un principio activo de la clase de las tetraciclinas, una fuente de magnesio que es una sal de magnesio, un alcohol alifático monohídrico y un poliol que tiene de 3-8 átomos de carbono, en las que (i) la relación entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol está en el intervalo de 1:1 a 99:1 en peso, y (ii) el fármaco de la clase de las tetraciclinas se disuelve en la composición tópica; en las que la composición es no acuosa y tiene menos del 5 % en peso de contenido de agua; y a métodos relacionados para preparar y usar dichas composiciones. También se describen, pero no se reivindican, composiciones estables que comprenden, por ejemplo, minociclina, una sal de magnesio y un compuesto de sulfito en un disolvente no acuoso y métodos relacionados para preparar y usar dichas composiciones.

Antecedentes

Se conocen varios antibióticos de la clase de las tetraciclinas desde hace más de 50 años, pero ha habido relativamente pocas composiciones tópicas desarrolladas comercialmente que contengan estos antibióticos debido a una serie de desafíos que deben abordarse simultáneamente para producir un producto comercialmente exitoso.

Los fármacos de la clase de las tetraciclinas, y la minociclina en particular, son útiles para el tratamiento del acné debido a sus efectos antiinflamatorios. Su uso para el tratamiento del acné se ha demostrado en composiciones administradas por vía oral que han mostrado una buena eficacia. Sin embargo, la administración sistémica de fármacos de la clase de las tetraciclinas suele ir acompañada de efectos secundarios adversos, tales como diarrea, calambres abdominales y mareos. Los niveles sistémicos elevados de fármaco normalmente provocan mayores efectos secundarios sistémicos. Estos pueden reducirse de forma beneficiosa, por ejemplo, usando una composición tópica que administre un fármaco principalmente a la piel, en lugar de principalmente de forma sistémica. Desafortunadamente, las formulaciones tópicas de fármacos de la clase de las tetraciclinas, tal como minociclina, también tienen el potencial de teñir la piel, particularmente después de la aplicación diaria durante varias semanas.

La administración intradérmica o tópica de un fármaco implica la entrada del fármaco a través del estrato córneo para un efecto cutáneo o local en la piel; es decir, el efecto farmacológico del fármaco se localiza en las regiones intracutáneas de penetración y deposición del fármaco. Preferentemente, la absorción intradérmica se produce con poca o ninguna absorción o acumulación sistémica. La absorción intradérmica de un fármaco implica el reparto del fármaco del vehículo aplicado en el estrato córneo, la difusión del fármaco a través del estrato córneo, y el reparto del fármaco desde el estrato córneo hacia la epidermis. Por el contrario, la administración transdérmica implica el transporte de un fármaco a través de la piel de modo que se logre una cantidad terapéutica del fármaco en la circulación sanguínea sistémica.

Las composiciones tópicas que consiguen la administración de un fármaco a través del estrato córneo y la retención de la mayor parte del fármaco por vía intracutánea de modo que no entre en el torrente sanguíneo en cantidades significativas son un desafío de diseño y requieren enfoques innovadores. Varios factores determinan la permeabilidad de la piel o de capas particulares de la piel a un fármaco aplicado por vía tópica. Estos factores incluyen las características de la piel, las características del fármaco (por ejemplo, su tamaño (peso molecular o volumen molecular), lipofilicidad/hidrofiliicidad, polaridad, etc.), la dosis del fármaco aplicado, la concentración y el volumen de la composición a aplicar, interacciones entre el fármaco y el vehículo de administración, interacciones entre el fármaco y la piel, y las interacciones del fármaco y la piel en presencia de los ingredientes en el vehículo de administración. Debido a la multitud de factores implicados en la administración tópica de un fármaco, generalmente se acepta que es incierto si se puede lograr con éxito la administración intracutánea de un fármaco. Por lo tanto, la administración tópica, aunque deseada desde el punto de vista de la conveniencia del paciente y la administración farmacológica, ha sido en gran parte infructuosa para muchos compuestos, incluidas las tetraciclinas, como lo demuestran los relativamente pocos fármacos aprobados para administración tópica.

Un problema importante relacionado con la administración tópica de un antibiótico de la clase de las tetraciclinas es la identificación de un sistema disolvente en el que el fármaco de la clase de las tetraciclinas sea estable, suficientemente soluble y capaz de penetrar en un tejido o fluido corporal diana, tal como el sebo.

Muchos fármacos de la clase de las tetraciclinas son sensibles a la degradación por contacto y/o disolución en agentes oxidantes hidrófilos, reductores o peroxidantes y/o agua. Como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2014/0147504, un desafío importante en el desarrollo de formulaciones tópicas de minociclina ha sido su naturaleza química: el fármaco es inestable en forma de solución y también es sensible a la humedad, la temperatura y la luz. Ha habido varias composiciones que se han desarrollado para abordar los

desafíos asociados con este fármaco. Esta inestabilidad se aplica a todos los fármacos de la clase de las tetraciclinas disponibles actualmente.

Salman *et al.* describen, en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2014/0147504, una composición tópica en la que se suspende una tetraciclina en un medio líquido que no disuelve o disuelve mínimamente la tetraciclina. Si bien este enfoque se describe como limitante de la degradación de la tetraciclina, no se prefieren las composiciones en las que el medio líquido no disuelve el fármaco debido a la incapacidad del fármaco dentro de la formulación para penetrar fácilmente en la piel. Dado que muchos productos aplicados a la piel estarán sujetos a una rápida evaporación, es probable que el fármaco permanezca en la superficie de la piel después de su aplicación.

Dichas formas farmacológicas sólidas no estarán biodisponibles.

Otro enfoque para mantener la potencia de un fármaco de tetraciclina es separarlo de los agentes reactivos potenciales, tal como con un recubrimiento o encapsulación física del fármaco, para limitar su interacción/exposición a los agentes potencialmente reactivos. La encapsulación física se puede lograr mediante una amplia diversidad de técnicas. Por ejemplo, Heggie *et al.* describen una composición para recubrir partículas de minociclina de manera que las partículas se suspendan en un disolvente, en lugar de disolverse en él (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2013/0195986). Sin embargo, este enfoque padece muchos de los mismos problemas descritos anteriormente para el uso de un sistema disolvente en el que el fármaco no se disuelve.

Varios sistemas disolventes propuestos, tales como ungüentos, no son comercialmente viables para el tratamiento del acné debido a que poseen una sensación aceitosa. Peor aún, algunas de estas sustancias pueden promover la afección para la que están diseñadas a tratar, tal como el uso de un material comedogénico como vehículo de administración de una composición diseñada para tratar por vía tópica el acné. Además, algunas sustancias fuertemente hidrófobas, tales como vaselina, cera de parafina y/o alcohol graso, pueden producir una barrera oclusiva que limita la penetración del fármaco en la piel. Además, algunas sustancias hidrófobas tienen una alta viscosidad que limita la difusión del fármaco en la piel, reduciendo así la biodisponibilidad del fármaco y limitando su eficacia.

Las composiciones diseñadas para su uso en áreas no tópicas tienen diferentes limitaciones, de modo que los enfoques o composiciones desarrolladas para uso no tópico pueden no ser adecuados para aplicaciones tópicas. Por ejemplo, las soluciones para inyección intravenosa requieren una composición de base acuosa para que sean compatibles con la inyección en el torrente sanguíneo. Sin embargo, dado que dichas inyecciones se administran normalmente en hospitales y consultorios médicos con controles más estrictos en las fechas de vencimiento y en contacto estrecho con las farmacias, las condiciones de almacenamiento controladas, tales como la refrigeración, pueden ser más apropiadas para las composiciones administradas por vía intravenosa en comparación con las composiciones tópicas que normalmente se almacenan por los pacientes. En la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 2014/0194393, Griffith *et al.* proponen estabilizar una composición acuosa de minociclina usando modificadores de pH, cloruro de magnesio y un antioxidante. Sin embargo, se describe una estabilidad máxima de sólo el 84,32 % después de 2 semanas en condiciones de almacenamiento a oscuras a 37 °C para una composición de minociclina de ejemplo. Este nivel de estabilidad no es suficiente para la mayoría de las aplicaciones farmacológicas. La estabilidad de otras composiciones presentadas en la misma varía, pero generalmente los entornos fuertemente acuosos no promueven la estabilidad de los fármacos de la clase de las tetraciclinas.

Las composiciones farmacológicas aplicadas por vía tópica están destinadas normalmente a administrar un fármaco de manera uniforme a una o más profundidades dentro del tejido cutáneo al que se aplica la composición. Sin embargo, las bacterias para algunas afecciones y enfermedades dermatológicas, tales como la bacteria *P. acnes* para el acné, se encuentran principalmente en ciertos tipos de tejido, tales como los tejidos ricos en lípidos, incluidos los sebocitos, o los fluidos corporales, tal como el sebo. Para dichas afecciones y enfermedades, es más eficaz si la composición farmacológica tópica se puede administrar preferentemente a estos lugares donde se concentran las bacterias.

Existe la necesidad de una composición aplicada por vía tópica que establezca un fármaco activo de la clase de las tetraciclinas que permita al mismo tiempo la suficiente solubilidad en un vehículo de administración que administre el fármaco al tejido diana, tales como las glándulas sebáceas, o se dirige a los fluidos corporales, tal como el sebo. La composición debe mantener un alto grado de potencia, es decir, actividad, del fármaco, proporcionar penetración en la piel, el sebo y/o las glándulas sebáceas en cantidades suficientes para inhibir el crecimiento de bacterias *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) en estos lugares, y no debe teñir visiblemente la piel después de aplicaciones repetidas. Se han proporcionado algunas composiciones que cumplen uno o más de estos criterios, sin embargo, sería deseable proporcionar una composición que satisfaga todos o la mayoría de estos criterios en una única composición.

El documento GB 901107A (Pfizer) describe una composición terapéutica y un método para prepararla, que comprende disolver al menos una sal de tetraciclina de magnesio, calcio o aluminio, o una sal de oxitetraciclina de magnesio, calcio, aluminio o cinc en uno o más de los siguientes disolventes de alcohol alifático polihídrico: glicerina; polietilenglicol; propilenglicol; o formar dicha sal metálica *in situ* haciendo reaccionar los componentes metálicos y antibióticos de la composición en dicho disolvente; la relación molar de metal con respecto a antibiótico es de

aproximadamente 3:1 en el caso de la tetraciclina y de 1:3 a 3:1 en el caso de la oxitetraciclina, y el pH de la solución es de 7,0 a 10.

Breve resumen

5 La presente divulgación supera una o más limitaciones asociadas con las actuales composiciones tópicas que contienen fármacos de la clase de las tetraciclinas. La presente invención se define por las reivindicaciones independientes, mientras que las reivindicaciones dependientes se refieren a las realizaciones preferidas. Por lo tanto, la invención se refiere a composiciones tópicas de acuerdo con la reivindicación 1 (correspondiente al primer aspecto descrito en el párrafo 37), composiciones tópicas para su uso en un método de tratamiento de una afección o enfermedad dermatológica, como se define en la reivindicación 12 (correspondiente al segundo aspecto descrito en el párrafo 65), y un método para preparar las composiciones tópicas, como se define en la reivindicación 14 (correspondiente al tercer aspecto descrito en el párrafo 70). Cualquier "realización", "ejemplo", características "descritas" o "divulgadas" que se divulgan en la descripción pero que no están cubiertos por las reivindicaciones deben considerarse como presentados solo con fines ilustrativos.

En el presente documento se describe, pero no forma parte de la invención, una composición tópica que comprende minociclina, una sal de magnesio, y un compuesto de sulfito en un disolvente no acuoso. La composición puede ser para administración tópica.

20 Los párrafos 16 a 36 describen características opcionales adicionales de dicha divulgación que no forman parte de la invención.

El disolvente no acuoso puede comprender un alcohol alifático monohídrico.

25 El disolvente no acuoso puede comprender un alcohol alifático monohídrico y un poliol. La relación entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol puede estar en un intervalo de 1:1 a 99:1 en peso.

30 La composición puede comprender un porcentaje en peso mayor del alcohol alifático monohídrico que del poliol. Por ejemplo, la relación p/p de alcohol alifático monohídrico con respecto a poliol puede estar en un intervalo de aproximadamente 2:1 a 10:1 en peso.

La minociclina se puede disolver en el disolvente no acuoso.

35 La relación molar de la sal de magnesio con respecto a la minociclina puede estar en un intervalo de aproximadamente 2:1 a 100:1.

En relación con uno cualquiera o más de los anteriores, la sal de magnesio puede ser cloruro de magnesio o una sal de magnesio que tiene un contraión que es más blando que el cloruro.

40 El alcohol alifático monohídrico se selecciona del grupo que consiste en etanol, isopropanol, alcohol propílico, alcohol *tert*-butílico, o combinaciones de los mismos, en particular, etanol.

45 La composición tópica puede comprender de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 4 % en peso de minociclina.

La composición tópica, cuando se almacena a 40 °C en un vial de vidrio cerrado durante un periodo de 4 semanas, puede presentar un aumento en la concentración relativa de 4-epi-minociclina de menos del 1,0 % por semana. La composición tópica, cuando se almacena a 40 °C en un vial de vidrio cerrado durante un periodo de 4 semanas, puede presentar un aumento en la concentración relativa de 4-epi-minociclina de menos del 0,70 % por semana.

50 La composición tópica, cuando se almacena a 25 °C y el 60 % de humedad relativa en un recipiente sellado durante 12 meses, puede contener menos del 7 % de producto de degradación de minociclina, donde el producto de degradación es 4-epi-minociclina.

55 El poliol puede ser un diol o triol C3-C8. En particular, el poliol puede ser propilenglicol.

60 El compuesto de sulfito puede ser una sal de sulfito o un sulfito orgánico. Por ejemplo, el compuesto de sulfito puede ser un compuesto de sulfito, bisulfito, pirosulfito o metabisulfito. En particular, el compuesto de sulfito puede ser un sulfito inorgánico. El sulfito puede ser un sulfito inorgánico que comprende un catión inorgánico seleccionado de sodio, potasio, calcio y magnesio.

65 El compuesto de sulfito puede ser un sulfito orgánico. El sulfito puede ser un éster de ácido sulfuroso. Los sulfitos orgánicos ilustrativos incluyen, por ejemplo, ésteres de ácido sulfuroso, sulfitos acrílicos y sulfitos cíclicos. En particular, el sulfito orgánico puede ser un sulfito de etilo, p-tolilo o isopropilo.

La composición tópica puede comprender de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 3,0 % en peso del compuesto de sulfito. En particular, el sulfito puede seleccionarse del grupo que consiste en sulfito de sodio, bisulfito de sodio y metabisulfito de sodio.

- 5 La composición tópica puede comprender menos de aproximadamente un 3 por ciento en peso de agua. La composición tópica puede comprender menos de aproximadamente un 2 por ciento en peso de agua.

La composición tópica puede comprender además un aceite esencial. El aceite esencial puede ser 1,8-cineol. La composición tópica puede comprender de aproximadamente el 0,01 al 5 por ciento en peso de 1,8-cineol.

- 10 La composición tópica puede comprender un agente espesante. El agente espesante puede ser hidroxipropilcelulosa.

La composición no necesita ser una emulsión y/o no puede comprender nanopartículas o micropartículas.

- 15 La composición tópica puede tener un pH eficaz de 3-6 cuando se mezcla con agua en una relación de 1:9 en peso. La composición tópica puede tener un pH eficaz de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 5,0 cuando se mezcla con agua en una relación de 1:9 en peso.

- 20 La composición puede no ser irritante cuando se aplica a ratas diariamente durante un periodo de 28 días. Por ejemplo, una composición no irritante generalmente no irritará la piel ni provocará una reacción alérgica.

La composición puede no presentar ningún cambio significativo de color después del envejecimiento durante 4 semanas a 40 °C en un recipiente sellado. En relación con lo anterior, ningún cambio de color significativo es un cambio de color de menos de 20 en la distancia en un espacio RGB tridimensional donde cada valor se mide en un intervalo 0-255 y la distancia se calcula en un espacio RGB tridimensional de acuerdo con la siguiente fórmula: $\text{distancia}_{\text{RGB}} = ((\Delta R)^2 + (\Delta G)^2 + (\Delta B)^2)^{0.5}$.

- 25

En un primer aspecto, se proporciona una composición tópica que comprende un fármaco de la clase de las tetraciclinas o una sal o solvato del mismo, una fuente de magnesio tal como una sal de magnesio, un alcohol alifático monohídrico y un poliol que tiene de 3-8 átomos de carbono, en las que (i) la relación entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol está en el intervalo de 1:1 a 99:1 en peso, y (ii) el fármaco de la clase de las tetraciclinas se disuelve en la composición tópica; en la que la composición no es acuosa y tiene menos del 5 % en peso de contenido de agua.

- 30
- 35 En algunas realizaciones, en relación con el primer aspecto, la fuente de magnesio es eficaz para estabilizar el fármaco de tetraciclina.

En una o más realizaciones relacionadas con el primer aspecto, la relación molar de magnesio (de la fuente de magnesio) con respecto al fármaco de tetraciclina está en un intervalo de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 100:1. En algunas realizaciones relacionadas, la fuente de magnesio es una sal de magnesio que tiene un contraión cloruro o un ión que es más blando que el cloruro.

- 40

En una o más realizaciones adicionales, el fármaco de la clase de las tetraciclinas es minociclina, y la fuente de magnesio es eficaz para estabilizar la minociclina, por ejemplo, tras el almacenamiento de la composición en un recipiente sellado durante 12 meses a 25 °C y el 60 % de humedad relativa, la composición contiene menos del 7 % de producto de degradación de minociclina, donde el producto de degradación es el epímero, 4-epi-minociclina. Por ejemplo, en las condiciones de almacenamiento anteriores, la relación de minociclina con respecto a epímero, en una base p/p, es mayor de aproximadamente 13:1. Preferentemente, la relación de minociclina con respecto a epímero, en una base p/p, es mayor de aproximadamente 15:1.

- 45
- 50

En algunas realizaciones adicionales, al menos el 90 % de la minociclina permanece en su forma activa (es decir, forma no epimerizada) después del almacenamiento durante 12 meses a 25 °C y el 60 % de humedad relativa.

- 55 En una o más realizaciones de la composición, el alcohol alifático monohídrico es un líquido a temperatura ambiente. En una o más realizaciones adicionales, el alcohol alifático monohídrico se selecciona del grupo que consiste en etanol, isopropanol, alcohol propílico, alcohol *tert*-butilico, y combinaciones de los mismos.

En aún algunas realizaciones adicionales, el alcohol alifático monohídrico es un alcohol alifático monohídrico volátil.

- 60 En aún algunas realizaciones adicionales relacionadas con el componente de poliol, el poliol es un líquido a temperatura ambiente. En una o más realizaciones particulares, el poliol es un diol o un triol C3-C8. En aún algunas realizaciones más particulares, el poliol es propilenglicol.

- 65 En aún algunas realizaciones adicionales dirigidas al poliol, el poliol no es glicerol ni glicerina.

En algunas realizaciones particulares de la composición, la fuente de magnesio se selecciona del grupo que consiste en cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, salicilato de magnesio e hidratos y combinaciones de los mismos.

En una o más realizaciones preferidas, el fármaco de la clase de las tetraciclinas es minociclina o una sal o solvato de la misma. Por ejemplo, la composición puede comprender de aproximadamente el 0,01 al 10 por ciento en peso de minociclina o una sal o solvato de la misma. En una o más realizaciones preferidas, la minociclina no es un hidrato.

En otras realizaciones, el fármaco de la clase de las tetraciclinas se selecciona del grupo que consiste en tetraciclina, tigeciclina, limeciclina y doxiciclina, y sales o solvatos de las mismas.

En aún otra realización, el fármaco de la clase de las tetraciclinas es una fluorociclina.

En una o más realizaciones adicionales, la composición comprende además un agente espesante. En algunas realizaciones particulares, el agente espesante es hidroxipropilcelulosa.

En algunas realizaciones adicionales de la composición, la composición posee una viscosidad en un intervalo de 75 a 10.000 mPa·s (centipoise) a 25 °C. En algunas realizaciones adicionales del primer aspecto, la composición comprende uno o más aditivos adicionales, tales como, por ejemplo, un antioxidante, un espesante, colorante u otro aditivo adecuado.

En algunas realizaciones adicionales, la composición tópica no es una emulsión.

En algunas realizaciones adicionales, la composición tópica no comprende nanopartículas o micropartículas.

En determinadas realizaciones, la composición tópica es anhidra.

En una o más realizaciones adicionales, la composición tiene un pH eficaz de 3-6 cuando se mezcla con agua en una relación de 1:9 en peso.

En una o más realizaciones adicionales, la composición tiene un pH eficaz de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 5,0 cuando se mezcla con agua en una relación de 1:9 en peso.

En algunas realizaciones, la eficacia de penetración de la composición de acuerdo con el primer aspecto y realizaciones relacionadas en la piel facial humana *ex vivo* multiplicada por la concentración del fármaco de la clase de las tetraciclinas en la composición tópica excede la concentración inhibitoria mínima (MIC) del fármaco para una bacteria diana en un tejido diana o fluido corporal diana. En una o más realizaciones relacionadas, la bacteria diana es *P. acnes*.

En algunas realizaciones adicionales, la eficacia de penetración en la piel facial humana *ex vivo* supera el 5 %. En aún algunas realizaciones adicionales, la eficacia de penetración en la piel facial humana *ex vivo* está en el intervalo del 5 % al 30 %. En algunas realizaciones, la eficacia de penetración del fármaco de la clase de las tetraciclinas superará el 5 %, más preferentemente superará el 8 %, o más preferentemente superará el 10 %. En algunas realizaciones, la eficacia de penetración del fármaco de la clase de las tetraciclinas estará en el intervalo del 5 % al 30 %, o estará en el intervalo del 5 % al 25 %, o estará en el intervalo del 5 % al 10 %, o más preferentemente en el intervalo del 10 % al 30 %.

En aún algunas realizaciones adicionales, la composición se seca en menos de 60 segundos cuando se aplica a una región de la piel *in vivo*.

En aún algunas realizaciones adicionales en las que la composición comprende un poliol y 1,8-cineol, la combinación del poliol y el 1,8-cineol es eficaz para evitar que la piel se descame y se seque de forma extrema debido al uso prolongado durante dos semanas o más cuando se aplica al menos 3 veces por semana.

En aún una o más realizaciones adicionales, la composición no tinte el tejido cutáneo cuando se aplica a una región de piel humana o de rata *in vivo* diariamente durante 2 semanas.

En aún algunas realizaciones adicionales, la composición no es irritante para un tejido cutáneo cuando se aplica a una región de piel humana o de rata *in vivo* diariamente durante 2 semanas, por ejemplo, cuando la composición contiene de aproximadamente el 0,1 % (p/p) a aproximadamente el 10 % (p/p) de fármaco de la clase de las tetraciclinas.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento se pueden aplicar directamente sobre la piel. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden aplicarse a la córnea o a la conjuntiva.

Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse en un método de tratamiento del acné en un

sujeto humano que comprende aplicar por vía tópica una cantidad eficaz de la composición a una superficie corporal epitelial exterior del ser humano.

En un segundo aspecto, se proporciona una composición tópica de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en un método de tratamiento de una afección o enfermedad dermatológica que comprende las etapas de aplicar la composición tópica a una superficie epitelial exterior de un cuerpo mamífero al menos una vez al día durante un periodo de al menos 1 semana. La etapa de aplicación puede comprender aplicar la composición tópica a la piel una o dos veces al día durante un periodo de aproximadamente 6 a aproximadamente 52 semanas.

También se describe en el presente documento, pero no se reivindica, un método para tratar una afección o enfermedad que responde al tratamiento con un fármaco de la clase de las tetraciclinas en un ser humano, donde el método comprende aplicar por vía tópica una composición como se proporciona en el presente documento a una superficie epitelial exterior de un cuerpo humano al menos diariamente durante un periodo de al menos 1 semana, opcionalmente una o dos veces al día durante un periodo de aproximadamente 6 a aproximadamente 52 semanas.

La afección o enfermedad dermatológica puede ser acné o rosácea. En particular, el acné puede ser acné común. Como alternativa, el acné puede ser acné fulminante.

Cuando un método sirve para tratar a un sujeto que tiene acné, el método puede ser eficaz para reducir el recuento de lesiones inflamatorias en al menos el 50 % o al menos el 70 % cuando se aplica diariamente durante un periodo de aproximadamente 6 a aproximadamente 52 semanas. El método puede resultar eficaz para dar como resultado una reducción de al menos 2 puntos en la puntuación de intensidad del acné de acuerdo con la escala de Evaluación Global del Investigador (IGA) ("Guidance for Industry: Acne Vulgaris: Developing Drugs for Treatment", U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, septiembre de 2005) cuando la composición se aplica por vía tópica diariamente durante 6-52 semanas a un ser humano con una puntuación inicial de intensidad del acné en el intervalo de 3 a 4, o en el intervalo de 2 a 4. El método puede ser eficaz para cumplir con el requisito anterior si, en cualquier momento durante las 6-52 semanas de aplicación diaria, el recuento de lesiones inflamatorias se reduce en al menos aproximadamente un 50 %.

Un método para administrar por vía tópica una composición o un método para tratar una enfermedad o afección, como se describe en el presente documento, puede dar como resultado ningún aumento, o un aumento insignificante, o un aumento clínicamente insignificante, en el nivel del fármaco en plasma sanguíneo del sujeto tras la aplicación tópica de una dosis única de la composición a un sujeto humano, donde la dosis única se aplica a toda la cara del sujeto y se mide el nivel en plasma sanguíneo del fármaco de la clase de las tetraciclinas una hora después de la administración tópica.

En aún una o más realizaciones adicionales, se proporciona una composición como se describe en el presente documento acompañada de instrucciones para su uso tópico para el tratamiento de una afección o enfermedad dermatológica de la piel. En una o más realizaciones relacionadas, las instrucciones comprenden instrucciones para aplicar la composición a una superficie externa de la piel de una a tres veces al día durante un periodo de aproximadamente 2 semanas a al menos aproximadamente 6 semanas o hasta que se observe una mejora visible en la afección o enfermedad dermatológica.

En un tercer aspecto, se proporciona un método para preparar una composición tópica, por ejemplo, una adecuada para tratar el acné en un ser humano, comprendiendo el método (i) combinar un fármaco de la clase de las tetraciclinas o una sal o solvato del mismo, una fuente de magnesio, un alcohol alifático monohídrico volátil y un poliol que tiene 308 átomos de carbono para formar una mezcla en la que la relación entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol está en el intervalo de 1:1 a 99:1 en peso, y (ii) agitar la mezcla de (i) para formar una solución no acuosa que tiene menos del 5 % en peso de agua en la que se disuelve el fármaco de la clase de las tetraciclinas.

También se describe un método para preparar una composición, comprendiendo el método (i) combinar minociclina, una sal de magnesio y un compuesto de sulfito en un disolvente no acuoso para formar una mezcla, y (ii) agitar la mezcla de (i) para formar una solución en la que se disuelva la minociclina.

Cada uno de los aspectos y realizaciones anteriores está destinado a aplicarse a todos y cada uno de los demás aspectos y realizaciones. Realizaciones adicionales de la composición, métodos relacionados, componentes de la composición, y similares, serán evidentes a partir de la siguiente descripción, ejemplos, figuras y reivindicaciones. Estos y otros objetos y características de la divulgación se harán más evidentes cuando se lean junto con la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-B son gráficos que indican la solubilidad máxima del clorhidrato de minociclina en composiciones líquidas que comprenden relaciones variables de etanol y propilenglicol en función de la concentración de etanol en la composición como se describe en el Ejemplo 1. La línea discontinua representa la solubilidad del

clorhidrato de minociclina en composiciones líquidas sin cloruro de magnesio. La línea continua representa la solubilidad del clorhidrato de minociclina para composiciones líquidas similares con cloruro de magnesio (anhidro). La figura 1A proporciona datos para composiciones que comprenden cineol al 1 %. La figura 1B proporciona datos para composiciones sin cineol.

Las figuras 2A-2D son gráficos que ilustran las concentraciones relativas de 4-epi-minociclina y minociclina en el tiempo en composiciones que comprenden clorhidrato de minociclina, etanol y propilenglicol como se describe en el Ejemplo 3. Las líneas discontinuas en los gráficos son para composiciones sin cloruro de magnesio. Las líneas continuas en los gráficos son para composiciones líquidas similares con cloruro de magnesio. Las figuras 2A y 2B son gráficos que ilustran las concentraciones relativas de 4-epi-minociclina y minociclina, respectivamente, en el tiempo para composiciones con cineol al 1 %. Las figuras 2C y 2D son gráficos que ilustran las concentraciones relativas de 4-epi-minociclina y minociclina, respectivamente, en el tiempo para composiciones sin cineol.

La figura 3 es un gráfico que ilustra la eficacia de penetración promedio de la minociclina en la piel abdominal humana *ex vivo* frente a la concentración de etanol después de la aplicación de composiciones que comprenden clorhidrato de minociclina, cloruro de magnesio, etanol y propilenglicol como se describe en el Ejemplo 4.

Las figuras 4A-C presentan los resultados del tejido de "Control" del Ejemplo 6. La figura 4A es una sección transversal de la piel teñida con hematoxilina y eosina (H&E). Las figuras 4B y 4C son imágenes basadas en datos de espectrometría de masas MALDI-TOF que indican la ubicación de minociclina y sebo dentro de la piel para secciones cortadas de tejido en aproximadamente la misma forma que se muestra en la figura 4A.

Las figuras 5A-C presentan los resultados del tejido "tratado" del Ejemplo 6. La figura 5A es una sección transversal de la piel teñida con H&E después de la aplicación de la composición tópica descrita en el Ejemplo 6. Las figuras 5B y 5C son imágenes basadas en datos de espectrometría de masas MALDI-TOF que indican la ubicación de minociclina y sebo dentro de la piel para secciones cortadas de tejido en aproximadamente la misma forma que se muestra en la figura 5A.

La figura 6 es una micrografía de fluorescencia que muestra la minociclina dentro de una sección transversal de tejido de piel humana como se describe en el Ejemplo 7.

La figura 7A-C son micrografías de fluorescencia que muestran la minociclina dentro de secciones transversales de tejido de piel humana como se describe en el Ejemplo 7. La figura 7A muestra una sección de tejido humano al que no se aplicó composición tópica. Las figuras 7B y 7C muestran secciones de tejido humano a las que se aplicaron composiciones tópicas que comprendían aproximadamente el 1 % y el 4 % (p/p) de equivalente de base libre de minociclina, respectivamente.

La figura 8A es un gráfico que ilustra el aumento en la concentración relativa de 4-epi-minociclina en función de la relación molar de magnesio con respecto a equivalente de base libre de minociclina después de 7 días de degradación forzada a 50 °C como se describe en el Ejemplo 9. La figura 8B es un gráfico que demuestra la fluorescencia (U.A.) de composiciones de minociclina de ejemplo en función de la relación molar de magnesio con respecto a equivalente de base libre de minociclina como se describe en el Ejemplo 9.

Las figuras 9A y 9B ilustran cantidades de minociclina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) medidas por HPLC en piel facial humana *ex vivo* para formulaciones que contienen el 1 % y el 4 % de minociclina, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 12. Los puntos de tiempo probados fueron 2 y 4 horas para minociclina intacta y epimerizada. Los datos presentan la media de los donantes $\pm$ EE (* $P \leq 0,05$ entre las formulaciones hidrófila y lipófila para ambas figuras 9A y B).

La figura 10 es un gráfico que ilustra la concentración de minociclina ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) en la piel facial en el tiempo en un estudio *ex vivo* como se describe en el Ejemplo 12 para formulaciones tópicas que contienen el 1 % y el 4 % de minociclina.

Las figuras 11A y 11B ilustran la epimerización de la minociclina resultante de la aplicación tópica *ex vivo* de formulaciones que contienen el 1 % y el 4 % de minociclina, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 12.

Las figuras 12A-E son micrografías de fluorescencia de piel facial a las que se aplicaron *ex vivo* formulaciones tópicas que contenían minociclina al 4 % como se describe en el Ejemplo 12.

Las figuras 13A y 13B son fotografías de composiciones que contienen tetraciclina y doxiciclina antes y después del envejecimiento a 40 °C en viales de vidrio cerrados durante 7 días.

Las figuras 14A, 14B y 14C son gráficos que ilustran la concentración relativa de minociclina en las composiciones descritas en el Ejemplo 20 para condiciones de envejecimiento a 25 °C, 30 °C y 40 °C, respectivamente.

La figura 15 es un gráfico que ilustra el contenido de agua en función de la concentración nominal de minociclina (equivalente de base) para las composiciones SS-0004 a SS-0011 en el Ejemplo 20.

La figura 16 es un gráfico que ilustra la mejor tasa de ajuste de disminución de la concentración relativa de minociclina en función del contenido de agua de la composición, según lo medido por titulación de Karl Fischer después del envejecimiento a 25 °C, 30 °C y 40 °C como se describe en el Ejemplo 20.

Descripción detallada

La presente invención se describirá con más detalle a continuación. Esta invención puede, sin embargo, incorporarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones que se muestran en el presente documento; más bien, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta divulgación será exhaustiva y completa y transmitirá plenamente el alcance de la invención para los expertos en la técnica. Como se

puede apreciar a partir de la descripción anterior y siguiente, todas y cada una de las características descritas en el presente documento, y todas y cada una de las combinaciones de dos o más de dichas características, se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación siempre que las características incluidas en esas combinaciones no sean inconsistentes. Adicionalmente, cualquier característica o combinación de características puede excluirse específicamente de cualquier realización de la presente invención. En la siguiente descripción y las reivindicaciones se exponen aspectos y ventajas adicionales de la presente invención, particularmente cuando se consideran junto con los ejemplos y dibujos adjuntos.

En un caso en el que se define el mismo término tanto en una publicación, patente o solicitud de patente como en la presente divulgación, la definición en la presente divulgación representa la definición de control.

Definiciones

Cabe señalar que, como se usan en esta memoria descriptiva, las formas en singular "un", "uno/una", y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un "principio activo" incluye un solo ingrediente, así como dos o más ingredientes diferentes, la referencia a un "disolvente" se refiere a un solo disolvente, así como a dos o más disolventes diferentes o una mezcla compleja de disolventes, la referencia a una "sal de magnesio" incluye una sola sal de magnesio, así como dos o más sales de magnesio diferentes, y similares.

En la descripción y la reivindicación de la presente invención, se utilizará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones descritas a continuación.

La expresión "composición tópica" se refiere a un material que comprende ingredientes farmacéuticamente aceptables, incluido un principio farmacéutico activo (API), y que está destinado a la administración a un sujeto animal o humano y se aplica a la superficie de la piel, a diferencia de los materiales que se toman por vía oral o mediante inyección intravenosa (subdérmica). Generalmente, se pretende que una composición tópica tenga el efecto deseado en el sitio de aplicación y no de como resultado concentraciones significativas de fármaco en el torrente sanguíneo u otros tejidos (como es el caso, por ejemplo, de las composiciones transdérmicas). Las composiciones tópicas como se proporcionan en el presente documento, se administran normalmente con el fin de aliviar los síntomas asociados con una enfermedad o afección dermatológica, el tratamiento de una enfermedad o afección dermatológica, o la prevención de una enfermedad o afección dermatológica.

El término "disolvente" se refiere a una sustancia en la que uno o más ingredientes sólidos se disuelven hasta cierto punto. Por ejemplo, etanol, isopropanol y propilenglicol, por nombrar algunos, se consideran disolventes de la minociclina.

La expresión "fármaco de la clase de las tetraciclinas" se refiere a tetraciclina y derivados de tetraciclina tales como, por ejemplo, minociclina, doxiciclina, oxitetraciclina y sus correspondientes formas de sal farmacéuticamente aceptables, así como solvatos e hidratos de las mismas, incluyendo diversas formas cristalinas, polimorfos, materiales amorfos, etc. Un antibiótico de tetraciclina generalmente contiene un esqueleto de octahidrotetraceno-2-carboxamida de cuatro anillos, mientras que los sustituyentes reales en el esqueleto pueden variar.

El término "minociclina" se refiere a (4S,4aS,5aR,12aR)-4,7-bis(dimetilamino)-1,10,11,12a-tetrahidroxi-3,12-dioxo-4a,5,5a,6-tetrahidro-4H-tetraceno-2-carboxamida (es decir, número CAS 10118-90-8) y sus correspondientes formas de sal farmacéuticamente aceptables, así como solvatos e hidratos de las mismas. Las formas de ejemplo de minociclina se identifican comúnmente por sus números CAS. Por ejemplo, el clorhidrato de minociclina tiene un número CAS de 13614-98-7.

La expresión "alcohol alifático monohídrico" se refiere a un compuesto orgánico monofuncional que contiene un solo grupo hidroxilo, en el que el grupo funcional hidroxilo está unido covalentemente a un átomo de carbono saturado que forma parte de una cadena alquilo lineal o ramificada, y que no contiene una configuración de átomos de anillo aromático. Generalmente, un alcohol alifático monohídrico para su uso en las composiciones proporcionadas en el presente documento se ajusta a la fórmula R-OH, donde R es un alquilo C₁-C₄. Los grupos R adecuados incluyen etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo y *tert*-butilo.

El término "poliol" se refiere a un alcohol farmacéuticamente aceptable que contiene dos o más grupos hidroxilo y que posee de 3-8 átomos de carbono. Los polioles adecuados para su uso en las presentes composiciones pueden contener, pero no necesariamente, grupos funcionales además de los grupos hidroxilo, tal como, por ejemplo, un enlace éter. Como se usa en el presente documento, el polietilenglicol no se considerará un poliol. Los polioles ilustrativos incluyen dioles tales como propilenglicol (PG) y dipropilenglicol, trioles tales como glicerol, 1,2,6 hexanotriol, trimetilolpropano, y alcoholes superiores (es decir, que contienen más de 3 grupos hidroxilo) tales como sorbitol y pentaeritritol. Los polioles también incluyen butilenglicol, hexilenglicol, 1,6 hexanodiol, manitol y xilitol. Se reconoce que algunos de estos disolventes son sólidos que pueden ser no deseables, pero cuando se combinan en mezclas apropiadas, pueden ser adecuados para su uso en una composición tópica como se describe en el presente documento.

El término "cineol" se refiere a 1,8-cineol.

El término "cosmético" se refiere a un artículo que es un "artículo destinado a frotarse, rociarse o pulverizarse, introducirse o aplicarse de otro modo al cuerpo humano, para limpiar, embellecer, promover el atractivo, o alterar la apariencia" (de la Ley Federal de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos, sección 201(i)). La Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos clasifica diversos artículos como cosméticos o medicamentos. Esta definición está destinada a seguir las clasificaciones de la FDA de EE.UU. La FDA de EE.UU. aclara además en su sitio web que "Entre los productos incluidos en esta definición se encuentran humectantes para la piel, perfumes, barras de labios, esmaltes de uñas, preparaciones de maquillaje facial y para ojos, champús limpiadores, ondas permanentes, tintes para el cabello y desodorantes, así como cualquier sustancia destinada a ser utilizada como componente de un producto cosmético".

El término "tópico", en referencia a la administración de un fármaco o composición, se refiere a la aplicación de dicho fármaco o composición a una superficie epitelial exterior del cuerpo, incluida la piel o la córnea. Para los fines de esta solicitud, las aplicaciones dentro de un orificio corporal, tal como la boca, la nariz o el oído, no se considerarán aplicaciones tópicas.

Se dice que un disolvente (o disolventes) "disuelve" un fármaco de la clase de las tetraciclinas (o, a la inversa, se dice que el fármaco es soluble en un disolvente) si la solubilidad de ese fármaco medida en el Ejemplo 1 a 25 °C es de al menos el 0,1 % (p/p). Para emulsiones y similares, se considera que el fármaco sólo se "disuelve" en el disolvente si el fármaco está en interacción directa con el disolvente de manera que el fármaco se incorpore al disolvente para formar una solución. Así pues, por ejemplo, un fármaco que se recubre para limitar la interacción con un disolvente no se consideraría disuelto en ese disolvente si permaneciera en forma de partículas.

Se dice que un disolvente o composición es "anhidra" si no hay agua añadida en el disolvente o la composición. Es decir, como se usa en el presente documento, una composición anhidra es aquella en la que no se ha añadido agua como componente. Para mayor claridad, se puede considerar que una solución o composición es anhidra incluso si contiene agua procedente de un componente de la composición, tal como a través de la adición de clorhidrato de minociclina hidrato, siempre que no se añada agua libre a la composición. Muchos de los disolventes descritos en el presente documento son higroscópicos en mayor o menor medida y dichos disolventes pueden ser parte de composiciones anhidras sin tener en cuenta el agua que es absorbida naturalmente por dichos materiales.

Se dice que un disolvente o composición es "no acuosa" si hay menos del 5 % en peso de contenido de agua en el disolvente o la composición, respectivamente, según lo medido por la titulación de Karl Fischer u otro método adecuado.

Se dice que un disolvente o composición es "volátil" si tiene un punto de ebullición inferior a 100 °C a presión atmosférica. Los disolventes o composiciones volátiles normalmente se evaporan fácilmente a temperatura ambiente y presión atmosférica. Ejemplos de disolventes volátiles incluyen isopropanol, etanol y alcohol t-butílico. Ejemplos de disolventes no volátiles incluyen agua, vaselina blanca y aceite de oliva.

Se dice que un fármaco está "estabilizado" por la presencia de un material particular contenido en una composición, si una composición que comprende todos los mismos materiales en las mismas proporciones relativas entre sí, excluyendo el principio o fármaco activo, pero con el material particular eliminado, exhibe una pérdida de potencia que es mayor que la pérdida de potencia de la composición original cuando se almacena a 25 °C y el 60 % de humedad relativa en un ambiente oscuro cuando se mide en un punto de tiempo de 6 meses. Para mayor claridad, al realizar el reemplazo (es decir, la evaluación de la mejora de la estabilidad), el porcentaje en peso del fármaco en la composición no aumenta, sino que el material eliminado se reemplaza eficazmente por proporciones equivalentes del resto de la composición excluyendo el fármaco. Por ejemplo, si una composición que contiene el 30 % (p/p) de A, el 30 % (p/p) de B, el 20 % (p/p) de C, el 10 % (p/p) de D y el 10 % (p/p) de E se evalúa para determinar el efecto del componente A, y E es el principio activo (es decir, fármaco de la clase de las tetraciclinas), la composición comparativa contendrá el 0 % (p/p) de A (el componente excluido), el 45 % (p/p) de B, el 30 % (p/p) de C, el 15 % (p/p) de D y el 10 % (p/p) de E (el principio activo).

La expresión "eficacia de penetración" se refiere al porcentaje del fármaco de la clase de las tetraciclinas que penetra más allá de las primeras capas del estrato córneo (es decir, después de la eliminación de las capas superiores del estrato córneo mediante dos retiradas secuenciales con cinta) después de la aplicación de la composición a una porción *ex vivo* de tejido de piel humana cuando se aplican aproximadamente 12 mg/cm² de la composición a la superficie de la piel durante 4 horas como se describe en el Ejemplo 4.

"MIC" o concentración inhibitoria mínima se define como la concentración más baja de un compuesto antimicrobiano que inhibirá el crecimiento visible de un microorganismo después de 48 horas de incubación.

La abreviatura "(p/p)" indica que las concentraciones relativas de componentes en una composición se presentan sobre una base de "peso por peso" (es decir, los porcentajes se refieren a un porcentaje del peso total), en lugar de

sobre la base de volumen o alguna otra base. En referencia a un solvato o hidrato de un fármaco de la clase de las tetraciclinas, por ejemplo, minociclina, los porcentajes en peso deben corregirse en peso para tener en cuenta la masa perteneciente a las moléculas de disolvente/hidrato contenidas en la fuente del fármaco. Por ejemplo, una composición que comprende el 1,16 % (p/p) de la composición de clorhidrato de minociclina dihidrato es equivalente al 1 % de equivalente de base libre de minociclina basándose en las relaciones de los pesos moleculares de la base libre de minociclina (457,48) y el clorhidrato de minociclina dihidrato (529,97).

La expresión "concentración relativa" en referencia a un fármaco de la clase de las tetraciclinas se determina normalmente mediante la medición de HPLC, y corresponde al área del pico del fármaco activo de la clase de las tetraciclinas dividido por la suma de las áreas pico de todos los picos del cromatograma de HPLC durante los tiempos siguientes a la elución de los picos de disolvente. Para mayor claridad, la intención de esta medición es que el cromatograma de HPLC omita las áreas pico de cada uno de los picos de disolvente e incluya cada uno de los picos que se deben al fármaco de la clase de las tetraciclinas y sus componentes de degradación clave detectados. Por ejemplo, se midió la concentración relativa de minociclina activa para cada una de las composiciones descritas en el Ejemplo 19.

El término "concentración relativa" en referencia a un epímero de un fármaco de la clase de las tetraciclinas se determina normalmente por medición de HPLC y corresponde al área pico de uno o más epímeros del fármaco activo de la clase de las tetraciclinas dividido por la suma del área pico para el epímero y el área pico para el fármaco activo de la clase de las tetraciclinas. Por ejemplo, la concentración relativa de 4-epi-minociclina se midió para cada una de las composiciones descritas en el Ejemplo 19.

El término "concentración" en referencia a un fármaco de la clase de las tetraciclinas se determina normalmente por medición de HPLC, y corresponde al área pico del fármaco de la clase de las tetraciclinas activa multiplicado por la concentración del fármaco de la clase de las tetraciclinas activa en el patrón de trabajo y dividido por el área pico del fármaco de tetraciclina activa para un patrón de trabajo que contiene una cantidad conocida del fármaco de tetraciclina activa. Por ejemplo, la concentración de minociclina se midió para cada una de las composiciones descritas en el Ejemplo 20.

El término "cerrado", tal como en lo que respecta a un "vial cerrado", se refiere a un vial que está sellado contra la pérdida significativa de disolvente u otros materiales del vial por evaporación. Para los Ejemplos descritos en el presente documento, los viales de vidrio cerrados se refieren a viales de vidrio de borosilicato cerrados con una tapa fenólica revestida de cono de polietileno y sellados con parafilm. Las composiciones dentro de los viales de vidrio se protegieron de la luz, ya sea usando viales de vidrio de color ámbar o envolviendo los viales con papel de aluminio.

El término "viscosidad" se refiere a la medición de una sustancia usando un viscosímetro, tal como un viscosímetro Brookfield LVF (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA) o equivalente, con combinaciones de husillo y velocidad adecuadas para la prueba de nivel de viscosidad aplicable.

Como se usa en el presente documento, "afección dermatológica" se refiere a trastornos cosméticos y patológicos de la piel. Las afecciones dermatológicas incluyen afecciones cutáneas inflamatorias tópicas tales como eccema, dermatitis seborreica, dermatosis ampollosa, sarcoidosis cutánea, sarcoma de Kaposi, dermatosis neutrofílica, dermatitis de contacto, rosácea, psoriasis y acné, incluido acné rosácea, e infecciones tales como impétigo, celulitis, erisipelas, foliculitis, forúnculos, carbunclos, enfermedad de Lyme y otras infecciones de la piel.

Como se usa en el presente documento, "acné" es un trastorno de la piel caracterizado por pápulas, pústulas, quistes, nódulos, comedones y otras imperfecciones o lesiones cutáneas. Estas imperfecciones y lesiones suelen ir acompañadas de inflamación de las glándulas cutáneas y de los folículos pilosebáceos, así como infección microbiana, especialmente bacteriana. Como se usa en el presente documento, el acné incluye todos los tipos conocidos de acné. Algunos tipos de acné incluyen, por ejemplo, acné común, acné quístico, acné atrófico, acné por bromo, acné por cloro, acné conglobata, acné cosmético, acné por detergentes, acné epidémico, acné estival, acné fulminante, acné por halógeno, acné indurado, acné por yodo, acné queloide, acné mecánico, acné papuloso, acné por pomada, acné premenstrual, acné pustuloso, acné escorbútico, acné escrofuloso, acné urticante, acné varioliforme, acné por sustancias químicas, acné propiónico, acné excoriado, acné gramnegativo, acné por esteroides, acné nodulocístico y acné rosácea. El acné rosácea se caracteriza por lesiones inflamatorias (eritema) y telangiectasias. La telangiectasia son vasos sanguíneos dilatados de forma anormal y permanente asociados con una serie de enfermedades. Por ejemplo, la telangiectasia facial se asocia con la edad, acné rosácea, exposición al sol y consumo de alcohol.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" en referencia a una entidad o ingrediente es uno que puede estar incluido en las composiciones proporcionadas en el presente documento y que no causa efectos toxicológicos adversos significativos en el paciente a niveles especificados, o si no se especifican niveles, en niveles conocidos por los expertos en la técnica como aceptables. Todos los ingredientes de las composiciones descritas en el presente documento se proporcionan a niveles que son farmacéuticamente aceptables. Para mayor claridad, los principios activos pueden causar uno o más efectos secundarios y la inclusión de los ingredientes con un perfil de efectos secundarios que sea aceptable desde una perspectiva reguladora para dichos ingredientes se considerará

como niveles "farmacéuticamente aceptables" de estos ingredientes.

"Sal farmacéuticamente aceptable" representa una forma de sal de un fármaco o principio activo que tiene al menos un grupo adecuado para la formación de sal que no causa efectos toxicológicos adversos significativos al paciente.

5 La referencia a un principio activo como se proporciona en el presente documento pretende abarcar sus sales farmacéuticamente aceptables, así como solvatos e hidratos de las mismas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales preparadas por reacción con un ácido inorgánico, un ácido orgánico, un aminoácido básico, o un aminoácido ácido, dependiendo de la naturaleza del grupo o grupos funcionales en el fármaco. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales de adición de ácidos que pueden, por ejemplo,
10 formarse mezclando una solución de un fármaco básico con una solución de un ácido capaz de formar una forma de sal farmacéuticamente aceptable del fármaco básico, tal como ácido clorhídrico, ácido yódico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y similares. Los aniones típicos para fármacos básicos, cuando están en forma protonada, incluyen cloruro, sulfato, bromuro, mesilato, maleato, citrato, fosfato y similares. Las formas de sal farmacéuticamente aceptables adecuadas y métodos para identificar dichas sales se encuentran en, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2008; P. H. Stahl y C. G. Wermuth, Eds.

"No irritante" en referencia a una formulación tópica como se proporciona en el presente documento se refiere a una formulación que tiene una puntuación promedio de menos de 0,50 en la escala Draize modificada para una prueba de 5 o más ratas Sprague-Dawley. La prueba Draize modificada es una prueba de irritación aguda que se realiza de la siguiente manera. Una rata Sprague-Dawley se afeita en un área de aplicación, y el área de aplicación se deja reposar durante aproximadamente 24 horas y a continuación se aclara con jabón no irritante. Se aplica una composición de prueba uniformemente, sin frotar significativamente, a un área de 10 cm² de la piel de la rata en un volumen de 2,5 mg/cm². Se deja reposar la muestra sin tapar durante 24 horas. Después de 24 horas, el área de aplicación se lava suavemente con 1x solución salina tamponada con fosfato (1x PBS) y jabón no irritante para facilitar la observación del área de aplicación. A continuación, se puntúa el área de aplicación de acuerdo con la siguiente escala: 0 = sin evidencia de irritación; 1 = eritema mínimo, apenas perceptible; 2 = eritema definido, fácilmente visible, edema mínimo o respuesta popular mínima; 3 = eritema y pápulas; 4 = edema definido; 5 = eritema, edema y pápulas; 6 = erupción vesicular; 7 = reacción fuerte que se extiende más allá del sitio de prueba.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para referirse a la cantidad de una preparación farmacéutica, o la cantidad de un principio activo en la preparación farmacéutica, que se necesita para proporcionar un nivel deseado de principio activo en un tejido diana o en un sitio diana. La cantidad precisa dependerá de numerosos factores, por ejemplo, el principio activo particular, los componentes y las características físicas de la preparación farmacéutica, la población de pacientes prevista, las consideraciones del paciente, y similares, y puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica, basándose en la información proporcionada en el presente documento y disponible en la bibliografía relevante.

La temperatura ambiente se refiere a una temperatura en un intervalo de aproximadamente 20-25 °C. En referencia a una medición u otra característica que requiera una indicación precisa de la temperatura ambiente, la temperatura ambiente se toma como 25 °C.

El término "paciente" se refiere a un organismo vivo que padece o es propenso a una afección que puede prevenirse o tratarse mediante la administración de una composición como se proporciona en el presente documento, e incluye tanto seres humanos como animales. Los animales preferidos son los mamíferos.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia descrita posteriormente puede ocurrir o no, de modo que la descripción incluye casos en los que tiene lugar la circunstancia y casos en los que no.

50 En muchos casos, la solicitud de patente describe intervalos de valores. Dichos intervalos se interpretarán para incluir los criterios de valoración del intervalo a menos que hacerlo sea inconsistente con el texto o se indique de otro modo.

VISIÓN GENERAL

55 La presente divulgación aborda al menos algunos de los problemas previamente identificados en el presente documento, por ejemplo, en la sección de Antecedentes, relacionados con composiciones tópicas que comprenden un fármaco de la clase de las tetraciclinas. Después de varios intentos de composición, los Solicitantes han descubierto una composición y un sistema disolvente relacionado que promueve la penetración de un fármaco de la clase de las tetraciclinas en la piel y en el que dicho fármaco tiene una alta solubilidad. En tal sistema disolvente, el fármaco permanece idealmente en solución cuando el disolvente penetra en la piel. Como han reconocido los Solicitantes, si parte del disolvente se pierde por evaporación antes de la penetración, la concentración del fármaco en el disolvente sobre la superficie de la piel aumentará normalmente, lo que significa que la solubilidad del fármaco dentro de la composición es una característica importante a considerar en el diseño de una composición tópica mejorada que comprenda un compuesto de la clase de las tetraciclinas. Además, como han descubierto los Solicitantes, la selección de un disolvente en el que el fármaco se disuelva completamente durante el

almacenamiento reduce o elimina las variaciones en la concentración farmacológica en toda la composición. En la siguiente descripción, a menudo se hace referencia a la minociclina como el compuesto de la clase de tetraciclina de ejemplo, sin embargo, las composiciones y métodos divulgados en el presente documento también se aplican a compuestos de la clase de tetraciclina distintos de la minociclina. Además, también se proporciona en el presente documento una composición líquida que comprende una clase de tetraciclina y que tiene una estabilidad superior.

En el presente documento se describe una composición tópica y métodos relacionados para preparar la composición tópica. La composición tópica puede comprender minociclina, una sal de magnesio y un compuesto de sulfito en un disolvente no acuoso, donde se han proporcionado anteriormente detalles sobre la minociclina (una tetraciclina de ejemplo), la sal de magnesio y el compuesto de sulfito y en las siguientes secciones. Se ha descubierto que las composiciones líquidas tales como las proporcionadas en el presente documento, por ejemplo, que comprenden minociclina y una sal de magnesio en un sistema disolvente no acuoso (preferentemente un sistema disolvente hidrófilo), que comprende un antioxidante a base de sulfito, son notable y ventajosamente más estables que las composiciones que comprenden antioxidantes sin sulfito. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 19. Sorprendentemente, dichas composiciones demostraron una degradación significativamente menor de la minociclina en el tiempo en comparación con las formulaciones equivalentes que comprenden antioxidantes sin sulfito. Dichas formulaciones también exhibieron una estabilidad prolongada con respecto al color, es decir, no exhibieron ningún cambio significativo de color durante el almacenamiento.

En un primer aspecto, se proporciona en el presente documento una composición tópica que comprende un fármaco de la clase de las tetraciclinas, una fuente de magnesio, un alcohol alifático monohídrico y un poliol, en la que (i) la relación entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol está en el intervalo de 1:1 a 99:1 en peso y (ii) el fármaco de la clase de las tetraciclinas se disuelve en la composición tópica. En algunas realizaciones de ejemplo, el alcohol alifático monohídrico es etanol, isopropanol o alcohol *terc*-butílico (es decir, alcohol *t*-butílico). En una o más realizaciones de ejemplo adicionales, el poliol es un diol o triol C3-C8 alifático, saturado. En una o más realizaciones adicionales, el poliol es un 1,2-diol, un 1,3-diol o un triol. Los polioles ilustrativos incluyen propilenglicol, dipropilenglicol y glicerol. En el presente documento se proporcionan más detalles de la composición y métodos relacionados.

Los Solicitantes han descubierto que la combinación de un fármaco de la clase de las tetraciclinas, una fuente de magnesio, un alcohol alifático monohídrico y un poliol forma un eutéctico dentro de una composición de modo que el punto de fusión para la composición después de evaporar el disolvente según lo medido por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se reduce con respecto al de la composición sin uno de estos cuatro componentes. Los Solicitantes también han descubierto que la solubilidad de la minociclina en la composición disminuye en relación con la solubilidad de la minociclina para la composición sin uno de los tres componentes no farmacológicos. Basándose en las mediciones de solubilidad y DSC, se cree que estos cuatro componentes pueden formar una interacción iónica única o unión no específica que tiene propiedades sinérgicas para su uso en una composición tópica. Estas propiedades sinérgicas pueden requerir los cuatro componentes para un beneficio de solubilización óptimo. Sin limitarse a la teoría, parece que la mezcla de disolventes neutraliza la carga iónica en el complejo de minociclina-magnesio, lo que aumenta la solubilidad de la minociclina en la mezcla de disolventes en relación con la solubilidad de la minociclina en cualquier disolvente de forma independiente.

En una o más realizaciones, el alcohol alifático monohídrico es volátil, el poliol no es volátil, y el fármaco de la clase de las tetraciclinas permanece soluble en la composición incluso cuando el alcohol alifático monohídrico se omite o elimina de la composición, o su la concentración se reduce, tal como a través de evaporación. En dichas realizaciones, se logra un equilibrio favorable entre el efecto estabilizador del alcohol alifático monohídrico volátil sobre la composición (por ejemplo, durante el almacenamiento) y la solubilidad persistente del fármaco tanto en la composición como cuando se aplica a la piel, incluso después de la evaporación de parte o la totalidad del alcohol alifático monohídrico volátil, cuando está presente. Este enfoque puede ser ventajoso porque 1) el alcohol alifático monohídrico volátil parece estabilizar la composición y 2) el poliol mantiene el fármaco de la clase de las tetraciclinas en un estado disuelto durante un periodo prolongado en la piel, permitiendo así más tiempo para una mejor permeación que si el alcohol alifático monohídrico reemplazara al poliol. Los porcentajes en peso relativos de cada uno de los alcoholes alifáticos monohídricos volátiles, el poliol relativamente no volátil y el fármaco de la clase de las tetraciclinas en la composición, eficaces para lograr un equilibrio de estabilidad de almacenamiento prolongada y una solubilidad mantenida del fármaco de la clase de las tetraciclinas cuando se aplica a la piel, se proporcionan en el presente documento.

La composición es útil para el tratamiento de una afección o enfermedad dermatológica. Ejemplos no limitantes de afecciones o enfermedades dermatológicas para las que se puede usar la composición incluyen, pero sin limitación, acné, rosácea, dermatitis seborreica, psoriasis e infecciones cutáneas superficiales tales como impétigo, así como en el tratamiento de heridas.

LA COMPOSICIÓN

Los componentes y características de la composición se describirán ahora con mayor detalle.

Los fármacos de la clase de las tetraciclinas incluyen, por ejemplo, tetraciclina y derivados de tetraciclina tales como demeclociclina, minociclina, doxiciclina, oxitetraciclina y sus correspondientes formas de sal farmacéuticamente aceptables, así como solvatos e hidratos de las mismas. El fármaco de la clase de las tetraciclinas también puede ser una fluorociclina, es decir, una 7-fluoro-9-sustituida-6-desmetil-6-desoxitetraciclina, tal como eravaciclina (TP-434) o 7-fluoro-9-pirrolidinoacetamido-6-desmetil-6-desoxitetraciclina. Los fármacos que pertenecen a la clase de las tetraciclinas generalmente contienen un esqueleto de octahidrotetraceno-2-carboxamida de cuatro anillos, mientras que los sustituyentes reales en el esqueleto pueden variar. Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro, que exhiben actividad contra una amplia gama de bacterias. Una tetraciclina preferida para su uso en las composiciones proporcionadas en el presente documento es minociclina. La minociclina es una tetraciclina semisintética potente con actividad contra una amplia gama de organismos grampositivos y gramnegativos. La minociclina presenta un espectro más amplio en comparación con otros compuestos de tipo tetraciclina, y también es la más soluble en lípidos de las tetraciclinas, es decir, puede penetrar más fácilmente en diversos tejidos en comparación con otras tetraciclinas. Esta característica presenta un desafío adicional para la administración tópica de minociclina, especialmente en forma de base libre, debido a su propensión en comparación con otras tetraciclinas a transportarse a través de la epidermis. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden contener minociclina o cualquier antibiótico de tetraciclina en cualquier forma disponible, por ejemplo, como la base libre, como clorhidrato u otra sal farmacéuticamente aceptable, incluidos todos los polimorfos, solvatos, hidratos o formas amorfas cristalinas de los mismos. En una o más realizaciones preferidas, la minociclina o sal de minociclina no está en forma de hidrato (es decir, está en forma no hidratada). Sin embargo, en algunos casos, el fármaco de tetraciclina puede estar en forma hidratada, por ejemplo, comprendiendo menos de aproximadamente 20 por ciento en peso de agua. En algunas realizaciones preferidas, el fármaco de tetraciclina comprenderá menos de aproximadamente un 5 % en peso de agua, o puede comprender menos de aproximadamente un 2 % en peso de agua.

La cantidad de fármaco de la clase de las tetraciclinas en la composición tópica (por ejemplo, minociclina) varía normalmente de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 10 % en peso, o de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 5 % en peso. Los intervalos ilustrativos son de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 4 % en peso, o de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 3 % en peso, o de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 1,5 % en peso. Por ejemplo, la formulación tópica puede comprender cualquiera de los siguientes porcentajes en peso de minociclina: 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,1 %, 1,2 %, 1,3 %, 1,4 %, 1,5 %, 1,6 %, 1,7 %, 1,8 %, 1,9 %, 1,0 %, 2,1 %, 2,2 %, 2,3 %, 2,4 %, 2,5 %, etc.

La composición tópica también comprende una fuente de magnesio en forma de sal de magnesio. Las sales de magnesio ilustrativas incluyen, pero sin limitación, bromuro de magnesio, cloruro de magnesio, fluoruro de magnesio, yoduro de magnesio, sulfato de magnesio, salicilato de magnesio y fosfato de magnesio. Las sales de magnesio a menudo se suministran comercialmente en forma de hidratos, y los hidratos se pueden usar en las presentes formulaciones. Sin embargo, en algunas realizaciones preferidas, la sal de magnesio es anhidra, debido a la inestabilidad de los fármacos de la clase de las tetraciclinas, tal como minociclina, en presencia de agua. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 20. En algunas realizaciones preferidas, la fuente de magnesio comprende una sal de magnesio que tiene un contraión que es un ión blando (polarizable), tal como cloruro o yoduro, en lugar de un ión duro, tal como sulfato o fluoruro. En algunas realizaciones adicionales, la fuente de magnesio comprende una sal de magnesio que tiene un contraión que es cloruro o es más blando que un ión cloruro. En algunas realizaciones adicionales, la fuente de magnesio comprende una sal de magnesio que tiene un contraión que es un ión acetato (CH_3COO^-) o es más blando que un ión acetato.

La teoría de ácido/base duro/blando (HSAB) clasifica los ácidos y las bases en una escala de duro a blando. El uso de iones blandos reduce la tensión interfacial en la mezcla y, por lo tanto, mejora la solubilidad. Los factores que contribuyen a que un ión se clasifique como "blando" incluyen un gran tamaño, estados de carga baja y una fuerte polarización. Se describen detalles adicionales de la teoría HSAB en Pearson, Ralph G. "Hard and Soft Acids and Bases". J. Am. Chem. Soc. 1963; 85 (22): 3533-9 y Pearson, R.G. "Recent Advances in the Concept of Hard and Soft Acids and Bases". J. Chem. Education. julio de 1987, 64 (7): 561-7.

Como se describe en el Ejemplo 1, la presencia de una sal de magnesio en la composición es eficaz para aumentar la solubilidad del fármaco de la clase de las tetraciclinas, por ejemplo, minociclina, en las presentes composiciones en un grado notable. Véase, por ejemplo, la figura 1A. Sin limitarse a la teoría, el magnesio parece interactuar con la minociclina en la composición, como lo demuestra su impacto en el valor de MIC cuando se compara con el valor de MIC de la minociclina en solitario. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 5, que describe las mediciones de MIC para minociclina, cloruro de magnesio anhidro, y una mezcla de 1:1,5 p/p de los dos. La minociclina en solitario exhibió una MIC de 0,125 microgramos por mililitro, mientras que la combinación poseía una MIC más alta de 0,5 microlitros, un aumento de cuatro veces (lo que significa que la combinación era cuatro veces menos activa que la minociclina en solitario). Por lo tanto, incluso teniendo en cuenta las diferencias de peso en la combinación, los resultados indican que el magnesio está interactuando con la minociclina. Se utilizaron técnicas analíticas para confirmar que la pérdida observada de actividad antimicrobiana no se debió a la degradación de la minociclina.

Las cantidades típicas de una fuente de magnesio (una sal de magnesio) en las composiciones tópicas proporcionadas en el presente documento varían de aproximadamente el 0,2-10 % en peso. Las relaciones molares

de la fuente de magnesio con respecto al fármaco de la clase de las tetraciclinas, por ejemplo, minociclina, varían de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 100:1. Las relaciones molares ilustrativas son normalmente al menos aproximadamente 2:1 (Mg:fármaco de tetraciclina). Por ejemplo, las relaciones molares adecuadas son aproximadamente 2:1, aproximadamente 2,5:1, aproximadamente 3:1, aproximadamente 3,5:1, aproximadamente 4:1, aproximadamente 4,5:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 5,5:1, aproximadamente 6:1, aproximadamente 6,5:1, aproximadamente 7:1, aproximadamente 7,5:1, aproximadamente 8:1, aproximadamente 8,5:1, aproximadamente 9:1, aproximadamente 9,5:1, y aproximadamente 10:1. Las cantidades relativas de la fuente de magnesio con respecto al fármaco de la clase de las tetraciclinas en la composición tópica sobre una base de peso/peso (p/p) normalmente variarán de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 3:1, pero pueden utilizarse intervalos mayores o menores que este dependiendo de los pesos moleculares de la fuente de magnesio y la forma del fármaco de la clase de las tetraciclinas. Por lo tanto, la cantidad relativa en peso de la fuente de magnesio con respecto al peso del clorhidrato de minociclina (es decir, un fármaco de la clase de las tetraciclinas) puede incluir una cualquiera o más de las siguientes: 0,4 (es decir, la cantidad en peso de magnesio 0,4 veces la del componente de minociclina), 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0 (es decir, cantidades en peso iguales), aproximadamente 1,5, aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4,5 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 5,5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 6,5 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 7,5 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 8,5 veces, aproximadamente 9 veces, aproximadamente 9,5 veces, o aproximadamente 10 veces, incluyendo todos y cada uno de los intervalos que se encuentren dentro de dos cualesquiera de los valores anteriores. Normalmente, la fuente de magnesio (la sal de magnesio) está presente en exceso molar con respecto a la minociclina. Basándose en los ejemplos proporcionados por la presente, se puede ver que la sal de magnesio es eficaz para estabilizar las presentes composiciones.

Además de una sal de magnesio, la formulación tópica puede comprender una sal de un catión de metal divalente tal como, por ejemplo, calcio, aluminio, cinc, donde los contraiones ilustrativos y cantidades relativas (por ejemplo, para iones metálicos divalentes totales) son como se han descrito anteriormente para una sal de magnesio. Los iones metálicos divalentes preferidos son los que pueden interactuar con la minociclina.

La composición tópica comprende, como parte de su sistema disolvente no acuoso, un alcohol alifático monohídrico, preferentemente un alcohol volátil. Generalmente, un alcohol alifático monohídrico para su uso en las composiciones proporcionadas en el presente documento se ajusta a la fórmula R-OH, donde R es un grupo alquilo C₁-C₄. Los grupos R adecuados incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo y *terc*-butilo. Preferentemente, el alcohol alifático monohídrico es un alcohol primario tal como alcohol etílico, alcohol propílico o alcohol butílico. Un alcohol alifático monohídrico particularmente preferido es etanol. En algunas realizaciones, el alcohol alifático monohídrico es uno que tiene una solubilidad en agua del 5 por ciento o más. Metanol, etanol, 1- y 2-propanol y alcohol t-butilico, por ejemplo, son miscibles con agua, mientras que 1-butanol tiene una solubilidad de aproximadamente el 9 % en agua y 2-butanol tiene una solubilidad en agua del 7,7 %. Los alcoholes preferidos son hidrófilos.

Otro componente adicional de la composición tópica (es decir, que forma parte de su sistema disolvente) es un poliol que contiene dos o más grupos hidroxilo y que posee de 3-8 átomos de carbono. Normalmente, el poliol es un compuesto alifático; los polioles para su uso en la presente composición incluyen dioles tales como propilenglicol (PG, propano-1,2-diol), hexilenglicol (2-metilpentano-2,4-diol), 1,3-butilenglicol (1,3-butanodiol) y dipropilenglicol, trioles tales como glicerol y trimetilolpropano, y alcoholes superiores (lo que significa que contienen más de 3 grupos hidroxilo) tales como sorbitol y pentaeritritol. Los polioles preferidos son dioles y trioles C₃-C₈. El diol o triol tendrá normalmente un peso molecular menor de aproximadamente 250, o incluso menor de aproximadamente 200. En algunos casos, el poliol tendrá un peso molecular menor de aproximadamente 125. El poliol, en algunos casos, puede ser higroscópico, tal como en el caso del propilenglicol. En algunas realizaciones, el poliol es un triol distinto de glicerol o glicerina.

Muchos alcoholes alifáticos monohídricos, tales como etanol, pueden proporcionar un disolvente estable para los fármacos de la clase de las tetraciclinas, sin embargo, los fármacos de la clase de las tetraciclinas tienen una solubilidad limitada en mezclas de etanol y propilenglicol. Además, dado que el etanol es un disolvente volátil, gran parte del disolvente se evapora rápidamente cuando se aplica a la piel. Esta evaporación aumenta rápidamente la concentración del fármaco de la clase de las tetraciclinas en la superficie de la piel y puede conducir a la formación de depósitos sólidos en la superficie de la piel o en las capas superiores de la piel, ninguna de las cuales es deseable, particularmente debido al potencial de tinción y/o pigmentación de la piel. Las composiciones proporcionadas en el presente documento están destinadas, al menos en parte, a superar los inconvenientes señalados anteriormente. Por ejemplo, considerar una composición que comprende el 1,2 % (p/p) de clorhidrato de minociclina (aproximadamente el 1 % (p/p) de equivalente de base libre de minociclina), el 1,2 % (p/p) de cloruro de magnesio, el 77,6 % (p/p) de etanol y el 20 % (p/p) de propilenglicol. El etanol es mucho más volátil que el propilenglicol, de modo que, incluso si todo el etanol se evapora de la piel, la concentración del equivalente de base libre de minociclina en la composición residual después de la evaporación del etanol sería aproximadamente del 4,5 %. Considerando que la minociclina, cuando se combina con cloruro de magnesio, es soluble en propilenglicol a niveles de hasta aproximadamente el 7-8 % de equivalente de base libre de minociclina (dependiendo de la temperatura), esto significa que en el ejemplo anterior, la minociclina permanecerá deseablemente en solución (es

decir, en estado disuelto), especialmente a la temperatura elevada de la piel. Además, la concentración de minociclina en la composición residual sería menor que la descrita en este cálculo, ya que parte del etanol transportaría minociclina a la piel en lugar de evaporarse.

- 5 Las composiciones de ejemplo como se proporcionan en el presente documento comprenderán generalmente un mayor porcentaje en peso del alcohol alifático monohídrico en comparación con el poliol. Por ejemplo, las composiciones ventajosas como se describen en el presente documento pueden comprender de aproximadamente el 50 % (p/p) a aproximadamente el 95 % (p/p) de alcohol alifático monohídrico, de aproximadamente el 5 % (p/p) a aproximadamente el 40 % (p/p) de poliol, de aproximadamente el 0,1 % (p/p) a aproximadamente el 10 % (p/p) de fármaco de la clase de las tetraciclinas, y de aproximadamente el 0,2 % (p/p) a aproximadamente el 15 % (p/p) de fuente de magnesio. Algunas composiciones preferidas como se describen en el presente documento pueden comprender de aproximadamente el 60 % (p/p) a aproximadamente el 90 % (p/p) de alcohol alifático monohídrico, de aproximadamente el 5 % (p/p) a aproximadamente el 35 % (p/p) de poliol, de aproximadamente el 0,2 % (p/p) a aproximadamente el 5 % (p/p) de fármaco de la clase de las tetraciclinas, y de aproximadamente el 0,2 % (p/p) a aproximadamente el 10 % (p/p) de fuente de magnesio.

Las composiciones líquidas ilustrativas pueden contener, por ejemplo, uno cualquiera o más de los siguientes porcentajes en peso-peso de alcohol alifático monohídrico, incluidos los intervalos entre cada uno de los siguientes valores: 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % de alcohol, donde preferentemente, el porcentaje en peso de alcohol es mayor que el porcentaje en peso de poliol. Otros intervalos representativos para el componente de alcohol, que pueden combinarse con cantidades p/p o intervalos para el fármaco de tetraciclina y otros componentes de formulación como se proporcionan en el presente documento, son del: 50-55 % p/p, 50-60 % p/p, 50-65 % p/p, 50-70 % p/p, 50-75 % p/p, 50-80 % p/p, 50-85 % p/p, 50-90 % p/p, 50-55 % p/p, 55-60 % p/p, 55-65 % p/p, 55-70 % p/p, 55-75 % p/p, 55-80 % p/p, 55-85 % p/p, 55-90 % p/p, 55-95 % p/p, 60-65 % p/p, 60-70 % p/p, 60-75 % p/p, 60-80 % p/p, 60-85 % p/p, 60-90 % p/p, 60-95 % p/p, 65-70 % p/p, 65-75 % p/p, 65-80 % p/p, 65-85 % p/p, 65-90 % p/p, 65-95 % p/p, 70-75 % p/p, 70-80 % p/p, 70-85 % p/p, 70-90 % p/p, 70-95 % p/p, 75-80 % p/p, 75-85 % p/p, 75-90 % p/p, 75-95 % p/p, 80-85 % p/p, 80-95 % p/p, 85-90 % p/p, 85-95 % p/p, 90-95 % p/p.

Las cantidades representativas de un componente de poliol, incluyen, una cualquiera o más de las siguientes: 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o 40 % (p/p), incluidos los intervalos entre cada uno de los anteriores, tales como, por ejemplo: 5 %-10 % p/p, 5-15 % p/p, 5-20 % p/p, 5-30 % p/p, 5-35 % p/p, 5-40 % p/p, 10-15 % p/p, 10-20 % p/p, 10-25 % p/p, 10-30 % p/p, 10-35 % p/p, 10-40 % p/p, 15-20 % p/p, 15-25 % p/p, 15-30 % p/p, 15-35 % p/p, 15-40 % p/p, 20-25 % p/p, 20-30 % p/p, 20-35 % p/p, 20-40 % p/p, 25-30 % p/p, 25-35 % p/p, 25-40 % p/p, 30-35 % p/p, 30-40 % p/p, o 35-40 % p/p.

La relación entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol está en un intervalo de 1:1 a 99:1 en peso. Como se ha expuesto anteriormente, la composición comprenderá generalmente un mayor porcentaje en peso del alcohol alifático monohídrico en comparación con el poliol. Los ejemplos de relaciones p/p de alcohol con respecto a poliol incluyen, por ejemplo, aproximadamente 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 15:1, 20:1, 25:1, 30:1, 35:1, 40:1, 45:1, 50:1, 55:1, 60:1, 65:1, 70:1, 75:1, 80:1, 85:1, 90:1, y 95:1. La composición puede comprender una relación p/p entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol entre aproximadamente 1:1 y 20:1, o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 15:1, o de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, o de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 20:1, o de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 10:1, o de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 7:1.

En determinadas realizaciones, la composición no comprende un aceite o cera hidrófobos. En algunas otras realizaciones, la composición no comprende un ácido graso y/o un derivado de ácido graso. En algunas realizaciones, la formulación líquida carece de agente espumante.

- 50 Las presentes composiciones también pueden contener cantidades relativamente pequeñas, por ejemplo, menos de aproximadamente el 10 % (p/p) de uno o más excipientes auxiliares adecuados para uso tópico, incluyendo, pero sin limitación, agentes modificadores del pH, conservantes, agentes espesantes, agentes formadores de gel, agentes emulsionantes, antioxidantes, agentes aromatizantes, y similares. Los compuestos adecuados para su incorporación se pueden encontrar, por ejemplo, en R.C. Rowe, *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients (4ª Ed.), Pharmaceutical Press, Londres, 2003.

Los agentes gelificantes que pueden usarse en las composiciones tópicas incluyen agentes gelificantes convencionales bien conocidos por sus propiedades gelificantes, tales como, por ejemplo, éteres de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, y similares; alcoholes vinílicos; vinilpirrolidonas; gomas naturales tales como goma karaya, goma de algarrobo, goma guar, goma gelano, goma de xantano, goma arábica, goma de tragacanto, carragenano, pectina, agar, ácido alginico, alginato de sodio y similares, y metacrilatos tales como los disponibles con el nombre comercial Eudragit® de Rohm Pharma. Otros agentes gelificantes incluyen copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno (poloxámeros) tales como los disponibles con el nombre comercial "Lutrol®", y similares. Los agentes gelificantes preferidos son aquellos que carecen de grupos carboxilo libres tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilcelulosa, celulosa soluble en agua fría/orgánica,

hidroxietilmetilcelulosa, etilcelulosa, etil(hidroxietil)celulosa. Para las celulosas sustituidas, se prefiere un grado de sustitución de moderado a alto para limitar el impacto de los grupos hidroxilo sobre la estabilidad del fármaco de tetraciclina y/o para aumentar la solubilidad del agente gelificante en un sistema disolvente seleccionado. El grado de sustitución preferido es al menos 1,0, o preferentemente en el intervalo de 1,2 a 6,0, o más preferentemente en el intervalo de 2,5 a 4,5.

La composición también puede contener un antioxidante. La cantidad de antioxidante, si está presente, variará normalmente de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente 3,0 % en peso de la composición. Los intervalos ilustrativos incluyen de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 2,5 % en peso de antioxidante, de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 2 % en peso de antioxidante, y de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,5 % en peso de antioxidante. Cantidades ilustrativas de antioxidante incluyen el 0,01 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,075 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 % y el 1 % en peso. En una realización, la cantidad de antioxidante comprendida dentro de la composición es del 0,01 % en peso. En otra realización, la cantidad de antioxidante comprendida en la formulación es del 0,2 % en peso. Los antioxidantes adecuados incluyen, por ejemplo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), butil hidroquinona terciaria, galato de propilo, α -tocoferol, metabisulfito de sodio, y similares. Una clase preferida de antioxidantes son los antioxidantes que contienen azufre tales como metabisulfito de sodio, glutatión, N-acetilcisteína, tioprolina y taurina. Las composiciones preferidas adicionales comprenden un antioxidante seleccionado de la lista que consiste en un compuesto de sulfito, BHT, selenito de sodio, DL-alfa tocoferol, una combinación de ditioeritritol y DL-alfa tocoferol, y eritorbato de sodio. También se prefieren las sales de ácido sulfuroso y los ésteres orgánicos (denominados colectivamente "sulfitos"), tales como bisulfitos, pirosulfitos, metabisulfitos y sulfitos.

En una o más realizaciones, la composición tópica comprende una cantidad adecuada (por ejemplo, de aproximadamente el 0,005 % a aproximadamente el 3,0 % en peso) de un compuesto de sulfito, por ejemplo, una sal de sulfito, metabisulfito o bisulfito, donde el sulfito va acompañado de un contraión adecuado. Como se describe en el Ejemplo 19, los antioxidantes de sulfito son particularmente ventajosos para su uso en las presentes formulaciones tópicas. Como se muestra en la Tabla 24, los antioxidantes a base de sulfito parecen ser particularmente beneficiosos para inhibir la formación de 4-epi-minociclina en composiciones tópicas de minociclina. Véanse, por ejemplo, los datos en las columnas 5 y 6. Ejemplos de sales de sulfito, bisulfito y metabisulfito, por ejemplo, que tienen un contraión adecuado tal como un catión inorgánico u otro (por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio y similares) son particularmente eficaces para inhibir la formación de 4-epi-minociclina, así como para prevenir un cambio de color significativo (es decir, oscurecimiento) de la formulación tras el almacenamiento. También se pueden emplear compuestos orgánicos de sulfito, tales como ésteres orgánicos de ácido sulfuroso, sulfitos acíclicos y sulfitos cíclicos. Ejemplos de sulfitos orgánicos incluyen sulfitos de etilo, p-tolilo e isopropilo, aunque se puede emplear cualquier sulfito orgánico adecuado.

Como se describe en el Ejemplo 19, las composiciones preferidas que comprenden un antioxidante de sulfito muestran una concentración inicial baja de 4-epi-minociclina (en relación con la minociclina) y un aumento pequeño o nulo en la formación de 4-epi-minociclina en el tiempo, por ejemplo, por semana. Por ejemplo, en algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 5,0 % al inicio y aumenta menos del 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, donde el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. En algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 1,0 % en una medición inicial y aumenta menos del 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Más preferentemente, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 1,0 % en una medición inicial y aumenta menos del 0,70 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Preferentemente, la concentración relativa de 4-epi-minociclina está en el intervalo de aproximadamente el 0,50 % a aproximadamente el 1,00 % en una medición inicial y aumenta a una tasa en el intervalo de aproximadamente el 0,20 % a aproximadamente el 0,40 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados.

Las composiciones preferidas exhiben adicionalmente una alta concentración relativa de minociclina activa y una disminución pequeña o nula en la concentración relativa de minociclina activa en el tiempo. Por ejemplo, en algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de minociclina activa es de al menos el 95,0 % en una medición inicial y disminuye menos del 1,50 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. En algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de minociclina activa es de al menos el 98,0 % en una medición inicial y disminuye menos del 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Más preferentemente, la concentración relativa de minociclina es de al menos el 98,50 % en una medición inicial y disminuye menos del 0,70 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Preferentemente, la concentración relativa de minociclina está en el intervalo de aproximadamente el 97,0 % a aproximadamente el 99,0 % en una medición inicial y disminuye a una tasa en el

intervalo de aproximadamente el 0,30 % a aproximadamente el 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial.

5 Como se muestra en la Tabla 24, los antioxidantes a base de sulfito también parecen ser particularmente ventajosos para prevenir un cambio de color (es decir, oscurecimiento) de las formulaciones que contienen minociclina, como se indica en la columna 6. Este estudio evaluó la diferencia de color entre las composiciones al inicio y después del envejecimiento durante 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados. Las cuatro composiciones que incluían un antioxidante de sal de sulfito, es decir, las composiciones 2-ss, 3-sb, 17-ps, y 1-sbs, no mostraron diferencias significativas de color entre las composiciones envejecidas e iniciales cuando se observaron visualmente. Las composiciones con antioxidantes no basadas en sulfito mostraron un cambio de color significativo (oscurecimiento) en el tiempo en las condiciones de almacenamiento empleadas. Las composiciones preferidas no muestran un cambio de color significativo después del envejecimiento durante 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados. Se describe un método adecuado para evaluar el cambio de color en el Ejemplo 19.

15 La composición puede contener además uno o más conservantes en una cantidad que varía normalmente de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 2,0 % en peso de la composición. Los conservantes ilustrativos incluyen, por ejemplo, fenoxietanol, metil parabeno, propil parabeno, butil parabeno, alcohol bencílico, y similares.

20 La composición tópica también puede comprender una pequeña cantidad, tal como del 0,1 % al 10 % en peso, de uno o más compuestos eficaces para introducir un olor o aroma favorable, tal como un aceite natural u otro agente adecuado. Los aceites esenciales adecuados incluyen, por ejemplo, aceites esenciales vegetales de eucalipto, incienso, pachulí, menta, limón, lavanda, naranja, rosa mosqueta, romero, árbol de té, jazmín, y similares. Por ejemplo, en una o más realizaciones, la composición comprende una pequeña cantidad, tal como del 0,1 % al 5 % en peso, de 1,8-cineol o algún otro aceite esencial.

30 La combinación de poliol y 1,8-cineol puede ser particularmente eficaz para prevenir la descamación y la sequedad extrema de la piel, especialmente cuando la administración es durante un periodo de tiempo prolongado, por ejemplo, durante 2 semanas o más. Los signos de piel seca que se pueden prevenir incluyen descamación y picazón.

35 La composición tópica puede estar en varias formas diferentes, incluyendo, por ejemplo, una solución, líquido, aerosol, espuma, loción, gel, y similares. Preferentemente, la composición es un líquido, tiene buena estabilidad, se adhiere a la piel, y tiene un tacto suave. Preferentemente, la composición no es una emulsión. Generalmente, las composiciones preferidas no tienen nanopartículas ni micropartículas, aunque, en algunos casos, la composición puede comprender nanopartículas y/o micropartículas. Para obtener información adicional con respecto a formulaciones adecuadas, véanse, por ejemplo, "Remington: The Science and Practice of Pharmacology", 22ª edición, (Pharmaceutical Press, 2013).

40 En referencia a la estabilidad de las composiciones proporcionadas en el presente documento, se realizaron experimentos de estabilidad en composiciones de ejemplo para evaluar el grado de degradación del fármaco de la clase de las tetraciclinas en la composición en el tiempo como se describe en el Ejemplo 3. El compuesto de tetraciclina, minociclina, experimenta epimerización C4, por ejemplo, en presencia de agua o un disolvente prótico polar. El producto o productos de degradación poseen una actividad antibiótica insignificante, de modo que la degradación significativa de la minociclina en una formulación durante su vida útil dará como resultado una actividad reducida de la formulación. Como se puede ver en los resultados de las Tablas 3 y 4, las composiciones que contienen magnesio exhibieron una mejora significativa sobre las composiciones sin magnesio con respecto a la cantidad de epímero formado (y viceversa, la cantidad de minociclina intacta conservada en la composición), basándose en datos de extrapolación de 18 meses. Las composiciones designadas 90-Mg, 80-Mg y 75-Mg, que contenían aproximadamente el 75-90 % (p/p) de etanol (es decir, un alcohol alifático monohídrico) y el 10-25 % (p/p) de propilenglicol (es decir, un poliol) formaron solo del 3 % (p/p) a aproximadamente el 7 % (p/p) de epímero en las condiciones de prueba, mientras que para las composiciones sin magnesio, se observó una conversión del 99-100 % en epímero. Este ejemplo demuestra el efecto estabilizador significativo del magnesio en las presentes composiciones, por ejemplo, para prevenir/minimizar la degradación/epimerización de la minociclina y mantener la actividad de la formulación en el tiempo. Cuando se comparan adicionalmente entre las composiciones que contienen magnesio, las composiciones que contienen de aproximadamente el 25-50 % (p/p) de etanol (es decir, alcohol alifático monohídrico) y de aproximadamente el 50-75 % (p/p) de poliol (propilenglicol) contenían aproximadamente el doble de la cantidad extrapolada de epímero en comparación con las composiciones que contenían Mg que tenían porcentajes en peso más altos del alcohol alifático monohídrico y porcentajes en peso más bajos del poliol. Por lo tanto, en una o más realizaciones, parece que el componente de etanol (por ejemplo, alcohol monohídrico) tiene un efecto estabilizador sobre las composiciones tópicas, especialmente en presencia de magnesio y cuando se combina con un poliol.

65 Puede usarse una amplia diversidad de métodos para preparar las composiciones descritas en el presente documento. En términos generales, las composiciones se pueden preparar combinando entre sí los componentes de las composiciones, como se describe en el presente documento, a una temperatura y durante un tiempo suficientes

para proporcionar una composición deseable y farmacéuticamente eficaz. El término "combinar entre sí", como se usa en el presente documento, significa que todos los componentes de las composiciones se combinan y se mezclan entre sí aproximadamente al mismo tiempo, o que diversos componentes se combinan en una o más secuencias u órdenes de adición para proporcionar el producto deseado. La composición se puede preparar sobre una base en peso/peso (p/p) o peso/volumen (p/v). La composición generalmente se extenderá fácilmente, por ejemplo, sobre una superficie de la piel, y preferentemente no será goteante.

La composición se puede preparar, por ejemplo, mediante la mezcla de los ingredientes normalmente mediante el uso de una agitación vigorosa tal como una mezcla de alto cizallamiento. La mezcla también se puede realizar mediante cualquier método adecuado utilizando cualquier medio manual o automático adecuado. Las etapas adicionales opcionales incluyen las que dan como resultado la adición de uno o más de los ingredientes auxiliares opcionales como se ha expuesto anteriormente. Los métodos para preparar una formulación farmacéutica se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Handbook of Pharmaceutical Formulations: Liquid Products*, Vol. 3, S. Niazi., CRC Press, 2004.

La composición se puede aplicar por vía tópica directamente a las áreas afectadas de la piel, por ejemplo, usando las yemas de los dedos, un aplicador de esponja, un aplicador de algodón, por pulverización, aerosolización o cualquier otro método adecuado. Las composiciones proporcionadas en el presente documento son útiles para tratar cualquier afección que sea susceptible de tratamiento con un fármaco de la clase de las tetraciclinas, tal como minociclina. Las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden usarse, por ejemplo, para tratar afecciones tales como acné, impétigo, celulitis, erisipelas, foliculitis, forúnculos, carbunclos, enfermedad de Lyme y otras infecciones de la piel, rosácea, dermatitis seborreica, dermatosis ampollosa, sarcoidosis cutánea, sarcoma de Kaposi, y dermatosis neutrofílica, e inflamación asociada con las mismas. Los tipos de acné incluyen, por ejemplo, acné común, acné rosácea, acné conglobata, acné fulminante, foliculitis gramnegativa y pioderma facial, entre otros. Por ejemplo, la composición puede usarse para tratar el acné de moderado a grave, y el acné puede ser nodular o quístico.

El método puede comprender la etapa de administrar una composición tópica como se proporciona en el presente documento a una superficie corporal accesible de un ser humano o un animal que necesite tal tratamiento. Generalmente, la composición se puede aplicar en una cantidad convencional de una a varias veces a la semana o diariamente sobre las áreas afectadas de la piel, hasta que el acné o la afección que se está tratando haya disminuido o desaparecido visiblemente. Por ejemplo, la composición tópica se puede aplicar por vía tópica al menos una vez al día durante un periodo de al menos 1 mes, o se puede aplicar a la piel una o dos veces al día durante un periodo de 6 a 52 semanas o incluso más. El número de aplicaciones y el transcurso del tratamiento variarán con la gravedad de la afección que se esté tratando, las consideraciones del paciente, y similares. Por lo tanto, la composición puede, en determinados casos, aplicarse una vez al día, dos veces al día, una vez cada dos días, de una a tres veces a la semana, de 1 a 4 veces a la semana, cada 3 días, etc.

Una cantidad convencional es una cantidad que es suficiente para extender, por ejemplo, una capa fina, sobre el área afectada. Si se desea, la eficacia del tratamiento se puede cuantificar mediante el uso de un sistema de clasificación tal como el sistema de Leeds (O' Brien, SC., *et al.*, J. Dermatol Treat 1998; 9:215-220), la Escala integral de gravedad del acné (Tan, JK, *et al.*, J. Cutan Med Surg 2007 Nov; 11(6):211-6), o el sistema global de clasificación del acné (Doshi, A., *et al.*, Int. J. Dermatol 1997 Jun 36(6); 416-8). En una o más realizaciones, la eficacia del tratamiento se evalúa mediante un examen visual del área afectada. En algunos casos, el tratamiento profiláctico puede continuarse incluso si la afección ha disminuido o desaparecido visiblemente, como medida preventiva. En algunas realizaciones, la eficacia del tratamiento se evalúa mediante una evaluación de una reducción en el recuento total de lesiones, donde la aplicación de una composición tópica como se describe en el presente documento es eficaz para dar como resultado una reducción en el recuento total de lesiones según se mide desde el inicio del tratamiento.

CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS DISOLVENTES Y COMPOSICIONES TÓPICAS

Pasando ahora a la consideración de los Ejemplos, el Ejemplo 1 demuestra la solubilidad de la minociclina en complejo con magnesio en comparación con la minociclina en solitario (es decir, minociclina no complejada) en el mismo sistema disolvente en función de la concentración de etanol y propilenglicol en la composición a temperatura ambiente y en condiciones atmosféricas. Tal como se puede observar, la minociclina en complejo con magnesio es considerablemente más soluble en una mezcla que comprende etanol y propilenglicol que en etanol o propilenglicol independientemente. Además, la minociclina en complejo con magnesio es particularmente más soluble que la minociclina en una mezcla que comprende etanol y propilenglicol.

Como se demuestra en el Ejemplo 1, el clorhidrato de minociclina tiene una solubilidad que excede los 100 mg/ml (por ejemplo, 100 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml) a temperatura ambiente en composiciones seleccionadas que comprenden etanol, propilenglicol y cloruro de magnesio. Por lo tanto, en determinadas realizaciones preferidas, la composición tópica comprende los componentes anteriores además del fármaco de la clase de las tetraciclinas, es decir, etanol, propilenglicol y cloruro de magnesio.

Además, como se demuestra en el Ejemplo 1, los Solicitantes han descubierto que la adición de una fuente de magnesio, tal como cloruro de magnesio, a una composición tópica como se describe en el presente documento aumenta la solubilidad de un fármaco de la clase de las tetraciclinas, tal como minociclina, en mezclas de un alcohol alifático monohídrico, tal como etanol, y un poliol, tal como propilenglicol, particularmente para composiciones en las que la cantidad en peso del alcohol excede la cantidad del poliol. Por lo tanto, en una o más realizaciones preferidas, la cantidad en peso de alcohol en la composición excede la cantidad en peso del componente poliol.

En los gráficos presentados como las figuras 1a y 1b, las concentraciones de clorhidrato de minociclina se representan en función de la concentración de etanol en el sistema disolvente. Ambas figuras 1a y 1b ilustran que la incorporación de cloruro de magnesio en las presentes composiciones aumenta significativamente la solubilidad del clorhidrato de minociclina, particularmente para etanol en solitario (etanol al 100 %) y para composiciones con altas concentraciones de etanol en mezclas de etanol y propilenglicol. Además, las cantidades relativas de cada uno de los componentes de la composición, por ejemplo, alcohol alifático monohídrico y poliol, necesarias para lograr la máxima solubilidad del fármaco, cambian tras la adición de la sal de magnesio. Particularmente, en el Ejemplo 1, la concentración pico (es decir, máxima) de fármaco disuelto para mezclas de etanol y propilenglicol cambia de aproximadamente el 25 % de etanol a aproximadamente el 75 % de etanol tras la incorporación de una sal de magnesio, y la cantidad máxima de fármaco que se disuelve aumenta aproximadamente al doble tras la incorporación de la sal de magnesio.

En composiciones tópicas de ejemplo, la relación del alcohol alifático monohídrico con respecto al poliol excede 1:1 (p/p), es decir, está entre 1:1 y 99:1 (p/p), o está entre 3:2 y 9:1 (p/p), o está entre 2:1 y 4:1 (p/p), y la cantidad combinada del poliol y el alcohol alifático monohídrico en la composición excede el 50 % (p/p), o preferentemente excede el 75 % (p/p) de la composición, o más preferentemente excede el 90 % (p/p), de la composición. En algunas composiciones, la relación de etanol con respecto a propilenglicol excede 1:1 (p/p), tal como entre 1:1 y 99:1 (p/p), entre 3:2 y 9:1 (p/p), o entre 2:1 y 4:1 (p/p), y la cantidad combinada de propilenglicol y etanol en la composición excede el 50 % (p/p), o preferentemente excede el 75 % (p/p) de la composición, o más preferentemente excede el 90 % (p/p), de la composición. En dichas composiciones, el fármaco de la clase de las tetraciclinas es, en una o más realizaciones, minociclina.

Cuando una composición que comprende un alcohol alifático monohídrico volátil, tales como etanol o isopropanol, se aplica a la piel, el alcohol volátil abandona la superficie de la piel rápidamente, por evaporación, penetración o una combinación de ambas. Esta rápida reducción del contenido de disolvente puede aumentar significativamente la concentración del fármaco de la clase de tetraciclina activa en la superficie de la piel o dentro de las capas superiores del tejido cutáneo. Si la solubilidad del material en el disolvente restante es insuficiente para mantener el fármaco en solución, el fármaco puede formar una fase sólida, lo que reducirá la tasa de penetración posterior del fármaco en la piel porque el fármaco primero debe superar la barrera de energía de disolución antes de penetrar en la piel. Por este motivo, si se usa un alcohol alifático monohídrico volátil, puede ser preferible que la concentración del alcohol volátil sea mayor que el punto de máxima solubilidad.

En algunas composiciones, la relación del alcohol alifático monohídrico con respecto al poliol excede 3:1 (p/p), tal como entre 3:1 y 99:1 (p/p), entre 3:1 y 9:1 (p/p), o entre 4:1 y 8:1 (p/p), y la cantidad combinada de poliol y alcohol alifático monohídrico en la composición excede el 50 % (p/p), o preferentemente excede el 75 % (p/p) de la composición, o más preferentemente excede el 90 % (p/p), de la composición. En algunas composiciones, la proporción entre etanol y propilenglicol excede 3:1 (p/p), tal como entre 3:1 y 99:1 (p/p), entre 3:1 y 9:1 (p/p), o entre 4:1 y 8:1 (p/p), y la cantidad combinada de propilenglicol y etanol en la composición excede el 50 % (p/p), o preferentemente excede el 75 % (p/p) de la composición, o más preferentemente excede el 90 % (p/p), de la composición. En dichas composiciones, el fármaco de la clase de las tetraciclinas es preferentemente minociclina.

Además, para composiciones en las que el poliol es menos volátil que el alcohol, la concentración del fármaco en la composición en la superficie de la piel precipitará normalmente menos rápidamente que si no se usa el poliol. Esta tasa de precipitación más lenta permitirá que el fármaco tenga más tiempo para penetrar en la piel, lo que puede ser beneficioso para mejorar la eficiencia de la administración del fármaco al tejido diana (por ejemplo, epidermis, dermis o glándula sebácea) o fluido corporal diana (por ejemplo, sebo).

Pasando ahora al Ejemplo 2, este ejemplo proporciona datos de calorimetría diferencial de barrido que demuestran que la diferencia de solubilidad descrita en el Ejemplo 1 parece ser resultado de un eutéctico que se forma por la interacción de los componentes de la clase representativos, minociclina, magnesio, etanol, y propilenglicol.

El Ejemplo 3 proporciona datos de estabilidad a corto plazo que indican que la minociclina no es suficientemente estable en propilenglicol en solitario, incluso cuando se estabiliza por la presencia de magnesio. Por el contrario, se produce una composición estable combinando etanol y propilenglicol. La estabilización con magnesio mejora notablemente la estabilidad de la composición de combinación como puede verse por los resultados de la Tabla 2. Las composiciones preferidas son aquellas que tienen bajas cantidades de formación de epímeros, cuando se extrapolan a una estabilidad de 18 meses. Se prefieren las composiciones en las que la formación de epímeros es inferior a aproximadamente el 15 % en las condiciones de estabilidad acelerada empleadas.

Pasando al Ejemplo 4, el Ejemplo 4 presenta datos de estudios *ex vivo* de penetración farmacológica en muestras de tejido humano. Estos experimentos cuantifican la cantidad de minociclina que penetra más allá del primer par de capas de la piel después de la aplicación tópica de la composición y demuestran (i) que la eficacia de penetración aumenta a medida que el propilenglicol se reemplaza por etanol, y (ii) la buena eficacia de penetración en la piel.

5 En algunas realizaciones, la eficacia de penetración multiplicada por la concentración del fármaco de la clase de las tetraciclinas en la composición excederá deseablemente la concentración inhibitoria mínima de la bacteria *P. acnes* ATCC 6919 para el fármaco de la clase de las tetraciclinas. En algunas realizaciones, la eficacia de penetración del fármaco de la clase de las tetraciclinas (en muestras de piel humana *ex vivo* como se describe en el Ejemplo 4) excede el 5 %, más preferentemente excede el 8 %, o incluso más preferentemente excede el 10 %. En algunas realizaciones, la eficacia de penetración del fármaco de la clase de las tetraciclinas está en un intervalo de aproximadamente el 5 % al 30%, o está en un intervalo de aproximadamente el 5 % al 10 %, o más preferentemente, está en un intervalo del 10 % al 30 %.

15 Al considerar los resultados proporcionados en el Ejemplo 5, este ejemplo ilustra que el valor de MIC para la minociclina se altera por la presencia de magnesio, lo que sugiere que la minociclina forma un complejo con magnesio que no se forma con calcio. El valor de MIC (o, como alternativa, un múltiplo designado del mismo) puede usarse como un umbral para determinar si se ha logrado la administración adecuada en un tejido diana. Los datos del Ejemplo 4 indican que la eficacia de penetración es suficiente para superar la MIC para la minociclina para concentraciones de minociclina que están muy por debajo de los límites de solubilidad medidos en el Ejemplo 1.

25 Los Ejemplos 6 y 7 muestran que no sólo la minociclina aplicada por vía tópica comprendida en las formulaciones proporcionadas en el presente documento penetra en la piel, sino que se divide preferencial y ventajosamente en las glándulas sebáceas y depósitos oleosos de la piel. Los datos se presentan a partir de experimentos que utilizan espectrometría de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (espectrometría de masas MALDI-TOF) (Ejemplo 6) y técnicas de microscopía fluorescente (Ejemplo 7). Véanse, por ejemplo, las figuras 4a-c y las figuras 5a-c, y la figura 6. Basándose en estos datos, parece que la tetraciclina se administra preferentemente a tejidos ricos en lípidos, tanto en la piel como dentro de ella.

30 El Ejemplo 8 proporciona datos de un estudio *in vivo* en ratas Sprague-Dawley que indica que la aplicación tópica diaria repetida de las composiciones de acuerdo con la invención no irrita ni tinte la piel. Por lo tanto, en una o más realizaciones, la composición tópica no es irritante cuando se aplica a la piel. En aún otra realización, la composición tópica no tinte cuando se aplica a la piel de un sujeto.

35 El Ejemplo 9 describe un método para la optimización preliminar de la relación molar de magnesio con respecto a un fármaco de la clase de las tetraciclinas para un sistema disolvente particular. El método demuestra una correlación aproximada entre la estabilidad del fármaco dentro de la formulación y su emisión de fluorescencia. Usando este método, se puede determinar una relación óptima de magnesio con respecto a minociclina.

40 Diversas realizaciones de ejemplo de la composición tópica se describen en el Ejemplo 10 de acuerdo con la divulgación.

45 Proporcionando soporte adicional para la estabilidad de las presentes formulaciones, el Ejemplo 11 proporciona datos de estabilidad a temperatura ambiente de 6 meses que indican que la minociclina es estable en una solución que comprende propilenglicol, etanol y cloruro de magnesio.

Además de los datos descritos anteriormente en relación con los Ejemplos 6 y 7, el Ejemplo 12 proporciona un soporte adicional para la excelente absorción por la piel de las formulaciones líquidas de acuerdo con la invención, y además demuestra la naturaleza superior de las presentes formulaciones en comparación con una formulación lipófila ilustrativa. En las formulaciones ilustrativas de minociclina tanto al 1 % como al 4 %, la eficiencia de absorción fue 2-3 veces mayor para las formulaciones hidrófilas que se proporcionan en el presente documento (que comprenden minociclina, cloruro de magnesio, etanol, propilenglicol y metabisulfito de sodio) en comparación con una formulación lipófila como se describe en la Tabla. 9. Además, las formulaciones de acuerdo con la invención dieron como resultado cantidades menores de epímero de minociclina detectado en la piel tratada en comparación con la formulación lipófila, lo que indica la estabilidad mejorada de las presentes formulaciones en comparación con la formulación lipófila. Los resultados de las imágenes fluorescentes ilustraron que la formulación de minociclina al 4 %, BPX-4M, administró mayores cantidades de minociclina a las capas del estrato córneo, la epidermis y las glándulas pilosebáceas en comparación con una formulación ilustrativa lipófila al 4 %.

60 Las presentes formulaciones son eficaces para proporcionar una dosis terapéuticamente eficaz de un fármaco de la clase de las tetraciclinas cuando se aplica por vía tópica sobre la piel; véanse, por ejemplo, el Ejemplo 13. Los ejemplos de apoyo también ilustran la naturaleza no irritante de las presentes composiciones. Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 14, 15, y 18. Además, los resultados tales como los descritos en el Ejemplo 16 demuestran que la dosificación repetida de un mamífero se puede realizar de forma segura para las composiciones proporcionadas en el presente documento a niveles de dosificación de minociclina en el intervalo de 0,0 mg/cm²/día a 0,5 mg/cm²/día, o preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,025 mg/cm²/día a aproximadamente 0,5 mg/cm²/día, o más

preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,025 mg/cm²/día a aproximadamente 0,25 mg/cm²/día. Las dosis más altas de minociclina permiten tratamientos más agresivos. Se prefieren dosis de al menos 0,01 mg/cm²/día o dosis de al menos 0,025 mg/cm²/día.

- 5 El Ejemplo 19 ilustra algunas de las ventajas asociadas con el uso de un antioxidante a base de sulfito en composiciones tópicas líquidas del tipo descrito en el presente documento cuando se ponen en condiciones de almacenamiento durante un periodo de tiempo prolongado. Este ejemplo destaca el reconocimiento de que las composiciones que se proporcionan en el presente documento y que comprenden un compuesto de sulfito (como antioxidante) son significativamente más estables que las composiciones que comprenden antioxidantes sin sulfito.
- 10 Las composiciones preferidas muestran una concentración relativa de 4-epi-minociclina inicial baja y un aumento pequeño o nulo en la concentración relativa de 4-epi-minociclina por semana cuando se almacenan en condiciones de almacenamiento representativas. Por ejemplo, en algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 5,0 % en una medición inicial y aumenta menos del 1,00 % por semana cuando la composición líquida se mide (evalúa) durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. En algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 1,0 % en una medición inicial y aumenta menos del 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Más preferentemente, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 1,0 % en una medición inicial y aumenta menos del 0,70 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Preferentemente, la concentración relativa de 4-epi-minociclina está en el intervalo de aproximadamente el 0,50 % a aproximadamente el 1,00 % en una medición inicial y aumenta a una tasa en el intervalo de aproximadamente el 0,20 % a aproximadamente el 0,40 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial.

- Además, las composiciones preferidas muestran una concentración relativa de minociclina activa alta y una disminución pequeña o nula en la concentración relativa de minociclina activa por semana. Por ejemplo, en algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de minociclina activa es de al menos el 95,0 % en una medición inicial y disminuye menos del 1,50 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. En algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de minociclina activa es de al menos el 98,0 % en una medición inicial y disminuye menos del 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Más preferentemente, la concentración relativa de minociclina es de al menos el 98,50 % en una medición inicial y disminuye menos del 0,70 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Preferentemente, la concentración relativa de minociclina está en el intervalo de aproximadamente el 97,0 % a aproximadamente el 99,0 % en una medición inicial y disminuye a una tasa en el intervalo de aproximadamente el 0,30 % a aproximadamente el 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Los cálculos para determinar las concentraciones relativas de 4-epi-minociclina y minociclina activa se describen en el Ejemplo 19.

- Como se muestra en el Ejemplo 19, las composiciones representativas que incluían un compuesto de sulfito como antioxidante, es decir, las composiciones 2-ss, 3-sb, 17-ps, y 1-sbs, no tenían una diferencia significativa de color entre las composiciones envejecidas e iniciales cuando se examinaron en las condiciones de almacenamiento descritas anteriormente. Cada una de las demás composiciones sin sulfito mostró una diferencia de color significativa. La fuerza de estas diferencias de color no se correlacionó con la cantidad de degradación de la concentración relativa de la minociclina activa. Las composiciones preferidas no muestran cambios de color significativos después del envejecimiento durante 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados. En una composición preferida, el cambio de color después del envejecimiento durante 4 semanas a 40 °C en un vial de vidrio cerrado es menos de 50, o más preferentemente menos de 20, de distancia en un espacio RGB tridimensional donde cada valor se mide en un intervalo de 0-255. La distancia se calcula en un espacio RGB tridimensional de acuerdo con la siguiente fórmula: $\text{distancia}_{\text{RGB}} = ((\Delta R)^2 + (\Delta G)^2 + (\Delta B)^2)^{0.5}$.

- Las ventajas y características adicionales de las presentes formulaciones se describen a lo largo del presente documento.

- Por lo tanto, varias propiedades ventajosas están asociadas con las formulaciones y métodos de tratamiento tópico descritos en el presente documento. Las formulaciones tópicas son eficaces para administrar el fármaco de tetraciclina directamente a la epidermis y las glándulas sebáceas. Además, las formulaciones descritas en el presente documento son fáciles de aplicar, no son pegajosas, y no ocuyen la piel. Las formulaciones proporcionan una administración eficaz del fármaco de tetraciclina, por ejemplo, minociclina, a las glándulas sebáceas donde reside P. acne, en cantidades terapéuticamente eficaces, y demuestran un potencial de irritación mínimo o nulo.

Además, las formulaciones son estables durante un periodo de tiempo prolongado y tras la aplicación, por ejemplo, como se demuestra mediante la formación de cantidades mínimas de producto de epimerización.

Ejemplos

- 5 Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo se preparan y evalúan la composición, sus componentes, principios activos, disolventes y similares, junto con los métodos relacionados, y pretender ser puramente ilustrativos. Por lo tanto, los ejemplos no pretenden de ningún modo limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Existen numerosas
- 10 variaciones y combinaciones, por ejemplo, concentraciones de componentes, disolventes deseados, mezclas de disolventes, antioxidantes y otros parámetros y condiciones de la mezcla que se pueden emplear para optimizar las características de la composición tales como pureza, rendimiento, estabilidad, olor, color, viscosidad, penetración y similares. Estos también se consideran dentro del alcance de la presente divulgación.
- 15 A menos que se indique de otro modo, en cada uno de los siguientes ejemplos, la forma de clorhidrato de minociclina que se utilizó fue clorhidrato de minociclina dihidrato, que se denomina en los ejemplos a continuación simplemente como "clorhidrato de minociclina". Será evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden preparar las composiciones usando otras sales e hidratos de minociclina.
- 20 **EJEMPLO 1**
- SOLUBILIDAD DE LA MINOCICLINA Y MINOCICLINA ESTABILIZADA CON MAGNESIO**
- 25 Se realizó un estudio para evaluar el efecto del cloruro de magnesio ($MgCl_2$) sobre la solubilidad de la minociclina en mezclas de etanol y propilenglicol. Se prepararon mezclas de etanol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), propilenglicol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), y 1,8-cineol (Penta International Company, Livingston, NJ) como se describe en la Tabla 1. Las composiciones corresponden a las siguientes relaciones en peso aproximadas de etanol y propilenglicol: 0:1, 1:3, 1:1, 3:1, 4:1, 9:1, y 1:0.
- 30 Las muestras 90-Mg, 80-Mg, 75-Mg, 50-Mg, 90-Mg-0C, 80-Mg-0C, 75-[^]Mg-0C, 70-Mg-0C, 60-Mg-0C, y 05-Mg-0C son según las reivindicaciones; las demás muestras son muestras de referencia.

Tabla 1. MEZCLAS PARA EXPERIMENTOS DE SOLUBILIDAD CON CANTIDADES VARIABLES DE CLORURO DE MAGNESIO

DESIGNACIÓN DE LA MUESTRA	ETANOL (% P/P)	PROPILENGLICOL (% P/P)	1,8-CINEOL (% P/P)	MATERIAL DE PRUEBA
100-MNC	99	0	1	Minociclina*HCl
90-MNC	89,5	9,5	1	Minociclina*HCl
80-MNC	79,5	19,5	1	Minociclina*HCl
75-MNC	74,5	24,5	1	Minociclina*HCl
50-MNC	49,5	49,5	1	Minociclina*HCl
25-MNC	24,5	74,5	1	Minociclina*HCl
0-MNC	0	99	1	Minociclina*HCl
100-Mg	99	0	1	Minociclina*HCl - MgCl ₂
90-Mg	89,5	9,5	1	Minociclina*HCl - MgCl ₂
80-Mg	79,5	19,5	1	Minociclina*HCl - MgCl ₂
75-Mg	74,5	24,5	1	Minociclina*HCl - MgCl ₂
50-Mg	49,5	49,5	1	Minociclina*HCl - MgCl ₂
25-Mg	24,5	74,5	1	Minociclina*HCl - MgCl ₂
0-Mg	0	99	1	Minociclina*HCl - MgCl ₂
100-MNC-0C	100	0	0	Minociclina*HCl
90-MNC-0C	90	10	0	Minociclina*HCl
80-MNC-0C	80	20	0	Minociclina*HCl
75-MNC-0C	75	25	0	Minociclina*HCl
70-MNC-0C	70	30	0	Minociclina*HCl
60-MNC-0C	60	40	0	Minociclina*HCl
50-MNC-0C	50	50	0	Minociclina*HCl
25-MNC-0C	25	75	0	Minociclina*HCl
0-MNC-0C	0	100	0	Minociclina*HCl
100-Mg-0C	100	0	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂
90-Mg-0C	90	10	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂
80-Mg-0C	80	20	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂
75-Mg-0C	75	25	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂
70-Mg-0C	70	30	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂
60-Mg-0C	60	40	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂
50-Mg-0C	50	50	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂
25-Mg-0C	25	75	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂
0-Mg-0C	0	100	0	Minociclina*HCl - MgCl ₂

- 5 Se emplearon dos materiales de prueba como se muestra en la Tabla 1. El primer material de prueba, "minociclina*HCl con MgCl₂", se formó mezclando clorhidrato de minociclina (Euticals S.P.A, Origgio, Italia) con cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) en una relación de 1:1 (p/p). (Como se ha descrito anteriormente, se usó "clorhidrato de minociclina dihidrato" en los Ejemplos en los que se menciona "clorhidrato de minociclina"). La mezcla se mezcló en un mezclador de vórtice (VORTEX GENIE, Scientific Industries, Inc. Bohemia,

NY) a aproximadamente 3000 rpm hasta obtener una mezcla uniforme o durante al menos 3 minutos. Una relación de 1:1 (p/p) de cloruro de magnesio (anhidro) y clorhidrato de minociclina corresponde a una relación molar de aproximadamente 5,6:1 de magnesio con respecto a minociclina. El segundo material de prueba, "minociclina*HCl", fue clorhidrato de minociclina en solitario.

Se pusieron dos gramos (2,0 g) de cada uno de los disolventes enumerados en la Tabla 1 en un vial de vidrio transparente de 4 ml (Phenomenex, Torrance, CA). Se añadió una pequeña cantidad del material de prueba a cada vial de vidrio, se puso la tapa sobre el vial, y el vial se agitó usando un mezclador de vórtice (VORTEX GENIE, Scientific Industries, Inc. Bohemia, NY) y se sometió a sonicación (Branson 3210, Branson Ultrasonics, Danbury, CT). Estas etapas se repitieron hasta que el material de prueba añadido ya no se disolvió completamente después de la sonicación. A continuación, cada vial de vidrio se dejó durante una noche a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad con la tapa sellada herméticamente. Estas etapas crearon una solución saturada en cada vial de vidrio. Una muestra de 100 microlitros (μ l) de la porción líquida de la mezcla se eliminó de parte superior de cada vial. Durante esta etapa de muestreo, se tuvo cuidado de no alterar ningún sólido precipitado en el fondo de cada vial. Cada una de estas porciones muestreadas se centrifugó en una microcentrífuga (SORVALL RMC 14, DuPont Sustainable Solutions, Wilmington, DE) a 12.000 rpm durante 2 minutos. Se mezcló una porción de 20 microlitros (μ l) del sobrenadante con etanol en una relación de 1:49. Se usó una porción de 5 microlitros (μ l) de la mezcla resultante en un método de HPLC para la evaluación de minociclina como se describe en el siguiente párrafo.

El método de HPLC descrito en este párrafo y los cálculos descritos en el siguiente párrafo se utilizan para todos los Ejemplos descritos en el presente documento que describen concentraciones medidas de minociclina, excepto cuando se describe una variación o un método alternativo. Se inyecta una muestra de 5 microlitros (μ l) en una máquina de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Agilent, Santa Clara, CA). La columna de HPLC (Phenomenex, Inc. Torrance, CA) era una columna C-18 de 100 x 4,6 mm con un tamaño de partícula de 5 micrómetros (μ m). El sistema de HPLC también utilizó una columna de protección (Phenomenex, Inc.) y una fase móvil que consistía en un disolvente base de dimetilformamida al 12 % (v/v) (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), tetrahidrofurano al 8 % (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), EDTA 18 mM (Spectrum Chemicals, Gardena, CA) y oxalato de amonio 0,12 M (Spectrum Chemicals, Gardena, CA). Se ajustó el pH de la fase móvil a 7,1-7,2. El caudal de HPLC fue de 1 ml por minuto con una temperatura de columna de 40 °C, una longitud de onda de detección de 280 nm y un tiempo de ciclo de al menos 15 minutos. La cantidad de minociclina que estaba en solución se determinó basándose en una calibración externa. Esto permitió el cálculo de la concentración de clorhidrato de minociclina.

La degradación de la minociclina a su epímero se cuantificó evaluando el cambio en la concentración relativa de 4-epi-minociclina, que se calculó como el área pico de 4-epi-minociclina dividida por la suma del área pico de 4-epi-minociclina y el área pico de minociclina activa. Como cuantificación separada, la estabilidad se cuantificó evaluando el cambio en la concentración relativa de minociclina activa, que se calculó como el pico de minociclina activa dividido por la suma de las áreas picos de todos los picos observados en el cromatógrafo HPLC. El término todos los picos en este sentido significa los picos que se producen después de la elución de los picos de disolvente. Los picos de disolvente generalmente elúan en los primeros 2 minutos y, por lo tanto, la medición de todos los picos comenzó en el punto de los 2 minutos. Como será evidente para los expertos en la técnica, la ubicación de los picos de disolvente puede variar y el punto de inicio se ajustará en consecuencia.

Para este Ejemplo 1, la concentración resultante describe la concentración que se disolvió en los 2 gramos de mezcla de disolvente que se añadió primero a cada vial de vidrio.

En las figuras 1A y 1B, las concentraciones resultantes de clorhidrato de minociclina se representan en función de la concentración de etanol en el sistema disolvente. Por lo tanto, estos gráficos representan la solubilidad de la minociclina activa en función de la concentración de etanol en la composición en peso para composiciones con cineol al 1 % (figura 1A) y sin cineol (figura 1B). Los resultados demuestran que la adición de cloruro de magnesio aumenta significativamente la solubilidad del clorhidrato de minociclina, particularmente para etanol en solitario (véanse los puntos de datos a una concentración de etanol al 100 %) y para composiciones con altas concentraciones de etanol en mezclas de etanol y propilenglicol. Además, la concentración máxima para las mezclas de etanol y propilenglicol cambia de aproximadamente el 25 % de etanol a aproximadamente el 75 % de etanol en presencia de la sal de magnesio.

EJEMPLO 2

MEDICIONES DSC

Este experimento se realizó para evaluar si había una diferencia en el punto de fusión para una mezcla de clorhidrato de minociclina, cloruro de magnesio, etanol y propilenglicol con respecto a los puntos de fusión individuales de clorhidrato de minociclina y cloruro de magnesio.

Se preparó una mezcla de prueba de clorhidrato de minociclina (Euticals S.P.A, Origgio, Italia) con cloruro de

magnesio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) en una relación 1:1 (p/p) mezclando en un mezclador de vórtice (VORTEX GENIE, Scientific Industries, Inc. Bohemia, NY) a aproximadamente 3000 rpm hasta obtener una mezcla uniforme o durante al menos 3 minutos. La mezcla seca se colocó en un mortero cerámico y se agitó manualmente con una espátula de acero inoxidable mientras una solución que consistía en etanol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA) y propilenglicol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA) en una relación de 3:1 (p/p) se añadió gota a gota para humedecer uniformemente la mezcla. A continuación, la muestra húmeda se mezcló suavemente para proporcionar un secado constante en condiciones ambientales.

El análisis térmico se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un Q2000 DSC (TA instruments, New Castle, DE) calibrado con indio. Se realizaron mediciones de DSC para clorhidrato de minociclina, cloruro de magnesio, y la mezcla de prueba seca. Se pesaron y se analizaron muestras de 2-7 mg en bandejas de aluminio selladas en el intervalo de 25 °C a 250 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min usando gas de purga de nitrógeno.

La comparación de los puntos de fusión de la mezcla de ensayo seca con los puntos de fusión del clorhidrato de minociclina y el cloruro de magnesio indicó una depresión prominente del punto de fusión, lo que es indicativo de la formación de una mezcla eutéctica.

En resumen, los Solicitantes han descubierto que las composiciones que comprenden un fármaco de la clase de las tetraciclinas, una fuente de magnesio, un alcohol alifático monohídrico y un poliol forman un eutéctico. Este eutéctico se demostró evaporando el disolvente de la composición para formar un depósito metaestable para evaluación con calorimetría diferencial de barrido (DSC) y comparando los resultados con los resultados de DSC para los componentes secos para determinar si se logró una reducción en el punto de fusión.

EJEMPLO 3

ESTABILIDAD DE LA MINOCICLINA Y LA MINOCICLINA ESTABILIZADA CON MAGNESIO

Se evaluó el efecto de las contribuciones de los componentes a la estabilidad de la potencia del fármaco y la formación de epímeros para mezclas ilustrativas de clorhidrato de minociclina, cloruro de magnesio, etanol y propilenglicol usando las composiciones descritas en el Ejemplo 1.

La degradación y estabilidad de la minociclina en las composiciones se midieron el Día 1 y el Día 6 después del almacenamiento en la oscuridad en condiciones de temperatura ambiente dentro de viales de vidrio sellados.

En la Tabla 2, la formación de 4-epi-minociclina se extrapoló a un periodo de 18 meses. El cálculo de extrapolación asumió que los mecanismos de degradación continúan al mismo ritmo matemático que para los días 1-6. Esto representa un valor de caso más desfavorable y no tiene en cuenta el hecho de que la 4-epi-minociclina puede alcanzar el equilibrio con la minociclina en la composición, de modo que los niveles extremadamente altos de 4-epi-minociclina, tal como el 99,76 % y el 100 %, pueden no representar una realidad física. En estos casos, estos valores simplemente indican que la reacción de epimerización continuará hasta que se alcance el equilibrio.

Las figuras 2a y 2b son gráficos de la concentración relativa de minociclina activa en función de la concentración de etanol en peso para composiciones con cineol al 1 %. Las figuras 2c y 2d son gráficos de la concentración relativa de minociclina activa en función de la concentración de etanol en peso para composiciones sin cineol.

Tabla 2. CONCENTRACIONES RELATIVAS DE 4-EPI-MINOCICLINA

MUESTRA DE DESIGNACIÓN (VÉASE EL EJEMPLO 1)	DÍA 1	DÍA 6	CAMBIO DE CONCENTRACIÓN DEL DÍA 1 AL DÍA 6 (DIFERENCIA EN CONCENTRACIONES)	CONCENTRACIÓN EXTRAPOLADA A 18 MESES
100-MNC	6,63 %	11,59 %	4,96 %	99,76 %
90-MNC	5,86 %	13,25 %	7,39 %	99,99 %
80-MNC	6,13 %	18,08 %	11,95 %	100,00 %
75-MNC	5,82 %	20,19 %	14,37 %	100,00 %
50-MNC	5,09 %	29,14 %	24,05 %	100,00 %
25-MNC	5,42 %	29,13 %	23,71 %	100,00 %
0-MNC	5,19 %	29,25 %	24,06 %	100,00 %
100-Mg	0,97 %	0,87 %	-0,10 %	0,00 %

(continuación)

MUESTRA DE DESIGNACIÓN (VÉASE EL EJEMPLO 1)	DÍA 1	DÍA 6	CAMBIO DE CONCENTRACIÓN DEL DÍA 1 AL DÍA 6 (DIFERENCIA EN CONCENTRACIONES)	CONCENTRACIÓN EXTRAPOLADA A 18 MESES
90-Mg	0,89 %	0,91 %	0,02 %	3,05 %
80-Mg	0,90 %	0,93 %	0,03 %	4,36 %
75-Mg	0,90 %	0,95 %	0,05 %	6,68 %
50-Mg	0,91 %	1,03 %	0,11 %	12,71 %
25-Mg	0,87 %	1,01 %	0,14 %	15,23 %
0-Mg	0,84 %	0,96 %	0,12 %	13,21 %
100-MNC-0C	7,49 %	11,16 %	3,67 %	98,90 %
90-MNC-0C	6,87 %	13,71 %	6,84 %	99,98 %
80-MNC-0C	7,43 %	17,95 %	10,52 %	100,00 %
75-MNC-0C	7,57 %	21,40 %	13,83 %	100,00 %
70-MNC-0C	7,01 %	26,89 %	19,88 %	100,00 %
60-MNC-0C	7,36 %	26,56 %	19,20 %	100,00 %
50-MNC-0C	6,70 %	28,46 %	21,76 %	100,00 %
25-MNC-0C	7,13 %	29,36 %	22,23 %	100,00 %
0-MNC-0C	6,96 %	28,86 %	21,90 %	100,00 %
100-Mg-0C	0,93 %	1,05 %	0,12 %	13,07 %
90-Mg-0C	0,93 %	1,15 %	0,22 %	22,69 %
80-Mg-0C	0,81 %	1,09 %	0,28 %	27,05 %
75-Mg-0C	0,81 %	1,09 %	0,27 %	26,59 %
70-Mg-0C	0,79 %	1,04 %	0,26 %	25,27 %
60-Mg-0C	0,73 %	0,95 %	0,23 %	22,60 %
50-Mg-0C	0,89 %	1,05 %	0,16 %	16,81 %
25-Mg-0C	0,81 %	1,11 %	0,29 %	28,40 %
0-Mg-0C	0,80 %	1,08 %	0,28 %	27,18 %

La Tabla 3 presenta la concentración de minociclina para cada formulación normalizada por todas las áreas pico después de 1 y 6 días de almacenamiento a temperatura ambiente. El cálculo de extrapolación asumió que los mecanismos de degradación continúan al mismo ritmo matemático que para los días 1-6.

5

Tabla 3. CONCENTRACIONES RELATIVAS DE MINOCICLINA ACTIVA

MUESTRA DE DESIGNACIÓN (VÉASE EL EJEMPLO 1)	DÍA 1	DÍA 6	CAMBIO DE CONCENTRACIÓN (DIFERENCIA EN LAS CONCENTRACIONES)	CONCENTRACIÓN EXTRAPOLADA A 18 MESES	CAMBIO EXTRAPOLADO EN 18 MESES (% DE CONCENTRACIÓN RELATIVA DE MINOCICLINA EL DÍA 1)
100-MNC	92,59 %	86,13 %	-6,47 %	0,03 %	-99,96 %
90-MNC	93,57 %	85,14 %	-8,44 %	0,00 %	-100,00 %

(continuación)

MUESTRA DE DESIGNACIÓN (VÉASE EL EJEMPLO 1)	DÍA 1	DÍA 6	CAMBIO DE CONCENTRACIÓN (DIFERENCIA EN LAS CONCENTRACIONES)	CONCENTRACIÓN EXTRAPOLADA A 18 MESES	CAMBIO EXTRAPOLADO EN 18 MESES (% DE CONCENTRACIÓN RELATIVA DE MINOCICLINA EL DÍA 1)
80-MNC	93,53 %	80,79 %	-12,74 %	0,00 %	-100,00 %
75-MNC	93,99 %	78,87 %	-15,12 %	0,00 %	-100,00 %
50-MNC	94,57 %	70,44 %	-24,13 %	0,00 %	-100,00 %
25-MNC	94,21 %	70,49 %	-23,72 %	0,00 %	-100,00 %
0-MNC	94,45 %	70,40 %	-24,05 %	0,00 %	-100,00 %
100-Mg	98,58 %	98,48 %	-0,11 %	87,58 %	-11,16 %
90-Mg	98,53 %	98,48 %	-0,05 %	92,95 %	-5,66 %
80-Mg	98,49 %	98,48 %	-0,01 %	97,38 %	-1,13 %
75-Mg	98,43 %	98,26 %	-0,17 %	81,91 %	-16,78 %
50-Mg	98,55 %	98,41 %	-0,13 %	85,20 %	-13,55 %
25-Mg	98,57 %	97,69 %	-0,88 %	37,03 %	-62,44 %
0-Mg	98,49 %	97,45 %	-1,05 %	30,55 %	-68,98 %
100-MNC-0C	90,34 %	87,69 %	-2,65 %	3,48 %	-96,14 %
90-MNC-0C	91,67 %	85,49 %	-6,18 %	0,04 %	-99,95 %
80-MNC-0C	91,94 %	81,52 %	-10,42 %	0,00 %	-100,00 %
75-MNC-0C	91,74 %	78,07 %	-13,67 %	0,00 %	-100,00 %
70-MNC-0C	92,44 %	72,63 %	-19,80 %	0,00 %	-100,00 %
60-MNC-0C	92,13 %	72,96 %	-19,17 %	0,00 %	-100,00 %
50-MNC-0C	93,04 %	71,16 %	-21,88 %	0,00 %	-100,00 %
25-MNC-0C	92,50 %	70,25 %	-22,26 %	0,00 %	-100,00 %
0-MNC-0C	92,62 %	70,66 %	-21,96 %	0,00 %	-100,00 %
100-Mg-0C	98,58 %	98,43 %	-0,15 %	83,39 %	-15,41 %
90-Mg-0C	98,54 %	98,35 %	-0,19 %	79,73 %	-19,09 %
80-Mg-0C	98,55 %	98,27 %	-0,28 %	72,11 %	-26,83 %
75-Mg-0C	98,55 %	98,26 %	-0,30 %	70,90 %	-28,06 %
70-Mg-0C	98,56 %	98,27 %	-0,29 %	71,44 %	-27,51 %
60-Mg-0C	98,08 %	97,65 %	-0,43 %	60,55 %	-38,26 %
50-Mg-0C	98,47 %	98,05 %	-0,42 %	61,33 %	-37,72 %
25-Mg-0C	98,49 %	97,75 %	-0,74 %	42,95 %	-56,39 %
0-Mg-0C	98,37 %	97,11 %	-1,25 %	24,11 %	-75,49 %

El propilenglicol es higroscópico, lo que normalmente contribuye a la inestabilidad de los fármacos de la clase de las tetraciclinas en composiciones con cantidades significativas de propilenglicol. Sin embargo, como se muestra en este ejemplo, se demuestra que las composiciones con cantidades moderadas de propilenglicol (u otros polioles higroscópicos similares) son estables, particularmente en presencia de una sal de magnesio.

EJEMPLO 4

PENETRACIÓN EN PIEL HUMANA *EX VIVO*

Se realizaron experimentos de penetración con tejido de piel *ex vivo* para determinar si el fármaco activo de la clase de las tetraciclinas penetra en la piel en concentraciones suficientes para lograr un efecto terapéutico deseado cuando se incluye en composiciones que comprenden una fuente de magnesio, un alcohol alifático monohídrico y un poliol y se aplica a la superficie de la piel. Se evaluó la penetración en la piel abdominal de cuatro donantes humanos diferentes. Las composiciones de prueba incluían mezclas que consistían en clorhidrato de minociclina, cloruro de magnesio, etanol, y propilenglicol.

Se prepararon mezclas de disolventes de etanol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), propilenglicol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), y 1,8-cineol (Penta International Company, Livingston, NJ) en las proporciones descritas en la Tabla 4. A cada mezcla de disolventes se le añadió el equivalente del 0,5 % (p/p) de clorhidrato de minociclina (Euticals S.P.A, Origgio, Italia) y el 0,5 % (p/p) de cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO).

Tabla 4. MEZCLAS DE DISOLVENTES PARA EL EXPERIMENTO DE PENETRACIÓN CUTÁNEA

NÚMERO DE MUESTRA	ETANOL (% P/P)	PROPILENGLICOL (% P/P)	1-8-CINEOL (% P/P)
SP-0	0	99	1
SP-25	24,5	74,5	1
SP-50	49,5	49,5	1
SP-75	74,5	24,5	1
SP-80	79,5	19,5	1
SP-90	89,5	9,5	1
SP-100	99	0	1

Las muestras SP-0, SP-25 y SP-100 son muestras de referencia.

Las composiciones se aplicaron a muestras de piel de cuatro donantes humanos a una dosis de 12 mg/cm². El tejido se mantuvo en un ambiente húmedo para limitar el secado del tejido y se incubó a 32 °C durante 3-4 horas. Al final del periodo de incubación, se limpió el exceso de composición de la superficie usando primero un apósito seco, en segundo lugar un apósito empapado con alcohol isopropílico al 70 % y finalmente con un apósito seco. Se realizó una retirada con cinta para eliminar las capas superiores del estrato córneo. Se tomó una biopsia por punción de seis (6) milímetros del interior del área de prueba. La minociclina se extrajo de cada biopsia usando metanol acidificado. Los sobrenadantes se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento por el mismo método descrito en el Ejemplo 1.

Los valores promedio de las cuatro muestras de donantes para cada concentración se presentan en la figura 3. Los resultados demuestran que la eficacia de penetración aumenta a medida que el propilenglicol se reemplaza por etanol; también se demuestra una buena eficacia de penetración en la piel.

EJEMPLO 5

MEDICIONES DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (MIC) - *P. ACNES*

La actividad antimicrobiana de la minociclina se evaluó midiendo la concentración inhibitoria mínima (MIC). La MIC también se evaluó para varios otros materiales y combinaciones y los valores de MIC relativos se calcularon como múltiplos del valor de MIC de minociclina. La MIC se midió utilizando el método de microdilución en caldo como se describe por el Clinical and Laboratory Standards Institute y representa la concentración más baja de un material de prueba que inhibe completamente el crecimiento visible de las bacterias en el medio de crecimiento.

El material de prueba se disolvió en agua, se diluyó mediante titulaciones seriadas de dos veces para un total de 11 concentraciones. Se preparó una placa de 96 pocillos añadiendo 196 µl de medio de caldo sembrado con una cepa de la bacteria *P. acnes* ATCC 6919. Se añadió una alícuota de 4 µl de una dilución de sustancia de prueba a cada pocillo para llevar el volumen total de cada pocillo a 200 µl. Las concentraciones de la sustancia de prueba analizadas variaron de 0,0078 a 16 µg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante 2 días en condiciones anaerobias. Las placas de 96 pocillos se leyeron mediante un lector de microplacas TECAN INFINITE F50 ELISA (Männedorf, Suiza) en modo de absorbancia con una longitud de onda de 620 nm. Cada pocillo se evaluó para determinar si se produjo o se inhibió el crecimiento. La concentración más baja para la que se inhibió el crecimiento se registró como la MIC. Cada sustancia de prueba se evaluó por duplicado. El experimento también incluyó controles: vehículo de control (agua), control sin tratar (solo medio), y un control positivo (agente de referencia

activo, tetraciclina).

Se midieron los valores de MIC para tres sustancias de prueba: 1) Minociclina (Euticals S.P.A, Origgio, Italia), 2) cloruro de magnesio anhidro (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, número de pieza M8266), y 3) una mezcla de minociclina y cloruro de magnesio anhidro en una relación de 1:1,5 (p/p).

Los resultados mostraron que la minociclina mezclada con cloruro de magnesio tenía un valor de MIC de 0,5 microgramos por mililitro. La minociclina en solitario tenía un valor de MIC de 0,125 microgramos por mililitro. El cloruro de magnesio en solitario no inhibió el crecimiento en ninguna de las concentraciones probadas.

Por lo tanto, los resultados indican que el cloruro de magnesio interactúa con la minociclina para aumentar la MIC de la minociclina. Las mediciones adicionales de HPLC muestran que esta reducción no se debe a una degradación de la minociclina activa a través de la epimerización. En cambio, el magnesio parece interactuar fuertemente con la minociclina.

EJEMPLO 6

DEMOSTRACIÓN MALDI-TOF DE LA UBICACIÓN PREFERENCIAL DE MINOCICLINA EN TEJIDO OLEOSO Y PENETRACIÓN EN TEJIDO DÉRMICO

Las composiciones farmacológicas tópicas deben penetrar en el tejido o material deseado para tener el efecto deseado. Para enfermedades dermatológicas, tales como acné, se requiere la penetración en la piel, los sebocitos y/o el sebo. En el mejor de los casos, la concentración del fármaco tópico es mayor en lugares seleccionados en comparación con áreas que son menos importantes desde una perspectiva farmacológica, lo que potencialmente aumenta la eficacia y reduce los efectos secundarios de una dosis determinada.

Se aplicó una composición de minociclina tópica a la superficie de la piel facial humana *ex vivo* y se obtuvieron imágenes de una sección transversal vertical de la piel utilizando espectrometría de masas por tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF). Los datos muestran que la minociclina no solo penetra en el tejido cutáneo, sino que se encuentran concentraciones mayores en las glándulas sebáceas y en las regiones ricas en sebo.

La espectrometría de masas MALDI-TOF es un método que comprende la ablación controlada de tejido que ha sido recubierto en un material de matriz con un láser ultravioleta. Esto desencadena la ablación y desorción de la muestra. Las partículas ionizadas resultantes se expulsan a un espectrómetro de masas en fase gaseosa para medir la firma espectral de masas del material sometido a ablación. La etapa de ablación utiliza un láser de nitrógeno con una longitud de onda de 377 nm, que se absorbe muy fuertemente mediante la matriz química aplicada a una muestra de tejido cutáneo. El láser tiene un pulso de alta intensidad y corta duración (~1 milisegundo) que conduce a la ablación de la capa de matriz de superficie en cada ubicación de energía láser enfocada (direcciones x-y). La muestra de tejido de la piel se puede mover con precisión utilizando una etapa de traslación x-y controlada. Por lo tanto, se puede crear una "imagen" bidimensional precisa de la muestra de tejido cutáneo.

El uso de espectrometría de masas por tiempo de vuelo permite una identificación precisa de la presencia de materiales seleccionados en cada ubicación bidimensional dentro de la muestra de tejido cutáneo. Por ejemplo, la minociclina tiene una relación de masa molecular-carga (es decir, "m/z") de aproximadamente 458,4 y un componente de sebo que tiene un valor m/z de aproximadamente 494,36. Dentro de la piel, la fosfatidilcolina, que tiene un valor m/z de 756,1, se encuentra principalmente dentro de las glándulas sebáceas. Por lo tanto, estos valores m/z pueden usarse para identificar regiones ricas en sebo y ubicaciones de glándulas sebáceas en la piel con espectrometría de masas MALDI-TOF. Estas pueden usarse para evaluar si las ubicaciones de altas concentraciones de minociclina están correlacionadas con regiones ricas en sebo y/o glándulas sebáceas. De esta manera, se pueden determinar las concentraciones relativas de minociclina en regiones ricas en sebo y/o glándulas sebáceas.

Se colocaron secciones frescas de piel facial humana en una incubadora a 32 °C durante 30 minutos sobre un trozo de gasa humedecido con una solución salina (solución de cloruro de sodio al 0,9 %). Una de las composiciones de prueba se aplicó a la superficie de la piel con una masa controlada de composición por unidad de área. Las muestras de tejido se incubaron durante 24 horas a 32 °C en un ambiente húmedo. Al final del período de incubación, se limpió el exceso de composición de la superficie usando primero un apósito seco, en segundo lugar un apósito empapado con alcohol isopropílico al 70 % y finalmente con un apósito seco. Se tomaron dos biopsias por punción de seis (6) milímetros del interior del área de prueba. Se tomaron dos biopsias adicionales por punción de seis (6) milímetros del exterior del área de prueba para que sirvieran como controles. Las biopsias por punción se envolvieron en papel de aluminio y se congelaron con nitrógeno líquido hasta que estuvieron listas para el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF.

Justo antes del análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF, el tejido congelado se cortó en cortes verticales de 12 micrómetros (µm) usando un criostato. Se tomaron secciones seriadas para poder realizar comparaciones entre

imágenes del análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF y tejido teñido con hematoxilina y eosina (H&E). Para las secciones a analizar con espectrometría de masas MALDI-TOF, se aplicó una solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) al tejido utilizando un aerógrafo de acetonitrilo (ACN) al 50 %. El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF (Protea Biosciences, Inc., Morgantown, WV) se realizó en el tejido resultante con espectrometría de masas realizada por un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo (ultrafleXtreme, Bruker Daltonics, Inc., Billerica, MA) en modo de iones positivos de reflexión.

Se evaluaron dos composiciones diferentes. La primera composición contenía el 67,77 % (p/p) de etanol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 18,59 % (p/p) de propilenglicol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 9,83 % (p/p) 1,8-cineol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 1,03 % (p/p) de hidroxipropilcelulosa (Ashland, Inc., Covington, KY), el 1,34 % (p/p) de sílice modificada con ODS (elaborada de acuerdo con el método descrito en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 14/532.987), el 0,99 % (p/p) de base de minociclina (Hovione Inter Ltd., Loures, Portugal), y el 0,45 % (p/p) de cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO).

La segunda composición contenía el 68,03 % (p/p) de etanol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 20,15 % (p/p) de propilenglicol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 10 % (p/p) 1,8-cineol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 1,39 % (p/p) de hidroxipropilmetilcelulosa (Dow Chemicals, Pittsburg, CA), el 0,30 % (p/p) de base de minociclina (Hovione Inter Ltd., Loures, Portugal), y el 0,13 % (p/p) de cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO).

Las figuras 4a y 5a muestran secciones de piel teñidas con H&E del tejido de control (es decir, muestra de piel a la que no se aplicó la composición de prueba) y el primer tejido "tratado" (es decir, muestra de piel a la que se aplicó *ex vivo* la primera composición de prueba). Tanto el tejido de control como el primer tejido tratado eran del mismo donante humano. Las figuras 4b, 4c, 5b y 5c muestran imágenes construidas a partir de los datos recopilados durante el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF. Las figuras 4b y 4c muestran imágenes del tejido de control. Las figuras 5b y 5c muestran imágenes del primer tejido tratado. Las figuras 4b y 5b muestran imágenes construidas a partir de datos de espectrometría de masas MALDI-TOF correspondientes a un valor *m/z* de 458,5, que está asociado con minociclina. En estas imágenes, los tonos más claros corresponden a concentraciones de minociclina más altas. Las figuras 4c y 5c muestran imágenes construidas a partir de datos de espectrometría de masas MALDI-TOF correspondientes a un valor *m/z* de 494,36, que está asociado con un componente del sebo. En estas imágenes, los tonos más claros corresponden a concentraciones de sebo más altas. Basándose en una comparación de las figuras 5a, 5b y 5c, se demostró que la minociclina penetraba en la piel, con concentraciones más pesadas de minociclina localizadas tanto en la epidermis como en las regiones ricas en sebo de la piel, mientras que no se detectó minociclina en el tejido de control.

El segundo experimento similar (no controlado) confirmó la asociación entre concentraciones más altas de minociclina y las glándulas sebáceas usando espectrometría de masas MALDI-TOF para detectar minociclina a un valor *m/z* de 458,3 y fosfatidilcolina a un valor *m/z* de 756,1.

Por lo tanto, los resultados muestran que las ubicaciones de alta concentración de lípido sebáceo y/o fosfatidilcolina están fuertemente correlacionadas con ubicaciones de alta concentración de minociclina. Por lo tanto, el experimento muestra que la minociclina penetra en la muestra de tejido cutáneo y que la minociclina se divide fuertemente en regiones ricas en sebo y glándulas sebáceas de la piel. Las muestras de control sin la composición de prueba aplicada no muestran minociclina detectable.

EJEMPLO 7

PENETRACIÓN DE MINOCICLINA Y MINOCICLINA ESTABILIZADA CON MAGNESIO Y REPARTO EN LAS PORCIONES DE LA PIEL RICAS EN LÍPIDOS

Puede usarse microscopía de fluorescencia de secciones histológicas para demostrar la ubicación de muchos fármacos de la clase de las tetraciclinas dentro de las capas de la piel y las estructuras tisulares. Diferentes afecciones o enfermedades dermatológicas pueden beneficiarse del direccionamiento preferencial del fármaco a diferentes lugares dentro de la piel. Por ejemplo, el tratamiento del acné puede mejorarse de forma beneficiosa si se administra un fármaco de la clase de las tetraciclinas a la glándula sebácea. Por otro lado, el tratamiento de la psoriasis puede mejorarse de forma beneficiosa si el fármaco de la clase de las tetraciclinas se administra a la dermis.

Se realizaron dos experimentos para identificar la localización de las composiciones dentro de la piel. Se prepararon dos composiciones. La primera composición contenía el 64,89 % (p/p) de etanol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 17,8 % (p/p) de propilenglicol (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 9,41 % (p/p) de 1,8-cineol (Penta International Company, Livingston, NJ), el 0,99 % de hidroxipropilcelulosa (Ashland, Inc., Covington, KY), el 4,2 % (p/p) de sílice modificada con ODS (preparada de acuerdo con el método descrito en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 14/532.987), el 0,1 % (p/p) de metabisulfato de sodio (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), el 1,0 % (p/p) de clorhidrato de minociclina (RIA International, East Hanover, NJ) (aproximadamente el 0,86 % (p/p) de equivalente de base libre de minociclina), y el 1,61 % (p/p) de cloruro de magnesio (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). La segunda composición contenía el 61,97 % (p/p) de etanol, el 17 % (p/p) de propilenglicol, el 8,99 % (p/p) de 1,8-

cineol, el 0,94 % (p/p) de hidroxipropilcelulosa, el 4,0 % (p/p) sílice modificada con ODS, y el 0,18 % (p/p) de metabisulfato de sodio, el 3,84 % (p/p) de clorhidrato de minociclina (aproximadamente el 3,3 % (p/p) de equivalente de base libre de minociclina), y el 3,08 % (p/p) de cloruro de magnesio.

- 5 Se aplicaron aproximadamente 50 mg/cm² de cada una de estas composiciones a muestras de tejido humano *ex vivo* y se incubaron durante 24 horas. A continuación, la composición se limpió de la piel, se incluyó en un compuesto de temperatura de corte óptima (OCT), se congeló y se cortó usando un criostato en secciones transversales histológicas de aproximadamente 15 micrómetros (µm) de espesor. Las secciones histológicas se examinaron mediante microscopía de fluorescencia. El intervalo de longitud de onda de excitación fue de 340-480 nm y el intervalo de longitud de onda de emisión fue de 620-700 nm.

La primera composición se aplicó a la superficie superior de la piel (es decir, el estrato córneo) del tejido iluminado en la figura 6. Muestra que la minociclina penetró en el estrato córneo, la epidermis viable, la unión epidérmica dérmica, la dermis, el folículo piloso y la glándula sebácea. Las áreas más brillantes (de color rosa) de la micrografía indican la fluorescencia de la minociclina. La minociclina se concentró en la epidermis superior y la glándula sebácea. Esta administración dirigida de minociclina a la glándula sebácea muestra que la composición es ventajosa para el tratamiento del acné.

Un segundo experimento evaluó cómo la concentración de minociclina dentro de la composición afectaba a la absorción de minociclina. La primera y segunda composiciones se aplicaron a muestras de piel y se incubaron y se prepararon como en el primer experimento. A continuación se compararon con una muestra de tejido cutáneo sin tratar del mismo donante. Las micrografías fluorescentes se presentan en las figuras 7a-c. La figura 7a muestra la sección histológica sin tratar, las figuras 7b y 7c muestran las secciones histológicas de la piel tratada con la primera y segunda composiciones, respectivamente. El aumento de la concentración de minociclina muestra un aumento dependiente de la dosis de minociclina dentro de la piel y en las glándulas sebáceas.

Los resultados de estos dos experimentos demuestran que, además de administrar un fármaco de la clase de las tetraciclinas en todas las capas de la piel, el fármaco de la clase de las tetraciclinas se administra preferentemente tanto a la glándula sebácea como al estrato córneo. Ambas estructuras son ricas en lípidos, lo que indica una administración preferencial del fármaco de la clase de las tetraciclinas a los tejidos ricos en lípidos, tanto en la piel como dentro de ella. Dado que el fármaco de la clase de las tetraciclinas se administra preferentemente a la glándula sebácea y se sabe que la minociclina es beneficiosa para el tratamiento del acné (cuando se toma por vía oral), estos resultados demuestran la utilidad de las presentes composiciones para el tratamiento del acné.

EJEMPLO 8

ESTUDIO *IN VIVO* DE DOSIS REPETIDAS EN RATAS DE LA IRRITACIÓN Y TINCIÓN DE LA PIEL

Las mezclas de un alcohol alifático monohídrico, tal como etanol, y un poliol, tal como propilenglicol, pueden ser potencialmente irritantes cuando se aplican a la piel a concentraciones elevadas, tal como en composiciones que comprenden el 50-99,9 % (p/p) de estos dos materiales, composiciones que comprenden el 70-99 % (p/p) de estos dos materiales, o composiciones que comprenden el 90-99 % (p/p) de estos dos materiales. Este ejemplo evaluó si tal irritación es resultado de composiciones tales como las que se proporcionan en el presente documento, incluyendo un fármaco de la clase de las tetraciclinas y una fuente de magnesio.

Se evaluaron tanto la absorción cutánea como los niveles en plasma sanguíneo de clorhidrato de minociclina después de un tratamiento de 14 días con una formulación de placebo o con una de cuatro formulaciones que contenían aproximadamente el 0,5 %, 1 %, 2 %, o el 4 % en peso de minociclina como se describe en la Tabla 5 a continuación. Las composiciones se prepararon en las proporciones descritas en la Tabla 5.

Tabla 5. COMPOSICIONES USADAS (TODOS LOS PORCENTAJES SE ENUMERAN EN PESO (ES DECIR, (P/P))

NÚMERO DE LA COMPOSICIÓN	0-B	0.5-B	1-B	2-B	4-B
Clorhidrato de minociclina	0 %	0,6 %	1,2 %	2,3 %	4,6 %
Hidroxipropilcelulosa	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %
Cloruro de magnesio (anhidro)	0 %	0,6 %	1,2 %	2,3 %	4,6 %
Etanol (anhidro)	78,2 %	77,0 %	75,8 %	68,6 %	59,0 %
Propilenglicol	20,0 %	20,0 %	20,0 %	25,0 %	30,0 %
1,8-Cineol	1,0 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %
Metabisulfato de sodio	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %

La composición 0-B es una composición de referencia.

Se evaluó y se puntuó la irritación en diez ratas macho Sprague-Dawley. Se afeitaron parches de piel en la parte anterior o posterior de cada rata (dos áreas de 4 cm²) al comienzo del experimento y las ratas se dividieron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento (cada uno de las cuales recibió la aplicación de una de las formulaciones enumeradas en la Tabla 5 (0-B, 0.5-B, 1-B, 2-B o 4-B, correspondientes a placebo y aproximadamente el 0,5 %, aproximadamente el 1,0 %, aproximadamente el 2,0 % y aproximadamente el 4,0 % de base equivalente de minociclina, respectivamente), aplicadas a una dosis de 10 mg o 20 mg por área de prueba. Cada composición se aplicó diariamente a cada uno de los dos parches afeitados en un par de ratas, para un total de 4 sitios de prueba por composición. Las ratas recibieron 10 mg o 20 mg de una composición en cada área de 4 cm² (es decir, 2,5 mg/cm² o 5 mg/cm²) durante un periodo de 14 días. Después de cada tratamiento de 24 horas, el lugar de aplicación se limpió con una solución de jabón al 2 % seguido de apósitos empapados en 1x PBS, y a continuación se secó. Diariamente se tomaron imágenes de luz blanca de los animales, así como imágenes UV. Las observaciones se realizaron hasta 72 horas y más. La aplicación diaria de cada una de las composiciones (0,5 %, 1 %, 2 % y 4 % de equivalente de base libre de minociclina) en cantidades de hasta 20 mg por 4 cm² de área no produjo ningún eritema, enrojecimiento, irritación y/o edema significativos. No se observaron cambios de peso anormales en ningún grupo de tratamiento; tampoco se detectó minociclina en la sangre. Por lo tanto, los estudios *in vivo* en ratas para determinar la irritación de la piel no mostraron eritema o edema significativos en o más allá del sitio de tratamiento.

Además, no se observó tinción de la piel en ninguna de las ratas al final del estudio de aplicación repetida de 14 días y no se apreció fluorescencia residual después de aclarar la composición de la piel al final del experimento. Esto indica que la composición no tiñe, a pesar de las concentraciones relativamente altas de minociclina aplicada (hasta 5 mg/cm² de composición).

Finalmente, se determinó la eficiencia de la absorción cutánea para la serie de formulaciones. La eficacia calculada para los parches de 10 mg por 4 cm² y 20 mg por 4 cm² fue muy similar (eficacia de ~5-8,5 %) para las formulaciones de minociclina al 0,5 %, 2 % y el 4 %. La formulación de minociclina al 1 % mostró una mayor eficacia en ambas cantidades de tratamiento, de aproximadamente el 12,9 % para el parche de 10 mg por 4 cm² y del 19,6 % para el parche de 20 mg por 4 cm². El grupo del parche de 10 mg por 4 cm² para la formulación al 1 % satisface fácilmente el requisito de penetración para lograr una concentración local en la piel indicativa de una dosis terapéutica. Aproximadamente a 5,3 µg/cm², la absorción de minociclina para la formulación al 1 % y el parche de 10 mg por 4 cm² se traduce en 0,95 µg/g de minociclina en la piel, que es al menos un orden de magnitud por encima de la concentración inhibitoria mínima (MIC) para inhibir *P. acnes*.

EJEMPLO 9

INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MAGNESIO

Como se ha mostrado previamente, el magnesio contribuye a la estabilización de la minociclina dentro de la composición. Este experimento tiene como objetivo determinar el nivel óptimo de magnesio en una composición. La intensidad de la fluorescencia se puede usar para estimar la relación aproximada más allá de la cual la adición de más magnesio no mejora significativamente la estabilidad y/o la solubilidad. Se realizó un estudio de intensidad de fluorescencia para evaluar la concentración de magnesio a la que la tasa de aumento de la fluorescencia después de la adición de más magnesio descendió de forma significativa y/o abrupta.

Una solución base del 77,59 % (p/p) de etanol anhidro, el 21,2 % (p/p) de propilenglicol, el 0,76 % (p/p) de clorhidrato de minociclina (aproximadamente el 0,66 % (p/p) de minociclina FBE), el 0,39 % (p/p) de hidroxipropilcelulosa HF (HPC HF), el 0,06 % (p/p) de metabisulfito de sodio. Se añadió cloruro de magnesio anhidro a 4 ml (3,13 g) de la solución base a una concentración del 4,4 % (p/p) para crear una solución con una molalidad de cloruro de magnesio de 464,3 mmol/kg. La relación molar entre el magnesio y la minociclina fue 30,18. La solución preparada se diluyó en serie 2 veces con la solución base para formar preparaciones de la solución base con cloruro de magnesio en diferentes relaciones molares de magnesio con respecto a minociclina: 0, 0,47, 0,94, 1,89, 3,77, 7,55, 15,09, y 30,18.

Los resultados de las mediciones de fluorescencia y de las mediciones de la concentración de 4-epi-minociclina después de 7 días a 50 °C se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. COMPOSICIONES PARA EL EXPERIMENTO DE FLUORESCENCIA (TODOS LOS PORCENTAJES ESTÁN ENUMERADOS EN PESO (ES DECIR, P/P))

MNC*HCl (%)	MgCl ₂ (%)	RELACIÓN MOLAR [MG]/[MNC]	FLUORESCENCIA	CAMBIO DE LA 4-EPI-MINOCICLINA DURANTE 7 DÍAS A 50 °C
0,76	4,42	30,18	963	0,19
0,76	2,21	15,09	818	0,21
0,76	1,11	7,55	679	0,27
0,76	0,55	3,77	615	0,36
0,76	0,28	1,89	416	0,49
0,76	0,14	0,94	233	0,73
0,76	0,07	0,47	73	1,82
0,76	0,00	0,00	0	26,04
MNC = minociclina				

La composición sin MgCl₂ es una composición de referencia.

La intensidad de fluorescencia de cada una de las composiciones resultantes se midió usando un espectrómetro de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 380 nm. La intensidad de emisión de fluorescencia se evaluó a una longitud de onda de 473 nm. La fluorescencia de las muestras sin cloruro de magnesio fue menor que el límite de detección del aparato de medición. Como se muestra en la figura 8b, la intensidad de fluorescencia aumenta bruscamente a medida que la relación molar entre el magnesio y la minociclina aumenta de 0 a aproximadamente 3,8. Para relaciones molares por encima de aproximadamente 3,8, la tasa de aumento en función de la relación molar es significativamente más baja que la tasa de aumento correspondiente para las relaciones molares por debajo de aproximadamente 3,8. El aumento de la cantidad de cloruro de magnesio por encima de este nivel no sigue aumentando la fluorescencia de la composición de manera tan significativa. Dado que la intensidad de fluorescencia se correlaciona con la rigidez de los fármacos de la clase de las tetraciclinas, tal como minociclina, en un entorno local, los datos indican que la formación del complejo minociclina-magnesio en esta composición se vuelve más rígida a medida que la relación molar aumenta a aproximadamente 3,8 en la mezcla. En otras palabras, la rigidez estructural de la minociclina continúa mejorando significativamente más allá de una relación molar para el magnesio con respecto a minociclina de 1:1 o 2:1 y no alcanza su meseta primaria hasta que la relación molar excede aproximadamente 3,8 para esta composición. Así pues, la relación molar de 3,8:1 puede diferir para otras composiciones construidas de acuerdo con las enseñanzas del presente documento.

La estabilidad de la minociclina se evaluó controlando la formación de epímeros en cada una de las muestras preparadas descritas anteriormente. La cantidad de epímero 4-epi-minociclina se midió mediante análisis de HPLC antes y después de la degradación térmica forzada en una estufa a 50 °C durante 7 días. La relación entre el área pico del epímero y la suma del área pico del epímero y el área pico de la minociclina activa da una indicación de la estabilidad de la minociclina en cada composición. La formación de epímeros se calculó como la diferencia en esta relación para las muestras recogidas antes y después de la degradación térmica forzada. Las relaciones molares más altas de magnesio con respecto a minociclina correspondieron a una menor formación de epímeros. La adición de magnesio por encima de una relación molar de aproximadamente 3,8 reduce la formación de epímeros. Sin embargo, la cantidad en la que se reduce la formación de epímeros disminuye para relaciones molares más altas.

La cantidad de fluorescencia es indicativa de la rigidez del fármaco de la clase de las tetraciclinas. La figura 8a es un gráfico del cambio en la concentración de 4-epi-minociclina después de 7 días de degradación forzada a 50 °C. El cambio en la concentración de 4-epi-minociclina es un indicador de la estabilidad de la minociclina en la composición. La adición de cloruro de magnesio hasta una relación molar de aproximadamente 3,8:1 con minociclina aumenta la rigidez de la minociclina en la composición y, por lo tanto, mejora la estabilidad al reducir la reactividad de la minociclina. La adición de cloruro de magnesio por encima de esta concentración mejora menos la estabilidad. Así pues, una relación molar de aproximadamente 3,8:1 sería una buena concentración alrededor de la cual comenzar una optimización de esta composición particular.

Se ha propuesto que la estequiometría de una relación magnesio-minociclina sea 1:1 o 2:1. Estas relaciones propuestas, sin embargo, pueden no aplicarse cuando el magnesio y la minociclina se encuentran en una mezcla de disolventes no acuosa en la que se forma un eutéctico, tal como en la composición tópica descrita en el presente documento. Las diferencias en la fluorescencia de la minociclina en función de la concentración de magnesio reflejan diferencias en los niveles de energía química y diferencias en las interacciones iónicas. La formación de un complejo entre la minociclina y el magnesio puede limitar las reacciones de epimerización y promover así la estabilidad. Estos

métodos y resultados sugieren que la relación molar óptima entre la minociclina y el ión magnesio excede 2:1 en el presente sistema disolvente. La estequiometría y la relación precisa dependerán de los componentes particulares empleados en una composición.

5 EJEMPLO 10

MEDICIÓN DE LA ESTABILIDAD A 6 MESES

Se ensayó la potencia de múltiples muestras de una composición de ejemplo después de su almacenamiento durante 6 meses a temperatura ambiente. La composición inicial contenida consistía en el 69,36 % (p/p) de etanol, el 17,92 % (p/p) de propilenglicol, el 9,41 % (p/p) de 1,8-cineol, el 1,0 % (p/p) de clorhidrato de minociclina (aproximadamente el 0,86 % (p/p) de equivalente de base libre de minociclina), el 1,61 % (p/p) de cloruro de magnesio, el 0,6 % (p/p) de hidroxipropilcelulosa HF, y el 0,1 % (p/p) de metabisulfato de sodio. La cantidad de minociclina se midió usando cromatografía líquida de alto rendimiento para las muestras iniciales y para las muestras después de 6 meses de almacenamiento en condiciones de temperatura ambiente en viales sellados. Para las muestras iniciales, el pico de minociclina contenía aproximadamente el 100,0 % de la minociclina en la composición y la minociclina representaba aproximadamente el 97,3 % cuando se normalizó por todas las áreas pico. El pico de 4-epi-minociclina para las muestras iniciales fue de aproximadamente el 0,54 % cuando se normalizó por todas las áreas pico. Cabe apreciar que los porcentajes pico de minociclina y 4-epi-minociclina suman hasta más del 100 % debido a pequeños errores en las curvas de calibración. Después de 6 meses de almacenamiento, el pico de minociclina activa representó el 97,1 % de la minociclina en la composición y la minociclina representó aproximadamente el 95,0 % cuando se normalizó por todas las áreas pico. Por lo tanto, estas mediciones indicaron que después de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente, la minociclina activa se redujo en aproximadamente un 2,9 % de la minociclina en la composición y aproximadamente un 2,3 % cuando se normalizó por todas las áreas pico. El pico de 4-epi-minociclina para las muestras después de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente fue de aproximadamente el 1,68 % cuando se normalizó por todas las áreas pico, lo que representa un aumento en el pico de 4-epi-minociclina de aproximadamente el 1,1 % después de 6 meses de almacenamiento a temperatura ambiente.

30 EJEMPLO 11

COMPOSICIONES TÓPICAS

La Tabla 7 proporciona composiciones tópicas ilustrativas adicionales. Las composiciones se preparan mezclando los diversos componentes como se ha descrito previamente. Como se ha mencionado anteriormente, estas composiciones de ejemplo de ninguna manera pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Cada columna enumera el porcentaje en peso del componente enumerado en el lado izquierdo de cada fila en la composición. Cada columna se suma a un total del 100 %.

40 La composición 33 es una composición de referencia.

Tabla 7. COMPOSICIONES DE EJEMPLO

COMPOSICIÓN DE EJEMPLO N.º	1	2	3	4	5	6	7	3	9	10
Fármaco de la clase de las tetraciclinas										
Clorhidrato de minociclina	0,3	0,6	1,2	2,3	4,6	1,2	1,2	4,6	4,6	4,6
Fuente de magnesio										
Cloruro de magnesio anhidro	0,3	0,6	1,2	2,3	4,6	1,2	1,2	4,6	4,6	4,6
Alcohol alifático monohídrico										
Etanol	78,6	78,0	76,8	69,6	60,0	75,8	76,0	60,3	60,4	55,4
Poliol										
Propilenglicol	20	20	20	25	30	20	20	30	30	30
Otros componentes										
Metabisulfato de sodio	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	0,2	0,2	0,2
Hidroxipropilcelulosa HF (HPC HF)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	-	0,2	0,2
Cineol	-	--	--	--	--	1	1	--	--	5

(continuación)

COMPOSICIÓN DE EJEMPLO N.º	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Fármaco de la clase de las tetraciclinas										
Clorhidrato de minociclina	--	-	-	--	--	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Base de minociclina	1,2	--	--	--	--	-	--	--	--	--
Clorhidrato de tetraciclina	-	1,2	-	--	--	--	--	--	--	-
Doxiciclina	--	--	1,2	--		--	--	--	-	--
Tipeciclina	--	-	-	1,2	----	--	--	--	--	--
Limeciclina	--	--	--	--	1,2	-	--	--	--	--
Fuente de magnesio										
Cloruro de magnesio anhidro	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	--	--	--	1,2	1,2
Cloruro de magnesio hexahidrato	--	--	--	--	--	2,6	-	-	--	
Acetato de magnesio	--	--	--	--	--	-	1,2	--	-	-
Nitrato de magnesio	--	--	--	--	--	--	-	0,4	--	--
Alcohol alifático monohídrico										
Etanol	76,8	76,8	76,8	76,8	76,8	75,4	76,8	77,6	76,8	76,8
Poliol										
Propilenglicol	20	20	20	20	20	20	20	20	-	-
Dipropilenglicol	--	--	-	-	--	--	--	--	20	-
Glicerol	-	--	--	-	-	--	-	--	--	20
Otros componentes										
Metabisulfito de sodio	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Hidroxipropilcelulosa HF (HPC HF)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
COMPOSICIÓN DE EJEMPLO N.º	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Fármaco de la clase de las tetraciclinas										
Clorhidrato de minociclina	1,2	1,2	0,1	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	1,2
Fuente de magnesio										
Cloruro de magnesio anhidro	1,2	0,5	1,8	0,3	0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	1,2
Alcohol alifático monohídrico										
Etanol	76,8	77,5	77,3	-	--	--	--	--	--	--
Isopropanol	-	--	--	78,6	78,0	--		--	--	-
Alcohol propílico		--	--	--	--	--	-	78,6	78,0	76,8
Alcohol 1-butílico	-	--	-	-	-	78,6	78,0	-	--	-
Poliol										
Propilenglicol	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

(continuación)

COMPOSICIÓN DE EJEMPLO N.º	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Otros componentes										
Metabisulfito de sodio	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Hidroxipropilcelulosa HF (HPC HF) Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	--	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	0,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--
COMPOSICIÓN DE EJEMPLO N.º	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Fármaco de la clase de las tetraciclinas										
Clorhidrato de minociclina	0,1	0,1	0,25	--	0,1	--	--	--	10	5
Base de minociclina	--	--	-	--	--	--	--	0,5	--	--
Clorhidrato de tetraciclina	--	--	0,25	--	--	0,25	--	--	--	--
Doxiciclina	--	0,1	--	0,5	--	--	0,3	0,5		--
Tigeciclina	--	-	--	--	--	0,25	--	--	--	--
Limeciclina	--	-	--	0,5	--	-	--	--	--	--
Fuente de magnesio										
Cloruro de magnesio anhidro	0,5	0,6	--	4	0,9	-	-	4	5	-
Cloruro de magnesio hexahidrato	--	--	--	--	--	1,2	0,2	--	--	15
Acetato de magnesio	--	--	0,2	--	--	--	--	--		--
Sulfato de magnesio	--	--	-	--	--	--	0,1	--	--	-
Alcohol alifático monohídrico										
Etanol	--	88,7	98,5	64,2	78,2	38	46,4	64,8	50	45
Isopropanol	90	--	--	--	-	38,5	--	--	--	--
Alcohol propílico	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Alcohol 1-butílico	--	--	--	--	--	--	46,4	--	-	-
Poliol										
Propilenglicol	-	--	--	30	10	10	--	30	35	--
Dipropilenglicol	8,5	--	--	--	10	-	5	--	--	29,6
Glicerol	--	10	--	--	-	10	--	--	--	--
Otros componentes										
Metabisulfito de sodio	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	--	0,2	--	0,2
Hidroxipropilcelulosa HF (HPC HF)	0,8	--	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	--	--	0,2
Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	--	0,3	--	-	--	--	--	--	--	--
Cineol	--	--	--	--	--	1	1	--	--	5

EJEMPLO 12

5 ABSORCIÓN DE MINOCICLINA EN EL TEJIDO FACIAL HUMANO *EX VIVO* - UN ESTUDIO DE COMPARACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVA

Se realizó un estudio de penetración cutánea para determinar y comparar la absorción de minociclina por el tejido

cutáneo facial humano *ex vivo* en una formulación líquida hidrófila que contenía el 1 % o el 4 % de minociclina (BPX-1M y BPX-4M, respectivamente) con una formulación de base lipófila como se describe en la Publicación de Patente de EE.UU. N.º 2015/0056149. La administración de minociclina se midió usando HPLC para medir cuantitativamente la cantidad de minociclina en la piel en relación con el tiempo, y mediante microscopía de fluorescencia para determinar visualmente la presencia de minociclina en la glándula pilosebácea y la epidermis.

Se evaluaron las siguientes formulaciones tópicas.

Tabla 8. FORMULACIONES BPX-1M Y BPX-4M

MATERIAL	PORCENTAJE EN LA FORMULACIÓN		
	BPX-1M 1 % de MINOCICLINA	BPX-4M 4 % de MINOCICLINA	PLACEBO BPX
Minociclina HCl	1,2 %	4,6 %	--
Hidroxipropilcelulosa (KLUCEL HF)	0,6 %	0,6 %	0,6 %
Cloruro de magnesio, anhidro	1,2 %	4,6 %	0,6 %
Etolanol, anhidro	75,8 %	59,0 %	77,59 %
Propilenglicol	20,0 %	30,0 %	20,0 %
Eucaliptol	1,0 %	1,0 %	1,0 %
Metabisulfito de sodio	0,2 %	0,2 %	0,2 %
Amarillo de quinolina	--	--	0,01 %

Tabla 9. Formulación de referencia lipófila

MATERIAL	PORCENTAJE EN LA FORMULACIÓN		
	LIPÓFILA AL 1 %	LIPÓFILA AL 4 %	PLACEBO LIPÓFILO
Minociclina HCl	1,20	4,80	--
Aceite de soja	50,00	50,00	50,00
Aceite de coco	23,60	23,60	23,60
Aceite mineral ligero	4,35	0,75	5,55
Ciclometicona	5,00	5,00	5,00
Alcohol cetosteárico	3,50	3,50	3,50
Ácido esteárico	3,00	3,00	3,00
Alcohol miristílico	2,50	2,50	2,50
Aceite de ricino hidrogenado	2,00	2,00	2,00
Cera de abejas	2,00	2,00	2,00
Alcohol estearílico	1,50	1,50	1,50
Alcohol behenílico	1,10	1,10	1,10
Dióxido de silicio	0,25	0,25	0,25

La formulación lipófila se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20150056149, Composición 244B, Ejemplo 4, Parte A.

Se retiró piel facial humana (mujer, 60 años) de un congelador a -20 °C y se descongeló a 32 °C. Se eliminaron la hipodermis y la capa de grasa. Se cortaron trozos de piel a ~0,7 cm² y se colocaron en una placa de Petri (hidratada con cloruro de sodio al 0,9 % con azida de sodio al 0,2 %) forrada con apósito. La superficie de la piel se transfirió seca. Las formulaciones BPX hidrófilas que se habían almacenado a -4 °C se llevaron a temperatura ambiente. Las formulaciones lipófilas eran sólidas a temperatura ambiente y, por lo tanto, se calentaron (32 °C, ~3 min) hasta un estado líquido fluido inmediatamente antes de la aplicación. Se utilizó una dosis de 2,5 mg/cm². Usando una pipeta,

cada formulación se aplicó uniformemente sobre el área objetivo de 0,42 cm². El esparcimiento se realizó uniformemente hasta que se secó (~7 segundos). El tejido de la placa de Petri se colocó sin tapar en una incubadora a 32 °C, manteniéndose la gasa moderadamente hidratada. Las formulaciones se aplicaron durante 2 y 4 horas.

5 Tabla 10. Cantidades de aplicación

Formulación	Cantidad de minociclina diana (mg/0,42 cm ²)	Cantidad de formulación (mg/0,42 cm ²)	Volumen de formulación (μl/0,42 cm ²)	Cantidad de formulación para histología (mg)	Volumen de formulación para histología (μl/0,42 cm ²)
Sin tratar	-	-	-	-	-
Placebo lipófilo	-	1,05	1,17	25	27,4
Placebo BPX	-	1,05	2,6		39
BPX-1M	0,0105	1,05	2,10	25	37
Lipófila al 1 %		1,05	1,10	25	26,6
BPX-4M	0,0441	1,05	2,08	25	34,8
Lipófila al 4 %		1,05	1,138	25	26

Al final de cada punto de tiempo, la formulación se eliminó con un apósito empapado en alcohol isopropanol al 70 % y a continuación se secó con un apósito seco. Se tomó un punzón de biopsia (6 mm) de cada sitio de prueba. (Se utilizó el espesor total de la piel para cada biopsia). A continuación, se extrajo minociclina de cada biopsia con 500 μl de metanol acidificado (10 μl de HCl 5 N a 1 ml de MeOH) durante 24 horas a 25 °C. El sobrenadante se analizó mediante HPLC (inyección de 20 μl, ciclo de 15 minutos, 350 nm). En cada muestra se midieron la minociclina intacta, así como el área pico de epi-minociclina (4-epi). Los datos de los donantes se promediaron entre el grupo de tratamiento dado. Se realizaron estándares de HPLC (0,01, 0,1 y 1 mg/ml) para minociclina-HCl y metanol acidificado; con patrones a base de minociclina calculados.

Histología: Se preparó tejido de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Se aplicó uniformemente una cantidad correspondiente a 50 mg/cm² con una pipeta (Tabla 3). El tejido de la placa de Petri se colocó en una incubadora a 32 °C con una cubierta con parafilm durante 24 horas. A las 24 horas, se limpió suavemente el exceso de formulación y se cortaron las áreas de la piel donde no se aplicó la formulación. A continuación, el tejido restante se incluyó en O.C.T. Se cortaron secciones de bloques de tejido (~12 μm). Se cortaron en serie dos secciones con una distancia de ~100 μm entre cada conjunto cortado en serie. Los portaobjetos se lavaron con 1x PBS y a continuación se cubrieron con glicerol para obtener imágenes fluorescentes.

Para la formulación hidrófila BPX-1M, se detectaron 5,9 μg/cm² y 5,3 μg/cm² de minociclina a las 2 y 4 horas, respectivamente (véase la figura 9a). Para la formulación lipófila al 1 %, se detectaron 2,4 μg/cm² y 2,1 μg/cm² de minociclina a las 2 y 4 horas, respectivamente (figura 9a). No se detectó minociclina en el placebo lipófilo, el placebo BPX y las muestras de piel sin tratar. La formulación hidrófila BPX-1M produjo cantidades de minociclina significativamente mayores en comparación con la formulación lipófila.

La formulación hidrófila BPX-4M demostró 14,2 μg/cm² y 13,0 μg/cm² de minociclina a las 2 y 4 horas, respectivamente (figura 9b). Para la formulación lipófila al 4 %, se detectaron 3,7 μg/cm² y 5,8 μg/cm² de minociclina a las 2 y 4 horas, respectivamente (figura 9b). No se detectó minociclina en tejido cutáneo sin tratar. De forma similar, no se detectó minociclina en el tejido cutáneo tratado con placebo lipófilo o con placebo BPX-01. La formulación hidrófila BPX-4M produjo una cantidad significativamente mayor de minociclina en comparación con la formulación lipófila. Se observó una absorción similar con las formulaciones hidrófila BPX-1M y lipófila al 4 % (figura 10) en ambos puntos de tiempo probados a pesar de que la formulación lipófila tenía una concentración 4 veces mayor del fármaco de minociclina.

Antes de la aplicación, se midió la concentración de epímero de minociclina en las formulaciones al 1 % con valores del 0,93 % y del 0,86 % para la formulación BPX-1M y la formulación lipófila, respectivamente (figura 11a). A partir de muestras de piel tratadas, se midió la epimerización de minociclina al 9,7 % y al 10,6 % para la formulación hidrófila BPX-1M a las 2 y 4 horas, respectivamente. Se determinaron valores de epimerización aumentados del 37,6 % y del 29,8 % para la formulación lipófila al 1 % medidos a las 2 y 4 horas, respectivamente (figura 11a).

Antes de la aplicación, se midió la concentración de epímero de minociclina en las formulaciones al 4 % con valores

del 1,08 % y del 0,75 % para la formulación BPX-1M y la formulación lipófila, respectivamente (figura 11b). A partir de muestras de piel tratadas con la formulación hidrófila BPX-4M, se midió la epimerización de minociclina al 5,1 % y al 4,5 % a las 2 y 4 horas, respectivamente. Se determinaron valores de epimerización aumentados del 7,3 % y del 11,6 % para la formulación lipófila al 4 % medidos a las 2 y 4 horas, respectivamente (figura 11b).

Las formulaciones hidrófilas penetraron mejor en la piel humana *ex vivo* que la formulación lipófila, y la minociclina que penetró en la piel no se degradó tan significativamente en las formulaciones hidrófilas como lo hizo en la formulación lipófila.

Se observa un aumento notable de la intensidad de fluorescencia en el estrato córneo, la epidermis y en las glándulas sebáceas para la formulación hidrófila BPX-4M (figura 12D) en comparación con la formulación lipófila al 4 % (figura 12A). Los datos muestran la penetración de la minociclina en las glándulas sebáceas donde se encuentran las bacterias *P. acnes*. A modo de comparación, también se muestra la intensidad de fluorescencia para el placebo lipófilo (figura 12B), sin tratamiento (figura 12C), y el placebo BPX (figura 12E).

EJEMPLO 13

ESTUDIO *IN VIVO* DE PARCHES DE DOSIS REPETIDA DE 7 Y 20 DÍAS EN CERDOS ENANOS

Se realizó un estudio de aplicación tópica en cerdo enano durante un periodo de 7 días o 20 días, respectivamente, para evaluar la absorción cutánea y plasmática y la toxicidad dérmica asociada con aplicaciones de dosis repetidas de formulaciones de minociclina que contenían diferentes cantidades de base equivalente de minociclina (placebo, 0,5 %, 1 %, 2 %, y 4 %). El estudio se realizó con 4 cerdos enanos hembra sin tratar, libres de antibióticos, con un peso de entre 20 y 30 kg y de 12-18 meses de edad. Los artículos de prueba aplicados fueron los mismos que los descritos en el Ejemplo 8, Tabla 5 (es decir, composiciones 0-B, 0.5-B, 1-B, 2-B, y 4-B).

El Día 0, los animales se pesaron y se anestesiaron. El área del costado derecho e izquierdo se recortó y se afeitó cuidadosamente, y se marcaron seis sitios de aplicación de prueba, de 3 cm x 3 cm cada uno o de aproximadamente 10 cm². Los artículos de prueba y de control se aplicaron por vía tópica usando una pipeta de desplazamiento positivo y se extendieron en el área de prueba marcada usando una espátula de metal. La dosificación continuó diariamente hasta el Día 6 (Grupo 1) y el Día 20 (Grupo 2). Antes de la dosificación diaria, los sitios de tratamiento se limpiaron suavemente una vez con jabón seguido de un lavado suave con una solución salina tamponada con fosfato (PBS). El peso corporal se midió una vez a la semana.

Tabla 11: RESUMEN DEL TRATAMIENTO EN SITIOS DE DOSIFICACIÓN

Sitio de dosificación	Animales 151/251			Animales 152/252		
	Artículo de prueba	Dosis/Formulación	Volumen (μl)	Artículo de prueba	Dosis/Formulación	Volumen (μl)
L1	0-B	Vehículo, 0 % de minociclina	25	0-B	Vehículo, 0 % de minociclina	125
L2	0.5-B	0,5 %	25	0.5-B	0,5 %	125
L3	1-B	1 %	25	1-B	1 %	125
L4	2-B	2 %	25	2-B	2 %	125
L5	4-B	4 %	25	4-B	4 %	125

Los sitios de dosificación se evaluaron diariamente para detectar eritema y edema usando un sistema de puntuación Draize modificado. Se tomaron fotografías antes de la administración de la dosis el Día 0 y diariamente a partir de entonces. La pigmentación de la piel se observó visualmente a diario. Además, se tomaron fotografías con lámpara UV de los sitios de dosificación el Día 0 y al final de la dosificación (Día 7 para el Grupo 1 y Día 20 para el Grupo 2). Al final del estudio, los animales se sacrificaron y se recogieron tejidos cutáneos de los sitios de dosificación, junto con un sitio sin tratar.

Resultados: No se observaron cambios de peso anormales en ningún grupo de tratamiento. No se observó irritación de la piel a lo largo de todo el periodo de tratamiento, como lo indica la falta de eritema y edema. La cantidad total de formulación aplicada en el transcurso del tratamiento de 7 o 20 días fue de 54,3 mg (n.º 151), 91,9 mg (n.º 152), 155 mg (n.º 251), y 262,5 mg (n.º 252). El límite de detección inferior del protocolo de extracción de plasma fue de 1,0 ng/ml. En estos análisis, no se detectó minociclina en ninguna de las muestras de plasma analizadas.

Se observó un amarilleo transitorio y diferencial del parche con las formulaciones al 1,0 % a una cantidad de aplicación de 125 mg a partir del Día 4 y se mantuvo durante toda la duración del experimento (figura 1). 125 mg de

formulación equivalen a 12,5 mg/cm² de tratamiento, lo que equivale aproximadamente a una aplicación diaria de 5 g en seres humanos (suponiendo un área de 400 cm² en un rostro humano). Se observó coloración amarillenta en los grupos del 2 % y el 4 % con tinción observada desde el segundo día de tratamiento.

En todos los sitios de aplicación, se detectó al menos 1 µg/cm² de minociclina, con al menos 2-3 veces esa cantidad de minociclina encontrada en los grupos de formulación al 1 %, 2 % y al 4 %. El aumento de la absorción de minociclina no fue lineal. En el grupo de tratamiento de 20 días, se observó un grado de saturación al nivel de aplicación de 25 mg. Los grupos de 7 y 20 días mostraron tendencias similares en la absorción de minociclina en la piel, lo que sugirió que el régimen de tratamiento puede estar acercándose a la saturación.

En el análisis de imágenes (ahora mostrado), la minociclina se localizó dentro de las glándulas pilosebáceas en grupos de formulación al 0,5 %, 1 %, 2 %, y al 4 %. Se detectó minociclina en el estrato córneo y los folículos pilosos. Se detectó una mayor cantidad de minociclina en los grupos del 4 %. No se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento de 7 días y 20 días. En este estudio, incluso en el grupo de aplicación de 25 mg al 0,5 %, se observó una absorción de minociclina de al menos 1,03 µg/cm², lo que parece cumplir el requisito de penetración para lograr una concentración local dentro de la piel indicativa de una dosis terapéutica. A ~1,03 µg/cm², esto se traduce en 0,18 µg/g de minociclina en la piel, que es al menos un orden de magnitud por encima de la MIC necesaria para inhibir *P. acnes*.

EJEMPLO 14

ESTUDIO *IN VIVO* DE DOSIS ÚNICA EN RATAS DE LA IRRITACIÓN CUTÁNEA, RANGO DE DOSIS FARMACOCINÉTICO, E HISTOLOGÍA

Se realizó un estudio de irritación cutánea en ratas con composiciones administradas por vía tópica que comprendían minociclina y una sal de magnesio en un sistema disolvente que comprendía etanol y propilenglicol (por ejemplo, de 50-99,9 % p/p); también se evaluaron los parámetros farmacocinéticos. El contenido de agua para cada una de las composiciones aplicadas, según lo medido por la titulación de Karl Fischer, estaba en el intervalo del 0,5 % a 1 %. El valor del pH para cada una de las composiciones estaba en el intervalo de 3,9 a 4,4. Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de dosis única y se demostró que la exposición sistémica a las composiciones de minociclina aplicadas por vía tópica era menor que la de las formas de dosificación orales eficaces para proporcionar concentraciones similares de fármaco en la piel.

Se evaluaron los niveles en plasma sanguíneo de clorhidrato de minociclina después de un único tratamiento con cuatro formulaciones que contenían aproximadamente el 0,5 %, 1 %, 2 %, o el 4 % en peso de minociclina como se describe en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12. FORMULACIONES TÓPICAS DE MINOCICLINA UTILIZADAS EN EL ESTUDIO (TODOS LOS PORCENTAJES ESTÁN ENUMERADOS EN PESO (ES DECIR, (P/P)))

NÚMERO DE LA COMPOSICIÓN	0-B-2	0.5-B	1-B	2-B-2	4-B
Clorhidrato de minociclina	0 %	0,6 %	1,2 %	2,3 %	4,6 %
Hidroxipropilcelulosa	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %
Cloruro de magnesio (anhidro)	0,6 %	0,6 %	1,2 %	2,3 %	4,6 %
Etanol (anhidro)	77,59 %	77,0 %	75,8 %	73,6 %	59,0 %
Propilenglicol	20,0 %	20,0 %	20,0 %	20,0 %	30,0 %
1,8-Cineol	1,0 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %	1,0 %
Metabisulfito de sodio	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
D&C Amarillo N.º 10	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
pH medido para la composición	4,86	4,35	4,19	3,90	3,90
Contenido de agua medido para la composición	0,39 %	0,48 %	0,52 %	0,63 %	0,86 %

La composición 0-B-2 es una composición de referencia.

El día antes del tratamiento, se afeitó un área de 15 cm² en el área dorsal en la región de los hombros y la espalda de cada una de las veintiuna ratas macho Sprague-Dawley y se marcó un área de 10 cm² como el sitio de prueba de

aplicación, Las ratas se dividieron al azar de manera uniforme en 7 grupos de tratamiento. Cada grupo recibió la aplicación de una de las composiciones enumeradas en la Tabla 12 (0-B-2, 0.5-B, 1-B, 2-B-2, o 4-B) en la cantidad descrita en la Tabla 13. La composición se aplicó a cada una de las ratas en cada grupo de tratamiento. Las composiciones se aplicaron uniformemente al sitio de prueba de aplicación en cada rata en el momento T-0.

5

Tabla 13. GRUPOS DE TRATAMIENTO

Grupo de tratamiento	Número de composición aplicada	Cantidad de composición aplicada por animal
Grupo 1	0-B-2	2,5 mg/cm ²
Grupo 2	0.5-B	2,5 mg/cm ²
Grupo 3	1-B	2,5 mg/cm ²
Grupo 4	2-B-2	2,5 mg/cm ²
Grupo 5	4-B	2,5 mg/cm ²
Grupo 6	4-B	5,0 mg/cm ²
Grupo 7	ninguna composición aplicada	NA

Se tomaron extracciones de sangre justo antes de la aplicación y durante el siguiente periodo de 24 horas en los siguientes puntos de tiempo: 10, 20, y 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 12, y 24 horas después de la aplicación. Para cada grupo de tratamiento, el nivel promedio de minociclina en el plasma se presenta en la Tabla 14. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el método de análisis fue 10 ng/ml. Los valores inferiores al LLOQ se informan como cero. La concentración sérica máxima ($C_{\text{máx}}$) en ratas Sprague Dawley fue inferior a 550 ng/ml para todas las composiciones ensayadas cuando se midió en los puntos de tiempo mencionados anteriormente en un experimento en el que se permitió que la composición aplicada penetrara sin ayuda durante un periodo de 24 horas en un sitio de prueba de aplicación afeitado de 10 cm² de área con la composición aplicada uniformemente en una cantidad de 2,5 o 5,0 mg/cm².

10

15

En todas menos una de estas composiciones, la $C_{\text{máx}}$ fue inferior a 150 ng/ml. Estos niveles de $C_{\text{máx}}$ se comparan favorablemente con las dosis de minociclina consumida por vía oral que son eficaces para lograr los mismos niveles de fármaco en la piel, ya que dichas dosis se administran a la piel de forma sistémica y, por lo tanto, requieren niveles más altos en la sangre.

20

Tabla 14. NIVELES DE MINOCICLINA (NG/ML) EN PLASMA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO TRANSCURRIDO DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE LA COMPOSICIÓN ENSAYADA.

Grupo de tratamiento	0 minutos	10 minutos	20 minutos	30 minutos	1 hora	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	12 horas	24 horas
Grupo 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grupo 4	0	0	12	29	39	36	21	20	16	14	0
Grupo 5	0	0	0	0	124	149	134	61	29	12	0
Grupo 6	0	33	129	279	533	434	270	125	62	31	12
Grupo 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Se evaluó la irritación usando el sistema de puntuación Draize modificado. Las evaluaciones se realizaron antes e inmediatamente después de la aplicación y en los siguientes puntos de tiempo: 30 minutos, 1, 3, 6, y 24 horas después de la aplicación. No se observaron eritema, enrojecimiento, irritación y/o edema medibles. La puntuación Draize modificada fue 0 para cada uno de los puntos de tiempo y cada una de las ratas del estudio. Esto indica que ninguna de las composiciones ensayadas fue irritante.

No se observaron cambios de peso anormales en ningún grupo de tratamiento.

Las ratas se sacrificaron poco después del punto de tiempo de 24 horas. Se extrajeron biopsias de la piel de las ratas y se congelaron o se fijaron en formalina al 10 % para permitir un análisis histológico adicional, incluida la tinción con hematoxilina y eosina. No se observaron cambios significativos en ninguna de las secciones de piel cuando se compararon los grupos tratados con minociclina con los tratados con la composición 0-B-2 o con los no tratados con ninguna composición.

EJEMPLO 15

ESTUDIO *IN VIVO* DE DOSIS MÚLTIPLE EN RATAS DE LA IRRITACIÓN CUTÁNEA Y EL RANGO DE DOSIS FARMACOCINÉTICO

Se realizó un estudio toxicocinético de dosis múltiple en ratas Sprague-Dawley a las que se administró por vía tópica composiciones que comprendían minociclina y una sal de magnesio en un sistema disolvente que comprendía etanol y propilenglicol (por ejemplo, 50-99,9 % p/p). Se evaluó la toxicidad potencial de composiciones de ejemplo. Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de dosis múltiple y se demostró que la exposición sistémica a las composiciones de minociclina aplicadas por vía tópica era menor que la de las formas de dosificación orales eficaces para proporcionar concentraciones similares de fármaco en la piel. La cantidad de minociclina aplicada diariamente a cada animal en el estudio estuvo en el intervalo de 0,0 a 0,5 mg/cm². La concentración de minociclina fue de aproximadamente el 0 %, 1 %, y el 4 % en las composiciones 0-B-2, 1-B-2, o 4-B-2 como se describe en la Tabla 15.

Tabla 15. FORMULACIONES TÓPICAS DE MINOCICLINA UTILIZADAS EN EL ESTUDIO (TODOS LOS PORCENTAJES ESTÁN ENUMERADOS EN PESO (ES DECIR, (P/P))

NÚMERO DE LA COMPOSICIÓN	0-B-2	1-B-2	4-B-2
Clorhidrato de minociclina	0 %	1,1 %	4,3 %
Hidroxipropilcelulosa	0,6 %	0,6 %	0,6 %
Cloruro de magnesio (anhidro)	0,6 %	1,1 %	4,3 %
Etanol (anhidro)	77,59 %	75,9 %	69,6 %
Propilenglicol	20,0 %	20,0 %	20,0 %
1,8-Cineol	1,0 %	1,0 %	1,0 %
Metabisulfito de sodio	0,2 %	0,2 %	0,2 %
D&C Amarillo N.º 10	0,01 %	0,00 %	0,00 %

La composición 0-B-2 es una composición de referencia.

Veinte ratas macho sanas y veinte ratas hembra sanas se dividieron en partes iguales en cuatro grupos de cinco ratas macho y cinco ratas hembra cada uno. Las ratas tenían aproximadamente 8 semanas de edad al comienzo del estudio y tenían un peso corporal que variaba de 280 a 330 gramos. Las composiciones se aplicaron diariamente a cada rata en el estudio durante 28 días basándose en el número de grupo para cada rata como se describe en la Tabla 16. Las ratas no se movieron entre los grupos durante el estudio.

Los animales se alojaron individualmente. El agua y una dieta estándar de pienso Lab Diet Rodent N.º 5001 estaban disponibles para cada rata a voluntad, excepto según lo requerido para los procedimientos.

Un día antes de la primera aplicación, se afeitó un área de 15 cm² en la región dorsal de los hombros y la espalda usando maquinillas para animales estándar. La superficie de la piel se limpió suavemente con acetona para eliminar el sebo y asegurar que la piel estuviera limpia. Se marcó un área de 10 cm² usando un marcador de tinta permanente no tóxica. Las cánulas se llenaron con aproximadamente 150 µl de solución salina de heparina al 1 %.

Antes de la dosificación diaria, los sitios se limpiaron con champú sin agua (Sullivan E-Z Clean) y PBS. Los Días 1-27, se aplicó la composición de prueba apropiada usando una pipeta de desplazamiento positivo y se extendió cuidadosamente en el área de prueba marcada de 10 cm² usando una espátula de metal limpia. A continuación, la

composición aplicada se dejó secar y cada rata se devolvió a su jaula.

- Se evaluaron los niveles en plasma sanguíneo de clorhidrato de minociclina después de la aplicación durante el primer día de aplicación (que se etiquetó como Día 1), el decimocuarto día de aplicación (que se etiquetó como Día 14) y el vigésimo octavo día de aplicación (que se etiquetó como Día 28). Para cada una de las noches anteriores a la toma de muestras de plasma, las ratas se mantuvieron en ayunas durante una noche, con libre acceso al agua.

Tabla 16. GRUPOS

Grupo	Número de animales	Número de composición aplicada diariamente	Cantidad de composición aplicada por animal (mg/cm ² /día)	Dosis de minociclina por animal (mg/cm ² /día)
1	5 machos y 5 hembras	0-B-2	2,5	0
2	5 machos y 5 hembras	1-B-2	2,5	0,025
3	5 machos y 5 hembras	4-B-2	6,25	0,25
4	5 machos y 5 hembras	4-B-2	12,5	0,5

- No se observó irritación dérmica significativa en los Grupos 1 y 2 y se incluyó un ligero eritema en los Grupos 3 y 4, con una mayor incidencia y gravedad de la irritación en el Grupo 4.

- No hubo efectos relacionados con el artículo de prueba sobre el peso corporal o los cambios, el consumo de comida, los parámetros de patología clínica, los hallazgos de patología macroscópica o el peso de los órganos. Adicionalmente, no se observaron diferencias en la hematología o la química clínica para ninguno de los Grupos, aparte de los niveles de minociclina medidos en el plasma.

- Se observó y se anotó una acantosis mínima a leve en las áreas de aplicación de la piel. Estas lesiones se consideraron de distribución irregular con un ligero aumento en la celularidad epidérmica y cifras mitóticas basales ocasionales que se observaron principalmente en el Grupo 4. Basándose en estos resultados, se consideró que el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) era, tanto en los machos como en las hembras, de aproximadamente 0,25 mg/cm²/día, lo que correspondió a 6,25 mg/cm²/día de una composición que comprendía aproximadamente el 4 % de minociclina.

- Se midieron las características toxicocinéticas de las composiciones en el plasma de cada uno de los animales después de la administración diaria de las composiciones. Para cada uno de los Grupos, se detectó minociclina para cada uno de los días en los que se realizó una evaluación (es decir, los Días 1, 14, y 28). Se midió un aumento de minociclina dependiente de la dosis en el plasma, como se describe con más detalle en los datos de la Tabla 17. No se detectó minociclina a niveles significativos en las ratas del Grupo 1. En este estudio hubo diferencias por sexo en la exposición y se atribuyeron a las diferencias en la densidad del cabello.

Tabla 17. RESUMEN DE PARÁMETROS TOXICOCINÉTICOS EN PLASMA DE RATA

Grupo	Día del muestreo	C _{máx} (ng/ml)		AUC (ng*h/ml)		T _{máx} (h)	
		Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
2	1	54	98,1	347,6	961,3	1	2
	14	28,7	294,4	406,4	2833,5	1	2
	28	39,1	33,1	14,0	21,8	4	4
3	1	3914,8	11308,1	17070,5	75525,9	1	2
	14	2199,3	10519,1	17395,5	77513,3	2	1
	28	761,5	937,7	281,6	175,7	4	4
4	1	2392,8	3149,1	30076	30899,9	2	2
	14	6936,7	12553,3	72168,8	142035,5	4	2
	28	8618,5	9082,3	923,7	550,4	4	4

Este estudio, como se describe en el Ejemplo 15, demostró que la dosificación repetida de un mamífero se puede realizar de manera segura a niveles de dosificación de minociclina en el intervalo de 0,0 mg/cm²/día a 0,5 mg/cm²/día, o preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,025 mg/cm²/día a aproximadamente 0,5 mg/cm²/día, o más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,025 mg/cm²/día a aproximadamente 0,25 mg/cm²/día. Las dosis más altas de minociclina permiten tratamientos más agresivos. Se prefieren dosis superiores a 0,25 mg/cm²/día. Para evitar el nivel de irritación identificado en el Grupo 4, se prefieren dosis inferiores a 0,5 mg/cm²/día.

EJEMPLO 16

ESTUDIO TOXICOCINÉTICO *IN VIVO* DE DOSIS MÚLTIPLE EN CERDOS ENANOS

Se realizó un estudio toxicocinético de dosis múltiple en cerdos enanos Gottingen a los que se administró por vía tópica composiciones que comprendían minociclina y una sal de magnesio en un sistema disolvente que comprendía etanol y propilenglicol (por ejemplo, 50-99,9 % p/p). Se evaluó la toxicidad potencial de composiciones de ejemplo. Se evaluaron los parámetros toxicocinéticos. La cantidad de cada formulación aplicada diariamente a cada animal en el estudio estuvo en el intervalo de 0,0 a 12,5 mg/cm². La concentración de minociclina fue de aproximadamente el 0 %, 1 %, y el 4 % en las composiciones 0-B-2, 1-B-2, y 4-B-2 como se describe en la Tabla 15 del Ejemplo 15.

Quince cerdos enanos Gottingen macho sanos y quince cerdos enanos Gottingen hembra sanos se dividieron aleatoriamente en cinco grupos de tres cerdos enanos macho y tres hembras cada uno. Los cerdos enanos tenían aproximadamente 20 semanas de edad al comienzo del estudio y tenían un peso corporal que variaba de 7,4 a 10,3 kilogramos. Las composiciones se aplicaron diariamente a cada cerdo enano en el estudio durante 28 días basándose en el número de grupo para cada cerdo enano como se describe en la Tabla 18. El Grupo 1 era un grupo de control simulado (es decir, no tratado). Los cerdos enanos del Grupo 1 pasaron por los mismos procedimientos que los cerdos enanos de los Grupos 2-5, excepto que no se aplicó ninguna composición de prueba al área de tratamiento marcada.

Los animales se alojaron individualmente. Cada cerdo enano tenía acceso libre al agua y se le proporcionó una ración dos veces al día de una dieta estándar.

Un día antes de la primera aplicación y según fue necesario a partir de entonces, se preparó la región dorsal de cada cerdo enano recortando el pelo con maquinillas para animales estándar. Se tuvo cuidado durante el procedimiento de recorte para evitar la abrasión de la piel. La superficie de la piel se limpió suavemente con una gasa empapada en champú sin agua (SULLIVAN E-Z CLEAN, Sullivan Supply, Inc. Dunlap, IA), a continuación con una gasa empapada en agua tibia de ósmosis inversa (37-43 °C), y a continuación con una gasa seca para asegurarse de que la piel estaba limpia. El área de superficie objetivo para la aplicación de cada cerdo enano se calculó una vez por semana de acuerdo con la siguiente fórmula: área de superficie objetivo en metros cuadrados = $[9,5 * (\text{peso corporal en gramos})^{2/3}] / 10.000$. El área correspondiente se marcó en cada cerdo enano con tinta indeleble. Esta área de superficie objetivo corresponde a aproximadamente el 15 % de la superficie corporal total (Spector, W.S. Handbook of Biological Data. Filadelfia: W.B. Saunders Co. 1956; 175).

Antes de la dosificación diaria, los sitios se limpiaron como se ha descrito anteriormente. Los Días 1 a 28, se aplicó la composición de prueba adecuada a los cerdos enanos de los Grupos 2 a 5 y se extendió cuidadosamente en el área de prueba marcada usando un aplicador de plástico desechable limpio. A continuación, la composición aplicada se dejó secar y cada cerdo enano se devolvió a su jaula.

Se evaluaron los niveles en plasma sanguíneo de minociclina después de la aplicación durante el primer día de aplicación (que se etiquetó como Día 1), el decimocuarto día de aplicación (que se etiquetó como Día 14) y el día después del vigésimo octavo día de aplicación (que se etiquetó como Día 28). Para cada una de las noches anteriores a la toma de muestras de plasma, los cerdos enanos se mantuvieron en ayunas durante una noche, con libre acceso al agua.

Se realizó un análisis de orina para cada cerdo enano el Día 14 y después de la autopsia. La orina se recogió durante la noche a través del drenaje de la bandeja de la jaula el Día 14 y mediante cistocentesis en la autopsia. Los cerdos enanos se mantuvieron en ayunas durante la noche anterior a la autopsia programada.

Tabla 18. GRUPOS

Grupo	Número de animales	Número de composición aplicada diariamente	Cantidad de composición aplicada por animal (mg/cm ² /día)	Dosis de minociclina por animal (mg/cm ² /día)
1	3 machos y 3 hembras	Sin composición de prueba (Grupo de control simulado)	0	0
2	3 machos y 3 hembras	0-B-2	2,5	0
3	3 machos y 3 hembras	1-B-2	2,5	0,025
4	3 machos y 3 hembras	4-B-2	6,25	0,25
5	3 machos y 3 hembras	4-B-2	12,5	0,5

Se evaluaron los siguientes parámetros y criterios de valoración en el estudio: cambios clínicos, puntuaciones dérmicas, pesos corporales, consumo de comida, cambios oftalmológicos, ritmos electrocardiográficos, parámetros de patología clínica (incluidos parámetros de hematología, coagulación, química clínica, análisis de orina), parámetros toxicocinéticos, hallazgos de patología macroscópica, peso de los órganos, y características histopatológicas.

No se observaron signos clínicos adversos en los Grupos 1 a 4. En el Grupo 5, algunos cerdos enanos demostraron una mayor actividad, vocalización, rascado excesivo y temblores durante las dos últimas semanas del estudio inmediatamente después de la administración de la dosis. Dichos síntomas se resolvieron entre 1 y 3 horas después de la dosis.

No se observó irritación dérmica en los Grupos 1 a 3. En los Grupos 4 y 5, se observó cierta irritación dérmica. La gravedad promedio de la irritación dérmica fue mayor para el Grupo 5 que para el Grupo 4 e incluyó dos casos de ulceración y un caso de fisura.

No hubo efectos relacionados con el artículo de prueba sobre el peso corporal, el consumo de comida, los cambios oftalmológicos, los ritmos electrocardiográficos, los parámetros de patología clínica, los hallazgos de patología macroscópica, el peso de los órganos, o las características histopatológicas.

No murió ningún cerdo enano antes de la autopsia programada.

Se midieron las características toxicocinéticas en el plasma de cada uno de los cerdos enanos después de la administración tópica diaria de las composiciones. Se midió un aumento de minociclina dependiente de la dosis en el plasma, como se describe con más detalle en los datos de la Tabla 19. La minociclina estuvo por debajo del límite inferior de cuantificación de 1 ng/ml durante todo el periodo de muestreo en los Grupos 1 a 3 y para el Día 1 en el Grupo 4.

Tabla 19. RESUMEN DE PARÁMETROS TOXICOCINÉTICOS MEDIOS EN PLASMA DE CERDOS ENANOS POR GRUPO

Grupo	Día del muestreo	C _{máx} (ng/ml)		AUC (ng*h/ml)		T _{máx} (h)	
		Macho	Hembra	Macho	Hembra	Macho	Hembra
4	1	NC	NC	NC	NC	NC	NC
	14	8,06	8,27	116	132	2	2
	28	25,6	15,2	408	273	8	2
5	1	5,86	6,60	47,4	75,4	8	2
	14	62,0	23,7	647	270	2	1
	28	71,6	42,5	921	681	4	8
NC = no calculable porque está por debajo del nivel de cuantificación							

El Día 28, las áreas tratadas se limpiaron como se ha descrito anteriormente y los cerdos enanos del estudio se sacrificaron. Se extrajeron muestras de piel para medir el nivel de minociclina presente en la piel.

Tabla 20. RESUMEN DE LOS NIVELES DE MINOCICLINA MEDIOS EN PIEL DE CERDOS ENANOS POR GRUPO

Grupo	Nivel de minociclina en la piel (µg/ml)	
	Macho	Hembra
1	NC	NC
2	NC	NC
3	7,3	7,4
4	75,6	11,2
5	20,0	27,7
NC = no calculable porque está por debajo del nivel de cuantificación		

En resumen, la administración dérmica de cada una de las composiciones probadas en este estudio fue bien tolerada en cerdos enanos. Basándose en los resultados, se consideró que el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) era, tanto en los machos como en las hembras, de aproximadamente 0,25 mg/cm²/día (correspondiente a 0,269 mg/cm²/día de clorhidrato de minociclina), que correspondió a 6,25 mg/cm²/día de una composición que comprendía aproximadamente al 4 % de minociclina y correspondió a una C_{máx} de 25,6 ng/ml en machos y 15,2 ng/ml en hembras y un AUC de 408 h*ng/ml en machos y 273 h*ng/ml en hembras después de la aplicación repetida de 28 días.

Este estudio, como se describe en el Ejemplo 16, demostró que la dosificación repetida de un mamífero se puede realizar de manera segura a niveles de dosificación de minociclina en el intervalo de 0,0 mg/cm²/día a 0,5 mg/cm²/día, o preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,025 mg/cm²/día a aproximadamente 0,5 mg/cm²/día, o más preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,025 mg/cm²/día a aproximadamente 0,25 mg/cm²/día. Las dosis más altas de minociclina permiten tratamientos más agresivos. Se prefieren dosis de al menos 0,01 mg/cm²/día o dosis de al menos 0,025 mg/cm²/día. Para evitar el nivel de irritación identificado en el Grupo 5, se prefieren dosis inferiores a 0,5 mg/cm²/día.

EJEMPLO 17

PRUEBA DE IRRITACIÓN OCULAR *IN VITRO* EN MODELO EPIOCULAR EIT

Se evaluaron los efectos de irritación ocular de dos composiciones que comprendían minociclina, una sal de magnesio y metabisulfito de sodio en un sistema disolvente que comprendía etanol y propilenglicol. Estos se compararon con una composición de vehículo sin minociclina, así como con controles positivos y negativos.

Las Naciones Unidas publican el "Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)" para la clasificación de efectos oculares (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS); Capítulo 3: Serious Eye Damage/Irritation - Segunda Edición Revisada, United Nations; N.º. ST/SG/AC.10/30, Rev. 2, 2007). Las sustancias químicas y composiciones probadas se clasifican en una de 3 categorías: sin daño ocular (es decir, Categoría del GHS "Sin categoría"), daño ocular irreversible (es decir, Categoría 1 del GHS), o irritación ocular reversible (es decir, Categoría 2 del GHS).

En este estudio, los efectos de irritación ocular se evaluaron siguiendo el procedimiento descrito en el protocolo de prueba de irritación ocular (EIT) EPIOCULAR de MATTEK (EpiOcular™ Eye Irritation (OCL-200-EIT) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals, N.º de referencia MK-24-007-0055, MatTek Corporation, Ashland, MA). El modelo EPIOCULAR de MATTEK es un modelo tridimensional disponible comercialmente del epitelio corneal humano derivado de queratinocitos epidérmicos humanos normales. El criterio de valoración de la prueba es una estimación de la viabilidad celular mediante el ensayo MTT (bromuro de metiltiazolildifeniltetrazolio). Dado que la región del ojo que es más comúnmente dañada por una composición sería la superficie externa de la córnea y este modelo emula la porción externa de la córnea, este modelo se usa comúnmente para evaluar el potencial de irritación ocular por sustancias químicas. El uso del protocolo EPIOCULAR EIT se especifica en la OECD Test Guideline N.º 492. Por lo tanto, esta prueba proporcionó una indicación del nivel de irritación o daño ocular que se observaría en una prueba *in vivo*.

Las composiciones se clasificaron como sin daño ocular (es decir, categoría del GHS "No clasificado") si la viabilidad celular por MTT era superior al 60 % en relación con las muestras de control de agua ultrapura. Se usó acetato de etilo como control positivo. La viabilidad celular se midió a través de la densidad óptica según lo medido con un lector de placas MULTISKAN SPECTRUM (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finlandia). La viabilidad celular por

MTT para los modelos EPIOCULAR de MATTEK se ensayó tras una exposición a una composición (o un control) en una incubadora humidificada mantenida a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 30 minutos. La escala de viabilidad celular se midió en relación con la viabilidad celular posterior a la exposición para el control negativo (agua ultrapura). La viabilidad celular media para el control negativo se utilizó para establecer el valor que correspondía al 100 % de viabilidad celular. Las composiciones se clasificaron como irritación o daño ocular (es decir, categoría 1 o 2 del GHS) si la viabilidad celular posterior a la exposición era menor o igual al 60 % de la viabilidad celular media correspondiente para la muestra de control negativo. En este estudio, se evaluaron las composiciones 0-B-2, 1-B-2 y 4-B-2 como se describe en la Tabla 15 del Ejemplo 15.

Los resultados del estudio mostraron que la viabilidad celular media por MTT después de la exposición en relación con el control negativo fue del 48 % para la composición 0-B-2, del 64 % para la composición 1-B-2, y del 49 % para la composición 4-B-2. Por lo tanto, se determinó que las composiciones 0-B-2 y 4-B-2 irritaban o dañaban los ojos (Categoría 1 o 2 de UN GHS) y que la composición 1-B-2 no causaba daño ocular (es decir, categoría UN GHS "Sin categoría").

Por lo tanto, algunas composiciones de acuerdo con la invención tienen una viabilidad celular por MTT después de la exposición a la composición con respecto al valor inicial de viabilidad celular por MTT superior al 60 % cuando se ensayan con el modelo EPIOCULAR de MATTEK de acuerdo con el protocolo EPIOCULAR EIT de MATTEK.

EJEMPLO 18

ESTUDIO DE LA SENSIBILIZACIÓN DÉRMICA *IN VIVO* EN COBAYAS

Se evaluó el potencial de sensibilización dérmica para composiciones que comprendían minociclina, una sal de magnesio y metabisulfito de sodio en un sistema disolvente que comprendía etanol y propilenglicol. El estudio utilizó cobayas albinas obtenidas de Hartley de acuerdo con los Grupos que se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. GRUPOS ENSAYADOS EN EL ESTUDIO DE SENSIBILIZACIÓN DÉRMICA

Grupo	Número de animales	Fase de inducción (tratamientos semanales durante 3 semanas)	Fase de exposición	Fase de reexposición
1 (Vehículo de control)	5 machos y 5 hembras	0-B-2	0-B-2	0-B-2
2 (grupo de tratamiento)	10 machos y 10 hembras	4-B-2	4-B-2	4-B-2
3 (control de exposición común)	5 machos y 5 hembras	Ninguno	0-B-2 y 4-B-2	Ninguno
4 (control de reexposición común)	5 machos y 5 hembras	Ninguno	Ninguno	0-B-2 y 4-B-2
5 (Prueba HCA)	5 machos y 5 hembras	5,0 % de HCA en etanol	2,5 % y 1,0 % de HCA en acetona	Ninguno
6 (Control positivo de HCA)	5 machos y 5 hembras	Ninguno	2,5 % y 1,0 % de HCA en acetona	Ninguno

Se trataron por vía tópica diez (10) cobayas macho y 10 cobayas hembra (Grupo 2) con 4-B-2 (aproximadamente el 4 % de minociclina) una vez por semana, durante 3 semanas consecutivas. Además, un grupo de control de 5 cobayas macho y 5 hembras (Grupo 1) se trató por vía tópica con Vehículo (0-B-2) una vez por semana, durante 3 semanas consecutivas. Después de un periodo de descanso de aproximadamente 2 semanas, se realizó una exposición mediante la cual las cobayas de los Grupos 1 y 2 se volvieron a tratar con 4-B-2 o 0-B-2, respectivamente, y un grupo de exposición no tratado previamente (sin tratar) de cobayas de control (Grupo 3) se trató con 4-B-2 y 0-B-2. Para el grupo de exposición no tratado previamente (sin tratar) de cobayas de control, se aplicaron ambas composiciones 4-B-2 y 0-B-2 en dos ubicaciones distintas en cada animal de prueba. Las respuestas de exposición en los animales de prueba en los Grupos 1 y 2 se compararon con las de los animales de control de exposición en el Grupo 3.

Después de un periodo de descanso de aproximadamente 1 semanas, se realizó una reexposición durante la cual los animales de los Grupos 1, 2 y 4 se trataron por vía tópica con el material apropiado como se describe en la Tabla 21. Las respuestas de reexposición en los animales de prueba (Grupos 1 y 2) se compararon con las de los animales de control del Grupo 4.

En este estudio se incluyó un control positivo de α -hexilcinaldehído (HCA). Este control positivo consistió en 10

cobayas en un grupo de prueba de HCA (Grupo 5) y 10 cobayas en un grupo de control de HCA (Grupo 6). Los animales se trataron como se describe en la Tabla 21 con los animales de prueba de HCA que recibieron HCA al 5 % p/v en etanol para inducción y HCA al 2,5 % y al 1,0 % p/v en acetona para la exposición. Para la exposición, se aplicaron composiciones de HCA tanto al 1,0 % como al 2,5 % p/v en dos ubicaciones distintas en cada animal de prueba.

Todos los animales excedieron su peso inicial durante el estudio, lo que fue indicativo de buena salud en los animales. Se observaron hallazgos aislados de una ligera pérdida de peso, entre la administración de la dosis de exposición y de reexposición, en animales de prueba y/o probados con vehículo; estas disminuciones fueron mínimas y, por lo tanto, no se consideró que estuvieran relacionadas con la aplicación de la composición 4-B-2 o 0-B-2. Se observó irritación en varios animales durante la administración de exposición. Esta irritación no se observó en el momento de la reexposición. Adicionalmente, solo un animal de prueba con eritema apenas perceptible en la tercera inducción presentó irritación durante la exposición. Si el material resultara en sensibilización, la respuesta se esperaría tanto a la exposición como a la reexposición, así como en un mayor número de animales.

Basándose en los resultados de este estudio, no se consideró que el 4-B-2 y el 0-B-2 fueran un sensibilizador de contacto en cobayas. Este estudio, como se describe en el Ejemplo 18, demostró que la dosificación de un mamífero se puede realizar sin desarrollar una respuesta de sensibilización a niveles de dosificación de minociclina en el intervalo del 0,1 % al 4,0 %, o preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 0,25 % a aproximadamente el 2 %, o más preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 1,5 %. Las dosis más altas de minociclina permiten tratamientos más agresivos. Se prefieren dosis de al menos aproximadamente el 0,20 % o dosis de al menos aproximadamente el 1,0 %.

EJEMPLO 19

EFFECTO ANTIOXIDANTE SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA MINOCICLINA Y LA MINOCICLINA ESTABILIZADA CON MAGNESIO

Se evaluó el efecto de la selección del antioxidante sobre la potencia del fármaco, la estabilidad y la formación de epímeros para composiciones ilustrativas. La degradación y la estabilidad de la minociclina en las composiciones se evaluaron al inicio y después del almacenamiento durante 1, 2 y 4 semanas en la oscuridad a 40 °C dentro de viales de vidrio sellados. Se hicieron esfuerzos para minimizar (en la medida de lo posible en un entorno de laboratorio típico) la cantidad de espacio vacío en el vial sobre cada composición para reducir la interacción entre la composición y cualquier vapor de agua en el aire.

La degradación de la minociclina a su epímero se cuantificó evaluando el cambio en la concentración relativa de 4-epi-minociclina, que se calculó como el área pico de 4-epi-minociclina dividida por la suma del área pico de 4-epi-minociclina y el área pico de minociclina activa. Como cuantificación separada, la estabilidad se cuantificó evaluando el cambio en la concentración relativa de minociclina activa, que se calculó como el pico de minociclina activa dividido por la suma de las áreas picos de todos los picos observados en el cromatógrafo HPLC. Para estas mediciones, se utilizó un tiempo de ciclo de 20 minutos para la HPLC.

Cada una de las composiciones evaluadas en el estudio descrito en este ejemplo incluye los materiales descritos en la Tabla 22. Los primeros seis materiales, es decir, clorhidrato de minociclina, hidroxipropilcelulosa, cloruro de magnesio (anhidro), etanol (anhidro), propilenglicol, y 1,8-cineol constituyen el 99,8 % de cada una de las composiciones evaluadas. El 0,2 % restante consistió en uno de los antioxidantes enumerados en la Tabla 23, o consistió en etanol (anhidro) como control.

Tabla 22. COMPOSICIONES PARA EXPERIMENTOS DE ESTABILIDAD CON DIFERENTES ANTIOXIDANTES

Componente	Cantidad de composición en peso (es decir, (p/p))
Clorhidrato de minociclina	1,2 %
Hidroxipropilcelulosa	0,6 %
Cloruro de magnesio (anhidro)	1,2 %
Etanol (anhidro)	75,8 %
Propilenglicol	20,0 %
1,8-Cineol	1,0 %
Antioxidante o etanol (anhidro) como se define en la Tabla 23	0,2 %

Las composiciones se prepararon de la siguiente manera: El etanol (anhidro), propilenglicol, 1,8-cineol y el

antioxidante o etanol (anhidro) como se define en la Tabla 23, se mezclaron hasta que se dispersaron bien. Se añadieron cloruro de magnesio (anhidro) y clorhidrato de minociclina a la mezcla y se mezclaron hasta que se volvieron transparentes, o durante 15 minutos si la mezcla no se aclaraba. Se añadió lentamente hidroxipropilcelulosa (KLUCEL HF, Ashland Specialty Chemical, Wilmington DE) y se mezcló hasta que se volvió transparente, o durante 15 minutos si la mezcla no se aclaraba.

Tabla 23. ANTIOXIDANTES PARA EXPERIMENTOS DE ESTABILIDAD CON DIFERENTES ANTIOXIDANTES

Número de composición	Antioxidante o etanol (anhidro)
2-ss	Sulfito de sodio
3-sb	Bisulfito de sodio
17-ps	Sulfito de potasio
1-sbs	Metabisulfito de sodio
5-bht	BHT
16-ss	Selenito de sodio
6-toc	DL-alfa-tocoferol
14-comb2	Ditioeritritol y DL-alfa-tocoferol
9-se	Eritorbato de sodio
12-control	Etanol (sin antioxidante)
13-comb1	Ácido ascórbico y DL-alfa-tocoferol
8-dtt	Ditioeritritol
11-cat	Catequina
10-pg	Galato de propilo
15-comb3	Ditioeritritol y eritorbato de sodio
4-aa	Ácido ascórbico
7-sp	Fosfito de sodio
18-sn	Nitrito de sodio

La Tabla 24 describe la concentración relativa medida de 4-epi-minociclina y la concentración relativa de minociclina activa en cada composición. Las mediciones se tomaron al inicio y después de 1, 2 y 4 semanas de envejecimiento a 40 °C en viales de vidrio cerrados. Se utilizó el programa informático JMP Statistical Software Tool (SAS Institute, Inc., Cary, NC) para evaluar el cambio en la concentración por semana basándose en los datos medidos para cada composición para obtener una ecuación de mejor ajuste de mínimos cuadrados lineales para cada composición. La pendiente de esta ecuación de mejor ajuste de mínimos cuadrados lineales se presenta en la Tabla 24 como la tasa de cambio en la concentración durante el periodo de envejecimiento de 4 semanas. La Tabla 24 describe la medición inicial y la pendiente de mejor ajuste para el cambio por semana.

Tabla 24. CONCENTRACIONES RELATIVAS DE 4-EPI-MINOCICLINA Y MINOCICLINA ACTIVA PARA EL ESTUDIO DE ENVEJECIMIENTO DE 4 SEMANAS A 40 °C

Número de composición (véase la Tabla 23)	Concentración relativa inicial de 4-epiminociclina (%)	Concentración relativa de mejor ajuste de <u>aumento</u> de 4-epiminociclina por semana a 40 °C (%/semana)	Concentración relativa inicial de minociclina activa (%)	Concentración relativa de mejor ajuste de <u>disminución</u> de minociclina activa por semana a 40 °C (%/semana)	Cambio de color significativo después de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados
2-ss	0,58	0,271	98,64	0,317	No
3-sb	0,59	0,340	98,76	0,365	No
17-ps	0,77	0,399	98,51	0,400	No

(continuación)

Número de composición (véase la Tabla 23)	Concentración relativa inicial de 4-epiminociclina (%)	Concentración relativa de mejor ajuste de aumento de 4-epiminociclina por semana a 40 °C (%/semana)	Concentración relativa inicial de minociclina activa (%)	Concentración relativa de mejor ajuste de <u>disminución</u> de minociclina activa por semana a 40 °C (%/semana)	Cambio de color significativo después de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados
1-sbs	0,70	0,443	98,62	0,435	No
5-bht	0,64	1,271	98,65	1,192	Sí
16-ss	1,35	1,261	97,59	1,186	Sí
6-toc	0,62	1,260	98,75	1,297	Sí
14-comb2	0,80	1,567	98,23	1,440	Sí
9-se	0,84	1,092	97,64	1,509	Sí
12-control	0,69	1,244	98,51	1,616	Sí
13-comb1	0,83	1,473	98,07	1,631	Sí
8-dtt	0,83	1,702	98,48	1,639	Sí
11-cat	0,84	1,645	98,66	1,646	Sí
10-pg	0,83	1,711	98,77	1,726	Sí
15-comb3	0,83	1,078	97,14	1,831	Sí
4-aa	0,70	1,397	97,70	2,270	Sí
7-sp	0,86	2,682	98,33	2,773	Sí
18-sn	25,94	14,145	61,34	13,595	Sí

Las composiciones preferidas muestran una concentración relativa de 4-epi-minociclina inicial baja y un aumento pequeño o nulo en la concentración relativa de 4-epi-minociclina por semana. Por ejemplo, en algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 5,0 % en una medición inicial y aumenta menos del 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. En algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 1,0 % en una medición inicial y aumenta menos del 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Más preferentemente, la concentración relativa de 4-epi-minociclina es inferior al 1,0 % en una medición inicial y aumenta menos del 0,70 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Preferentemente, la concentración relativa de 4-epi-minociclina está en el intervalo de aproximadamente el 0,50 % a aproximadamente el 1,00 % en una medición inicial y aumenta a una tasa en el intervalo de aproximadamente el 0,20 % a aproximadamente el 0,40 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial.

Las composiciones preferidas muestran una concentración relativa de minociclina activa alta y una disminución pequeña o nula en la concentración relativa de minociclina activa por semana. Por ejemplo, en algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de minociclina activa es de al menos el 95,0 % en una medición inicial y disminuye menos del 1,50 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. En algunas composiciones preferidas, la concentración relativa de minociclina activa es de al menos el 98,0 % en una medición inicial y disminuye menos del 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Más preferentemente, la concentración relativa de 4-epi-minociclina activa es al menos del 98,50 % en una medición inicial y disminuye menos del 0,70 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial. Preferentemente, la concentración relativa de 4-epi-minociclina está en el intervalo de aproximadamente el 97,0 % a aproximadamente el 99,0 % en una medición inicial y disminuye a

una tasa en el intervalo de aproximadamente el 0,30 % a aproximadamente el 1,00 % por semana cuando se mide durante un periodo de 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados, en la que el periodo de 4 semanas comienza inmediatamente después de la medición inicial.

Este estudio evaluó adicionalmente la diferencia de color entre las composiciones al inicio y después del envejecimiento durante 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados. Las cuatro composiciones que incluían un compuesto de sulfito como antioxidante, es decir, las composiciones 2-ss, 3-sb, 17-ps, y 1-sbs, no tenían una diferencia de color significativa entre las composiciones envejecidas e iniciales. Cada una de las demás composiciones mostró diferencias de color significativas. La fuerza de estas diferencias de color no se correlacionó con la cantidad de degradación de la concentración relativa de la minociclina activa. Por ejemplo, las composiciones 5-bht, 12-control y 16-ss se oscurecieron más significativamente que las composiciones 8-dtt y 4-aa a pesar de la degradación más lenta de la concentración relativa de la minociclina activa para las tres primeras composiciones en comparación con las dos últimas composiciones. Las composiciones preferidas no muestran cambios de color significativos después del envejecimiento durante 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados.

En las composiciones preferidas, el cambio de color después del envejecimiento durante 4 semanas a 40 °C en viales de vidrio cerrados es menos de 50, o más preferentemente menos de 20, en la distancia en un espacio RGB tridimensional en el que cada valor se mide en un intervalo de 0-255. La distancia se calcula en un espacio RGB tridimensional de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{distancia}_{\text{RGB}} = ((\Delta R)^2 + (\Delta G)^2 + (\Delta B)^2)^{0.5}$$

El cambio de color se puede evaluar usando un espectrocolorímetro (PANTONE CAPSURE, Modelo RM200, X-Rite, Inc., Grand Rapids, MI). Se utilizan dos portaobjetos de microscopio y se coloca un espaciador de 1 mm entre los portaobjetos. Una pipeta dispensa la composición para llenar el espacio entre los portaobjetos en el área a evaluar. Los portaobjetos de microscopio con la composición interpuesta se colocan sobre una hoja de color blanco de papel de copia estándar no brillante. El espectrocolorímetro se coloca encima de la placa superior del microscopio de manera que el campo de visión del espectrocolorímetro se llena con la composición y el papel sirve como fondo para cualquier luz que penetre a través de la composición.

Se ha descubierto que las composiciones que emplean un compuesto de sulfito como antioxidante eran significativamente más estables que las formuladas utilizando otros antioxidantes. Cada una de las composiciones evaluadas que comprendían un antioxidante que contenía sulfito, es decir, las composiciones 2-ss, 3-sb, 17-ps, y 1-sbs, mostró al menos el 97,0 % de concentración relativa de minociclina activa y mostró una disminución en la concentración relativa de minociclina activa por semana que fue menor que la disminución correspondiente para todas las demás composiciones que se probaron, incluida la composición de control, es decir, la composición 12-control. Estas cuatro composiciones comprendían los antioxidantes sulfito de sodio, bisulfito de sodio, sulfito de potasio y metabisulfito de sodio, respectivamente. Esto demuestra que los compuestos de sulfito tienen propiedades antioxidantes superiores a los antioxidantes genéricos. Además, muchos antioxidantes, incluidos los de las composiciones 13-comb1, 8-dtt, 11-cat, 10-pg, 15-comb3, 4-aa, 7-sp, y 18-sn, en realidad aumentaron la tasa de degradación de la minociclina activa, a pesar de la inclusión de un antioxidante. Por estas razones, las composiciones preferidas comprenden un antioxidante seleccionado de la lista que consiste en un compuesto de sulfito, BHT, selenito de sodio, DL-alfa tocoferol, una combinación de ditioeritritol y DL-alfa tocoferol, y eritorbato de sodio. Más preferentemente, las composiciones comprenden un compuesto de sulfito. Más preferentemente, las composiciones comprenden una sal de sulfito seleccionada de la lista que consiste en sulfito de sodio, bisulfito de sodio, sulfito de potasio y metabisulfito de sodio.

EJEMPLO 20

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE MINOCICLINA Y MINOCICLINA ESTABILIZADA CON MAGNESIO CON CONTENIDO DE AGUA Y pH VARIABLES

Se evaluaron los efectos del contenido de agua sobre la estabilidad de la potencia del fármaco y la formación de epímeros para composiciones ilustrativas. Además, se recopilaron datos durante un periodo de 12 meses para evaluar la estabilidad de la potencia del fármaco a largo plazo y la formación de epímeros para composiciones ilustrativas seleccionadas.

Se evaluó la estabilidad de la minociclina y la formación de epímeros en las composiciones al inicio y después del almacenamiento en viales de vidrio sellados que se mantuvieron en las condiciones especificadas por la International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) (Ginebra, Suiza) en sus directrices "Stability Testing of New Drug Substances and Products" (con fecha del 6 de febrero de 2003). Las condiciones de prueba evaluadas incluyen las siguientes condiciones designadas por la ICH: "largo plazo" (es decir, a 25 °C y el 60 % de humedad relativa (HR)), "intermedia" (es decir, a 30 °C y el 65 % de HR), y "acelerada" (es decir, a 40 °C y el 75 % de HR).

El método de HPLC descrito en este párrafo y los cálculos descritos en el párrafo siguiente se utilizan solo para este

ejemplo. Se inyecta una muestra de 20 microlitros (µl) en una máquina de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Agilent, Santa Clara, CA). La columna de HPLC (Thermo Scientific) era una columna HYPERSIL BDS C18 de 250 x 4,6 mm con un tamaño de partícula de 5 micrómetros (µm). El sistema de HPLC también utilizó una columna de protección (Phenomenex, Inc.) y una fase móvil que consistía en un disolvente base de dimetilformamida al 12 % (v/v) (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), tetrahidrofurano al 8 % (Spectrum Chemicals, Gardena, CA), EDTA 1,8 mM (Spectrum Chemicals, Gardena, CA) y oxalato de amonio 0,12 M (Spectrum Chemicals, Gardena, CA). Se ajustó el pH de la fase móvil a 7,1-7,2. El caudal de HPLC fue de 1,5 ml por minuto con una temperatura de columna de 40 °C, una longitud de onda de detección de 280 nm y un tiempo de ciclo de 30 minutos. La cantidad de minociclina que estaba en solución se determinó basándose en una calibración externa. Esto permitió el cálculo de la concentración de clorhidrato de minociclina.

La degradación de la minociclina a su epímero se cuantificó evaluando el cambio en la concentración relativa de 4-epi-minociclina, que se calculó como el área pico de 4-epi-minociclina dividida por la suma del área pico de 4-epi-minociclina y el área pico de minociclina activa. Como cuantificación separada, la estabilidad se cuantificó evaluando el cambio en la concentración de minociclina activa, que se calculó comparando el área pico de minociclina activa para la muestra con el área pico de minociclina activa para un patrón de trabajo. Como cuantificación separada, la estabilidad se cuantificó además evaluando el cambio en la concentración relativa de minociclina activa, que se calculó como el pico de minociclina activa dividido por la suma de las áreas picos de todos los picos observados en el cromatógrafo HPLC.

El patrón de trabajo para la minociclina se preparó mezclando 25 mg de clorhidrato de minociclina RS USP en un matraz volumétrico de 50 ml que después se llenó con agua para formar 50 ml de solución. El patrón de trabajo se protegió de la luz, se almacenó en un refrigerador si no se usó inmediatamente, y se usó en las 3 horas posteriores a su preparación. La concentración de minociclina activa en el patrón de trabajo se calculó de acuerdo con la ecuación $C = W \cdot (100\% - KF) \cdot (P : V)$, en la que C (en unidades de mg/ml) fue la concentración de la minociclina activa, W (mg) era el peso del clorhidrato de minociclina, KF (%) era la proporción de contenido de agua añadida para crear la solución, P era la potencia de la minociclina, y V (ml) era el volumen de la solución. La potencia de la minociclina usada para este ejemplo fue del 0,917 o del 91,7 %.

Cada una de las composiciones evaluadas en el estudio descrito en este Ejemplo incluye los materiales descritos en las Tablas 25 y 26.

Tabla 25. COMPOSICIONES PARA LOS EXPERIMENTOS DE ESTABILIDAD DE ICH. TODOS LOS PORCENTAJES DESCRIBEN LA CANTIDAD EN PESO (ES DECIR, P/P)

	Cantidad de composición (p/p)					
Componente	SS-0001	SS-0002	SS-0003	SS-0004	SS-0005	SS-0006
Clorhidrato de minociclina	0,60 %	1,20 %	4,63 %	0,60 %	1,20 %	2,30 %
Hidroxipropilcelulosa	0,60 %	0,60 %	0,60 %	0,60 %	0,60 %	0,60 %
Cloruro de magnesio (anhidro)	0,60 %	1,20 %	4,83 %	0,60 %	1,20 %	2,30 %
Etanol (anhidro)	72,78 %	71,74 %	64,44 %	77,00 %	75,80 %	68,60 %
Propilenglicol	20,14 %	20,00 %	20,14 %	20,00 %	20,00 %	25,00 %
1,8-Cineol	5,04 %	5,00 %	5,04 %	1,00 %	1,00 %	1,00 %
Metabisulfito de sodio	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %
Hidróxido de sodio (administrado como parte de una solución de hidróxido de sodio al 5 % en etanol (p/p))	0,03 %	0,06 %	0,12 %	----	----	----

Tabla 26. COMPOSICIONES ADICIONALES PARA LOS EXPERIMENTOS DE ESTABILIDAD DE ICH. TODOS LOS PORCENTAJES DESCRIBEN LA CANTIDAD EN PESO (ES DECIR, P/P)

	Cantidad de composición (p/p)				
Componente	SS-0007	SS-0008	SS-0009	SS-0010	SS-0011
Clorhidrato de minociclina	4,60 %	1,20 %	0,60 %	1,20 %	2,40 %
Hidroxipropilcelulosa	0,60 %	0,60 %	0,60 %	0,60 %	0,60 %

(continuación)

Componente	Cantidad de composición (p/p)				
	SS-0007	SS-0008	SS-0009	SS-0010	SS-0011
Cloruro de magnesio (anhidro)	4,60 %	1,20 %	----	----	----
Cloruro de magnesio (hexahidrato)	----	----	1,30 %	2,60 %	5,10 %
Etanol (anhidro)	59,00 %	75,90 %	76,30 %	74,40 %	70,70 %
Propilenglicol	30,00 %	20,00 %	20,00 %	20,00 %	20,00 %
1,8-Cineol	1,00 %	1,00 %	1,00 %	1,00 %	1,00 %
Metabisulfito de sodio	0,20 %	0,10 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %

Cada composición se preparó de acuerdo con las siguientes etapas: El etanol (anhidro), propilenglicol, el 1,8-cineol y el metabisulfito de sodio se mezclaron hasta que se dispersaron bien. Se añadieron cloruro de magnesio (anhidro) y clorhidrato de minociclina a la mezcla y se mezclaron hasta que se volvieron transparentes, o durante 15 minutos si la mezcla no se aclaraba. Se añadió lentamente hidroxipropilcelulosa (KLUCEL HF, Ashland Specialty Chemical, Wilmington DE) y se mezcló hasta que se volvió transparente. Para las composiciones para las que se aumentó el pH, es decir, las composiciones SS-0001, SS-0002 y SS-0003, se añadió hidróxido de sodio en forma de una solución de hidróxido de sodio al 5 % en etanol.

Varias de las composiciones descritas en las Tablas 25 y 26 incluyen hidróxido de sodio para aumentar el pH de la composición. Estas composiciones de pH ajustado se diseñaron para ser mejor toleradas en la piel al estar más cerca de un pH neutro. El etanol enumerado en las Tablas 25 y 26 representa la cantidad total de etanol (anhidro) y etanol de la solución en etanol de hidróxido de sodio. Se pueden usar otras bases que son seguras para su aplicación en formulaciones tópicas en lugar del hidróxido de sodio. La selección de tal base será evidente para los expertos en la técnica o puede evaluarse sin demasiada experimentación.

Las Tablas 28 y 27 describen la concentración medida de 4-epi-minociclina como una proporción del pico de minociclina activa y la concentración de minociclina activa dentro de cada composición. Las medidas se tomaron al inicio y después del envejecimiento en viales de vidrio cerrados.

Tabla 27. CONCENTRACIÓN DE MINOCICLINA ACTIVA PARA PRUEBAS DE ESTABILIDAD DE COMPOSICIONES DEL EJEMPLO 20.

Composición	Condición de almacenamiento	Concentración de minociclina activa (p/p)					
		Inicial, T= 0	T = 1 mes	T = 3 meses	T = 6 meses	T = 9 meses	T = 12 meses
SS-0001	25 °C/60 % de HR	102,56 %	96,81 %	97,40 %	97,47 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		95,60 %	96,63 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		94,45 %	92,49 %	N/A	N/A	N/A
SS-0002	25 °C/60 % de HR	106,48 %	97,63 %	99,24 %	99,91 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		98,33 %	98,79 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		97,15 %	95,37 %	N/A	N/A	N/A

(continuación)

Composición	Condición de almacenamiento	Concentración de minociclina activa (p/p)					
		Inicial, T= 0	T = 1 mes	T = 3 meses	T = 6 meses	T = 9 meses	T = 12 meses
SS-0003	25 °C/60 % de HR	104,08 %	96,40 %	99,02 %	102,47 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		96,88 %	N/A	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		N/A	98,34 %	N/A	N/A	N/A
SS-0004	25 °C/60 % de HR	96,10 %	96,14 %	99,12 %	98,92 %	98,25 %	100,31 %
	30 °C/65 % de HR		96,84 %	98,23 %	95,36 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		96,05 %	94,65 %	88,62 %	N/A	N/A
SS-0005	25 °C/60 % de HR	94,40 %	97,04 %	99,52 %	97,04 %	98,67 %	99,91 %
	30 °C/65 % de HR		97,30 %	98,04 %	95,96 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		96,45 %	95,70 %	90,47 %	N/A	N/A
SS-0006	25 °C/60 % de HR	96,90 %	93,52 %	96,65 %	93,52 %	94,07 %	96,49 %
	30 °C/65 % de HR		94,85 %	94,96 %	91,35 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		92,81 %	90,82 %	83,81 %	N/A	N/A
SS-0007	25 °C/60 % de HR	95,70 %	94,40 %	95,51 %	93,19 %	93,17 %	94,37 %
	30 °C/65 % de HR		94,20 %	94,67 %	90,96 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		93,83 %	90,42 %	79,83 %	N/A	N/A
SS-0008	25 °C/60 % de HR	98,40 %	97,19 %	99,12 %	95,95 %	96,77 %	95,79 %
	30 °C/65 % de HR		96,28 %	97,61 %	94,34 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		95,55 %	93,21 %	85,77 %	N/A	N/A
SS-0009	25 °C/60 % de HR	101,68 %	101,65 %	101,76 %	98,31 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		99,45 %	99,76 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		98,08 %	94,68 %	87,84 %	N/A	N/A

(continuación)

Composición	Condición de almacenamiento	Concentración de minociclina activa (p/p)					
		Inicial, T= 0	T = 1 mes	T = 3 meses	T = 6 meses	T = 9 meses	T = 12 meses
SS-0010	25 °C/60 % de HR	100,73 %	101,09 %	99,74 %	98,85 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		99,07 %	98,66 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		97,23 %	93,64 %	87,01 %	N/A	N/A
SS-0011	25 °C/60 % de HR	102,22 %	100,25 %	98,51 %	95,15 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		98,62 %	95,72 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		94,16 %	85,12 %	75,50 %	N/A	N/A

Tabla 28. CONCENTRACIÓN DE 4-EPI-MINOCICLINA PARA PRUEBAS DE ESTABILIDAD DE COMPOSICIONES DEL EJEMPLO 20.

Composición	Condición de almacenamiento	Concentración de 4-epi-minociclina (p/p)					
		Inicial, T= 0	T = 1 mes	T = 3 meses	T = 6 meses	T = 9 meses	T = 12 meses
SS-0001	25 °C/60 % de HR	0,64 %	1,09 %	1,66 %	2,72 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		1,31 %	1,93 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		2,53 %	5,85 %	N/A	N/A	N/A
SS-0002	25 °C/60 % de HR	0,65 %	0,88 %	1,31 %	2,32 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		1,06 %	1,89 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		2,10 %	5,05 %	N/A	N/A	N/A
SS-0003	25 °C/60 % de HR	0,67 %	0,79 %	1,05 %	1,58 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		0,91 %	N/A	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		1,57 %	2,51 %	N/A	N/A	N/A
SS-0004	25 °C/60 % de HR	0,73 %	0,84 %	1,36 %	2,07 %	3,04 %	3,93 %
	30 °C/65 % de HR		1,14 %	2,11 %	3,67 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		2,35 %	5,46 %	10,04 %	N/A	N/A

(continuación)

Composición	Condición de almacenamiento	Concentración de 4-epi-minociclina (p/p)					
		Inicial, T= 0	T = 1 mes	T = 3 meses	T = 6 meses	T = 9 meses	T = 12 meses
SS-0005	25 °C/60 % de HR	0,73 %	0,81 %	1,34 %	1,93 %	2,77 %	4,26 %
	30 °C/65 % de HR		0,99 %	1,93 %	3,61 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		1,85 %	4,98 %	9,69 %	N/A	N/A
SS-0006	25 °C/60 % de HR	0,72 %	0,95 %	1,85 %	2,91 %	3,30 %	5,20 %
	30 °C/65 % de HR		1,26 %	2,68 %	4,80 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		2,86 %	7,37 %	13,02 %	N/A	N/A
SS-0007	25 °C/60 % de HR	0,79 %	1,18 %	2,29 %	3,80 %	5,14 %	5,40 %
	30 °C/65 % de HR		1,61 %	3,58 %	5,72 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		4,13 %	8,98 %	15,95 %	N/A	N/A
SS-0008	25 °C/60 % de HR	0,77 %	0,76 %	1,85 %	2,70 %	4,67 %	5,65 %
	30 °C/65 % de HR		1,30 %	2,74 %	5,05 %	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		3,04 %	7,70 %	14,14 %	N/A	N/A
SS-0009	25 °C/60 % de HR	0,78 %	1,13 %	1,66 %	2,90 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		1,43 %	2,62 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		2,80 %	7,24 %	14,76 %	N/A	N/A
SS-0010	25 °C/60 % de HR	0,80 %	1,35 %	2,36 %	3,57 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		1,77 %	3,81 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		3,75 %	8,33 %	16,49 %	N/A	N/A
SS-0011	25 °C/60 % de HR	0,64 %	2,17 %	4,85 %	8,34 %	N/A	N/A
	30 °C/65 % de HR		3,29 %	7,34 %	N/A	N/A	N/A
	40 °C/75 % de HR		7,66 %	18,26 %	27,23 %	N/A	N/A

Las concentraciones relativas de minociclina activa para cada una de las composiciones se presentan en los gráficos mostrados en las figuras 14A, 14B y 14C para envejecimiento a 25 °C, 30 °C y 40 °C, respectivamente. Se calculó la pendiente para cada una de las líneas de mejor ajuste de mínimos cuadrados en estos gráficos para cada una de las composiciones para describir la degradación de la minociclina activa en la composición y para permitir comparaciones entre las composiciones.

Varias composiciones de este estudio contenían cloruro de magnesio anhidro mientras que otras composiciones contenían cloruro de magnesio hexahidrato. La diferencia clave entre las composiciones SS-0004 a SS-0008 y SS-0009 a SS-0011 es que el cloruro de magnesio se añadió en forma anhidra para las primeras y en forma hexahidrato para las últimas. Esto aumentó la cantidad de contenido de agua en cada composición para las últimas y permitió un método para evaluar el efecto del agua sobre la estabilidad de la composición.

Dado que el cloruro de magnesio se aumento linealmente con el contenido de minociclina activa nominal, el contenido de agua se aumentó para composiciones con concentraciones de minociclina más altas. La figura 15 muestra la cantidad de agua en cada una de las composiciones SS-0004 a SS-0011 en función del contenido nominal de minociclina activa. El contenido de agua se midió mediante la titulación de Karl Fischer. La figura 16 muestra la estabilidad de estas composiciones en función del contenido de agua y en función de la temperatura. Existe una correlación entre el aumento del contenido de agua y el aumento de la tasa de degradación, como se describe por la pendiente de la concentración relativa de minociclina activa en la concentración. Para mantener una composición estable, en las composiciones preferidas, es deseable que el contenido de agua de la composición sea inferior al 3,0 %, preferentemente inferior al 2,0 %, y más preferentemente inferior al 1,0 %.

Los valores de pH para las composiciones SS-0001 a SS-0011 variaron en un intervalo de aproximadamente 3,8 a aproximadamente 5,0. El efecto de aumentar el pH, por ejemplo, a través de la adición de una base, se puede ver comparando las composiciones SS-0001 y SS-0002 con las composiciones SS-0004 y SS-0005. SS-0001 y SS-0002 incluían hidróxido de sodio que aumentaba el pH de la composición en relación con el de las composiciones no ajustadas SS-0004 y SS-0005. La Tabla 29 muestra las pendientes calculadas para diferentes composiciones de prueba evaluadas para diferentes condiciones de envejecimiento. Comparando las tasas de degradación de la minociclina para las composiciones SS-0001 y SS-0002 con las de la composición SS-0004 y SS-0005, respectivamente, se puede determinar que la estabilidad de la composición no cambia en grandes cantidades para pequeños aumentos en pH. Mediante este método, se pueden crear composiciones con un pH en el intervalo de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0 y pueden ser deseables debido a la menor irritación de la piel. Más preferentemente, las composiciones tienen un intervalo de pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5 o de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0.

Tabla 29. PENDIENTE DE LA MEJOR LÍNEA DE AJUSTE PARA LA CONCENTRACIÓN RELATIVA DE MINOCICLINA ACTIVA EN UNIDADES DE % POR MES

	SS-0001	SS-0002	SS-0004	SS-0005
25 °C/60 % de HR	-0,32	-0,21	-0,22	-0,31
30 °C/65 % de HR	-0,56	-0,41	-0,36	-0,61
40 °C/75 % de HR	-1,82	-1,40	-1,31	-2,03
pH antes del envejecimiento	4,95	4,70	4,70	4,30

La comparación de la composición SS-0003 con SS-0007 no se realizó como parte de la evaluación del pH porque las diferentes cantidades de propilenglicol hacen que sea más difícil evaluar la causa de las diferencias en la estabilidad, aunque las tendencias observadas para estas composiciones no son incompatibles con las presentadas en este párrafo basadas en los otros dos pares de composición.

No se encontró que la estabilidad de la minociclina activa varíe significativamente para cantidades de 1,8-cineol en el intervalo del 1 % al 5 % en las composiciones. En este Ejemplo se presentaron ejemplos de dichas composiciones.

Se encontró que la estabilidad de la minociclina activa varía basándose en la cantidad de propilenglicol en la composición. Reemplazar el propilenglicol con composiciones preparadas con alcohol generalmente hace que las composiciones sean más estables. El propilenglicol es beneficioso, sin embargo, porque aumenta la solubilidad del clorhidrato de minociclina, reduce la tasa de evaporación de la composición cuando se aplica por vía tópica a la piel humana, reduce el secado cuando la composición se aplica por vía tópica a la piel humana, y promueve la penetración de minociclina en la piel. En este Ejemplo se presentaron ejemplos de composiciones con cantidades variables de propilenglicol.

EJEMPLO 21

ESTUDIO DE ESTABILIDAD CON FÁRMACOS DE LA CLASE DE LAS TETRACICLINAS

Se evaluó el efecto de la selección del fármaco de la clase de las tetraciclinas sobre la estabilidad de la potencia del fármaco y la formación de epímeros para composiciones ilustrativas. Las composiciones se evaluaron al inicio y después del almacenamiento en la oscuridad a 40 °C dentro de viales de vidrio sellados. Para cada uno de estos estudios, se hicieron esfuerzos para minimizar (en la medida de lo posible en un entorno de laboratorio típico) la cantidad de espacio vacío en el vial sobre cada composición para reducir la interacción entre la composición y cualquier vapor de agua en el aire.

En cuanto a la minociclina en muchos de los demás Ejemplos en el presente documento, la estabilidad de la potencia del fármaco para la tetraciclina se cuantificó evaluando el cambio en la concentración relativa de tetraciclina activa, que se calculó como el pico de tetraciclina activa dividido por la suma de las áreas picos de todos los picos observados en el cromatógrafo HPLC. Para la medición de la cantidad de minociclina y tetraciclina, el método de HPLC que se utilizó detectó casi todos los componentes de degradación y, por lo tanto, la medición relativa del fármaco activo se consideró un método más fiable y más representativo para detectar la cantidad de fármaco activo en la composición que la medición real del pico del fármaco en relación con el pico de un estándar. Las mediciones repetidas han confirmado esta evaluación del método. Para la doxiciclina, el método de HPLC no detectó la mayoría de los picos para los componentes de doxiciclina degradados. Así pues, para la doxiciclina, la cantidad de doxiciclina activa se calculó en relación con la medición de un estándar de doxiciclina, en lugar de con respecto al área pico total.

Se usó el método de HPLC descrito en el Ejemplo 21 para la medición de tetraciclina y doxiciclina, pero con un caudal de 0,8 ml/min en lugar de 1,0 ml/min.

Los componentes de las composiciones evaluadas en el estudio descrito en este Ejemplo se enumeran en las Tablas 30 y 31.

Tabla 30. COMPOSICIONES PARA EXPERIMENTOS DE ESTABILIDAD CON TETRACICLINA. TODOS LOS PORCENTAJES DESCRIBEN LA CANTIDAD EN PESO (ES DECIR, P/P)

Componente	Cantidad de composición (p/p)					
	1.0-Tet	1.0-Tet-NSMBS	1.0-Tet-NSMBS-NMg	1.0-Tet-a	1.0-Tet-NSMBS-a	1.0-Tet-NSMBS-NMg-a
Clorhidrato de tetraciclina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)	1,0 %	1,0 %	1,0 %	0,97 %	0,97 %	0,97 %
Hidroxipropilcelulosa	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,58 %	0,58 %	0,58 %
Cloruro de magnesio (anhidro)	1,20 %	1,20 %		1,17 %	1,17 %	
Etanol (anhidro)	76,00 %	76,20 %	77,40 %	76,58 %	76,78 %	77,94 %
Propilenglicol	20,00 %	20,00 %	20,00 %	19,42 %	19,42 %	19,42 %
1,8-Cineol	1,00 %	1,00 %	1,00 %	0,97 %	0,97 %	0,97 %
Metabisulfito de sodio	0,20 %			0,19 %		
Hidróxido de sodio (administrado como parte de una solución de hidróxido de sodio al 5 % en etanol (p/p))				0,11 %	0,11 %	0,11 %

Las composiciones 1.0-Tet-NSMBS-NMg y 1.0-Tet-NSMBS-NMg-a son composiciones de referencia.

Tabla 31. COMPOSICIONES PARA EXPERIMENTOS DE ESTABILIDAD CON DOXICICLINA. TODOS LOS PORCENTAJES DESCRIBEN LA CANTIDAD EN PESO (ES DECIR, P/P)

Componente	Cantidad de composición (p/p)					
	1.0-Doxy	1.0-Doxy-NSMBS	1.0-Doxy-NSMBS-NMg	1.0-Doxy-a	1.0-Doxy-NSMBS-a	1.0-Doxy-NSMBS-NMg-a
Hiclato de doxiciclina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)	1,2 %	1,2 %	1,2 %	1,16 %	1,16 %	1,16 %

(continuación)

Componente	Cantidad de composición (p/p)					
	1.0-Doxy	1.0-Doxy-NSMBS	1.0-Doxy-NSMBS-NMg	1.0-Doxy-a	1.0-Doxy-NSMBS-a	1.0-Doxy-NSMBS-NMg-a
Hidroxipropilcelulosa	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,58 %	0,58 %	0,58 %
Cloruro de magnesio (anhidro)	1,20 %	1,20 %		1,16 %	1,16 %	
Etanol (anhidro)	75,80 %	76,00 %	77,20 %	76,45 %	76,64 %	77,81 %
Propilenglicol	20,00 %	20,00 %	20,00 %	19,36 %	19,36 %	19,36 %
1,8-Cineol	1,00 %	1,00 %	1,00 %	0,97 %	0,97 %	0,97 %
Metabisulfito de sodio	0,20 %			0,19 %		
Hidróxido de sodio (administrado como parte de una solución de hidróxido de sodio al 5 % en etanol (p/p))				0,12 %	0,12 %	0,12 %

Las composiciones 1.0-Doxy-NSMBS-NMg y 1.0-Doxy-NSMBS-NMg-a son composiciones de referencia.

- 5 Cada composición se preparó de acuerdo con las siguientes etapas: El etanol (anhidro), propilenglicol, el 1,8-cineol y el metabisulfito de sodio se mezclaron hasta que se dispersaron bien. Se añadieron cloruro de magnesio (anhidro) y clorhidrato de tetraciclina o hclato de doxiciclina a la mezcla y se mezclaron hasta que se volvieron transparentes, o durante 15 minutos si la mezcla no se aclaraba. Se añadió lentamente hidroxipropilcelulosa (KLUCEL HF, Ashland Specialty Chemical, Wilmington DE) y se mezcló hasta que se volvió transparente. Para las composiciones para las
- 10 que se aumentó el pH, es decir, las composiciones designadas por "-a" al final del identificador de la composición, se añadió hidróxido de sodio en forma de una solución de hidróxido de sodio al 5 % en etanol.

- 15 Varias de las composiciones descritas en las Tablas 30 y 31 incluyen hidróxido de sodio para aumentar el pH de la composición. Estas composiciones de pH ajustado se diseñaron para ser mejor toleradas en la piel al estar más cerca de un pH neutro. El etanol enumerado en las Tablas 30 y 31 representa la cantidad total de etanol (anhidro) y etanol de la solución en etanol de hidróxido de sodio. Se pueden usar otras bases que son seguras para su aplicación en formulaciones tópicas en lugar del hidróxido de sodio. La selección de tal base será evidente para los expertos en la técnica o puede evaluarse sin demasiada experimentación.

- 20 La Tabla 32 describe la concentración relativa medida de tetraciclina activa dentro de cada composición que contiene tetraciclina. Las medidas se tomaron al inicio del estudio y después de envejecer a 40 °C en viales de vidrio cerrados. Los datos de la Tabla 32 demuestran que la estabilidad de la tetraciclina se degradó por la inclusión de cloruro de magnesio en la composición o por la inclusión de cloruro de magnesio y SMBS en la composición. La estabilidad se redujo tanto para la composición tamponada con pH como para la composición sin tampón. Para la
- 25 mayoría de aplicaciones, estas composiciones no son suficientemente estables para el despliegue comercial sin refrigeración. Dichas composiciones son suficientemente estables para algunas aplicaciones con condiciones de almacenamiento apropiadas, tales como manteniendo la composición a una temperatura de 5 °C ± 3 °C.

Tabla 32. CONCENTRACIONES RELATIVAS DE TETRACICLINA ACTIVA PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO A 40 °C

Número de composición (véase la Tabla 30)	pH	Concentración de tetraciclina activa relativa inicial (%)	Concentración de tetraciclina activa relativa después de 7 días a 40 °C (%)	Cambio de color significativo después de 7 días a 40 °C en viales de vidrio cerrados
1.0-Tet	3,3	82,51 %	1,95 %	No
1.0-Tet-NSMBS	3,1	67,86 %	4,30 %	No
1.0-Tet-NSMBS-NMg	3,2	98,10 %	88,22 %	Sí (ligero)
1.0-Tet-a	5,4	80,74 %	4,46 %	No

(continuación)

Número de composición (véase la Tabla 30)	pH	Concentración de tetraciclina activa relativa inicial (%)	Concentración de tetraciclina activa relativa después de 7 días a 40 °C (%)	Cambio de color significativo después de 7 días a 40 °C en viales de vidrio cerrados
1.0-Tet-NSMBS-a	4,5	66,15 %	1,78 %	No
1.0-Tet-NSMBS-NMg-a	6,5	96,17 %	22,67 %	Sí

Tabla 33. CONCENTRACIONES DE DOXICICLINA ACTIVA PARA EL ESTUDIO DEL ENVEJECIMIENTO A 40 °C

Número de composición (véase la Tabla 31)	pH	Concentración de doxiciclina activa inicial (%)	Concentración activa de doxiciclina después de 7 días a 40 °C (%)	Cambio de color significativo después de 7 días a 40 °C en viales de vidrio cerrados
1.0-Doxy	3,1	97,0 %	92,7 %	No
1.0-Doxy-NSMBS	2,9	95,8 %	88,6 %	No
1.0-Doxy-NSMBS-NMg	3,0	94,5 %	88,7 %	Sí (ligero)
1.0-Doxy-a	4,8	97,1 %	93,8 %	No
1.0-Doxy-NSMBS-a	4,5	96,6 %	90,4 %	No
1.0-Doxy-NSMBS-NMg-a	6,4	96,3 %	24,4 %	Sí

- 5 La Tabla 33 describe la concentración medida de doxiciclina activa dentro de cada composición que contiene doxiciclina. Las medidas se tomaron al inicio y después de envejecer a 40 °C en viales de vidrio cerrados durante 7 y 21 días. Estos datos demuestran que la estabilidad de la doxiciclina se mejoró por la inclusión de cloruro de magnesio en la composición o por la inclusión de cloruro de magnesio y SMBS en la composición. Si se desea una composición tamponada con pH, los datos muestran que la inclusión de cloruro de magnesio fue más beneficiosa para la composición tamponada que para la composición no tamponada. En algunas aplicaciones, la doxiciclina puede ser suficientemente estable en una o más de estas composiciones para ser útil para el tratamiento de las afecciones dermatológicas descritas en el presente documento, incluso sin refrigeración.

- 10 Las figuras 13A y 13B muestran el color de cada una de las composiciones en las Tablas 30 y 31 antes (figura 13A) y después (figura 13B) del envejecimiento a 40 °C en viales de vidrio cerrados durante 7 días. Se produjeron cambios de color durante el periodo de envejecimiento de 7 días para varias de las composiciones como se describe en las Tablas 32 y 33.

- 15 Basándose en los datos de este Ejemplo y los otros Ejemplos en el presente documento, la minociclina y la doxiciclina son formas preferidas de fármacos de la clase de las tetraciclinas para su uso en las composiciones descritas en el presente documento debido a su estabilidad superior en comparación con la tetraciclina. Se pueden evaluar otros fármacos de la clase de las tetraciclinas en las composiciones descritas en el presente documento para evaluar la idoneidad de su estabilidad para una aplicación particular de una composición tópica.

25 EJEMPLO 22

PENETRACIÓN EN PIEL HUMANA *EX VIVO*: UNA COMPARACIÓN DE TRES FÁRMACOS DE LA CLASE DE LAS TETRACICLINAS

- 30 Se realizaron experimentos de penetración con tejido cutáneo *ex vivo* para determinar la eficacia de penetración de tres fármacos de la clase de las tetraciclinas activa en la piel cuando se incluyeron en composiciones que comprendían una fuente de magnesio, un alcohol alifático monohídrico y un poliol y se aplica a la superficie de la piel. Se evaluó la penetración en la piel abdominal para tres donantes humanos diferentes con tres muestras para cada donante para cada fármaco en el estudio para un total de nueve mediciones por composición. Los fármacos de la clase de las tetraciclinas ensayados incluyeron tetraciclina, minociclina y doxiciclina. Las composiciones evaluadas como parte de este estudio se describen en la Tabla 34.

Tabla 34. COMPOSICIONES PARA EL EXPERIMENTO DE PENETRACIÓN CUTÁNEA

Componente	Cantidad de composición (p/p)		
	Tetra-1	Doxy-1	Mino-1
Clorhidrato de tetraciclina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)	2,38 %	-----	-----
Hiclato de doxiciclina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)	-----	4,00 %	-----
Clorhidrato de minociclina (Euticals S.P.A, Origgio, Italia)	-----	-----	4,60 %
Hidroxipropilcelulosa	0,68 %	0,67 %	0,6 %
Cloruro de magnesio (anhidro) (Magnesium Products, Tulsa, OK)	4,74 %	4,66 %	4,60 %
Etanol (anhidro)	60,21 %	59,21 %	59,00 %
Propilenglicol	30,44 %	29,94 %	30,0 %
1,8-Cineol	1,35 %	1,33 %	1,00 %
Metabisulfito de sodio	0,20 %	0,20 %	0,20 %

- 5 Las composiciones se aplicaron a muestras de piel de tres donantes humanos a una dosis de aproximadamente 12 mg/cm². El tejido se mantuvo en un ambiente húmedo para limitar el secado del tejido y se incubó a 32 °C durante 3 horas. Al final del periodo de incubación, se limpió el exceso de composición de la superficie usando primero un apósito seco, en segundo lugar un apósito empapado con alcohol isopropílico al 70 % y finalmente con un apósito seco. Se realizó una retirada con cinta para eliminar las capas superiores del estrato córneo. Se tomó una biopsia por punción de seis (6) milímetros del interior del área de prueba. El fármaco de la clase de las tetraciclinas se extrajo de cada biopsia usando metanol acidificado. Los sobrenadantes se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

- 15 Los resultados de este estudio demostraron que la eficacia de penetración de la doxiciclina, minociclina y tetraciclina era suficiente para superar la concentración inhibitoria mínima para cada uno de estos fármacos activos y, por lo tanto, sería útil para matar bacterias en o dentro de la piel, tales como *P. acnes*. La doxiciclina y la minociclina demostraron una mayor eficacia de penetración que la tetraciclina. Por este motivo, se prefieren la doxiciclina y/o la minociclina a la tetraciclina para algunas aplicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición tópica que comprende un fármaco de la clase de las tetraciclinas, una sal de magnesio, un alcohol alifático monohídrico y un poliol que tiene de 3-8 átomos de carbono,
 5 en la que (i) la relación entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol está en un intervalo de 1:1 a 99:1 en peso, y (ii) el fármaco de la clase de las tetraciclinas está disuelto en la composición tópica; en donde la composición no es acuosa y tiene menos del 5 % en peso de contenido de agua.
2. La composición tópica de la reivindicación 1, en la que:
 10 (i) la relación molar de la sal de magnesio con respecto al fármaco de tetraciclina está en un intervalo de 2:1 a 100:1; y/o
 (ii) la sal de magnesio es cloruro de magnesio, o es una sal de magnesio que tiene un contraión que es más blando que el cloruro.
3. La composición tópica de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en la que:
 15 (i) el alcohol alifático monohídrico se selecciona del grupo que consiste en etanol, isopropanol, alcohol propílico, alcohol *terc*-butílico, y combinaciones de los mismos; y/o
 20 (ii) el alcohol alifático monohídrico es volátil; y/o
 (iii) el poliol es un diol o un triol C3-C8; y/o
 (iv) el poliol es propilenglicol.
4. La composición tópica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un antioxidante.
5. La composición tópica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además un agente
 25 espesante, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa.
6. La composición tópica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que:
 30 (i) la composición tópica no comprende una emulsión; y/o
 (ii) la composición tópica no comprende nanopartículas ni micropartículas; y/o
 (iii) la composición tópica es anhidra; y/o
 35 (iv) el poliol no es glicerol ni glicerina; y/o
 (v) la composición tópica tiene un pH eficaz de 3-6 cuando se mezcla con agua en una relación de 1:9 en peso.
7. La composición tópica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que tiene una viscosidad en un intervalo de 75 a 10.000 mPa·s (centipoise) a 25 °C; y/o en donde la composición es hidrófila.
8. La composición tópica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que:
 40 (i) la eficacia de penetración en la piel facial humana *ex vivo* multiplicada por la concentración del fármaco de las clases de las minociclinas o de las tetraciclinas, respectivamente, en la composición tópica excede la concentración inhibitoria mínima (MIC) del fármaco para una bacteria diana en un tejido diana o un fluido corporal
 45 diana, por ejemplo, en donde la bacteria diana es *P. acnes*;
 (ii) la eficacia de penetración en la piel facial humana *ex vivo* es igual o superior al 5 %, por ejemplo, en donde la eficacia de penetración en la piel facial humana *ex vivo* está en el intervalo del 5 % al 25 %; o
 50 (iii) la composición va acompañada de instrucciones para su uso tópico para el tratamiento de una afección dermatológica o una enfermedad de la piel, opcionalmente en donde la afección dermatológica de la piel es acné, impétigo o rosácea, por ejemplo, en donde el acné es acné común, tal como en donde dichas instrucciones comprenden instrucciones para aplicar la composición a una superficie externa de la piel de una a tres veces al día durante un periodo de aproximadamente 2 semanas a al menos aproximadamente 6 semanas o hasta que se observe una mejora visible en la afección o la enfermedad dermatológica.
9. La composición tópica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la relación molar de la sal de magnesio con respecto al fármaco de la clase de las tetraciclinas es de al menos 3:1; y/o en donde la relación del peso de la sal de magnesio con respecto al peso del fármaco de la clase de las tetraciclinas está en el intervalo de 1:3 a 3:1.
10. La composición tópica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el fármaco de la clase de las tetraciclinas es minociclina, opcionalmente en la que, tras el almacenamiento de la composición en un recipiente sellado durante 12 meses a 25 °C y al 60 % de humedad relativa, la composición contiene menos del 7 % de producto de degradación de minociclina, donde el producto de degradación es 4-epi-minociclina.
11. La composición tópica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el fármaco de la clase de las tetraciclinas es minociclina y la composición comprende de aproximadamente el 50 % en peso a aproximadamente

el 95 % en peso de alcohol alifático monohídrico, de aproximadamente el 5 % en peso a aproximadamente el 40 % en peso del poliol, desde aproximadamente el 0,1 % en peso a aproximadamente el 10 % en peso de minociclina, y de aproximadamente el 0,2 % en peso a aproximadamente el 15 % en peso de la sal de magnesio.

- 5 12. Una composición tópica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un método para tratar una afección o una enfermedad dermatológica que comprende las etapas de aplicar la composición tópica a una superficie epitelial exterior del cuerpo de un mamífero al menos una vez al día durante periodo de al menos 1 semana.
- 10 13. La composición tópica para su uso en el método de la reivindicación 12, en donde dicha aplicación comprende aplicar la composición tópica durante un periodo de al menos 1 mes, por ejemplo, en donde la afección o la enfermedad dermatológica son acné o rosácea y la etapa de aplicación comprende aplicar la composición tópica a la piel una o dos veces al día durante un periodo de 6 a 52 semanas.
- 15 14. Un método para preparar una composición tópica de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el método (i) combinar un fármaco de la clase de las tetraciclinas, una sal de magnesio, un alcohol alifático monohídrico volátil y un poliol que tiene de 3-8 átomos de carbono para formar un mezcla, en donde la relación entre el alcohol alifático monohídrico y el poliol está en un intervalo de 1:1 a 99:1 en peso, y (ii) agitar la mezcla de (i) para formar una solución no acuosa que tenga menos del 5 % en peso de agua en la que se disuelve el fármaco de la clase de las tetraciclinas.
- 20 15. El método de la reivindicación 14, en el que el fármaco de la clase de las tetraciclinas es minociclina.

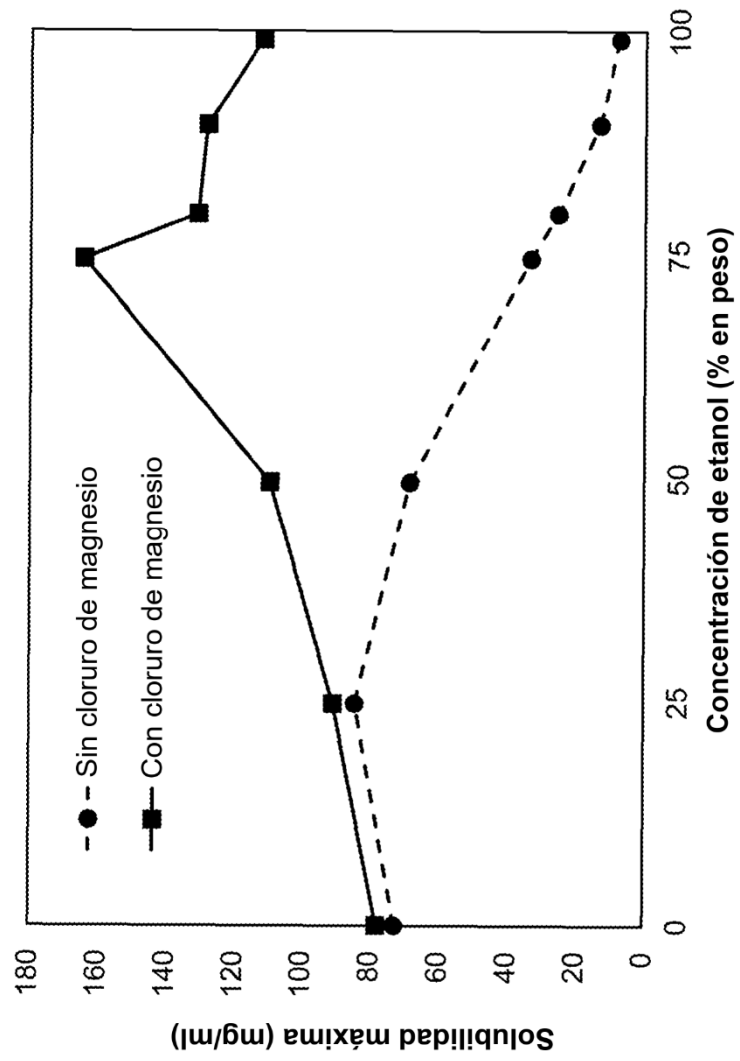


FIG 1A

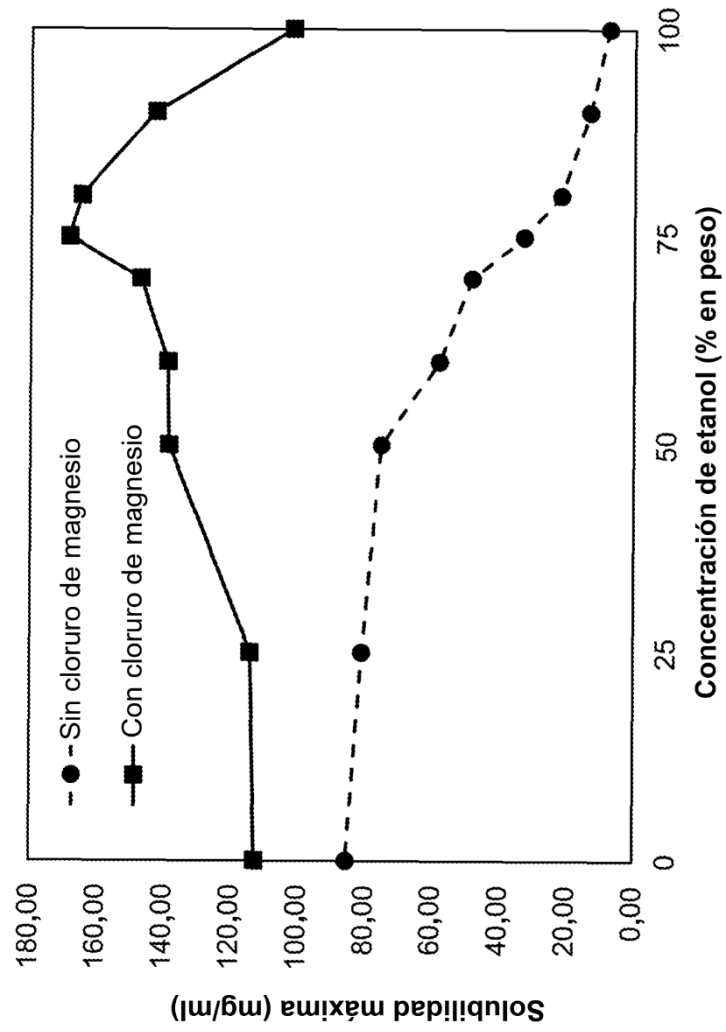


FIG 1B

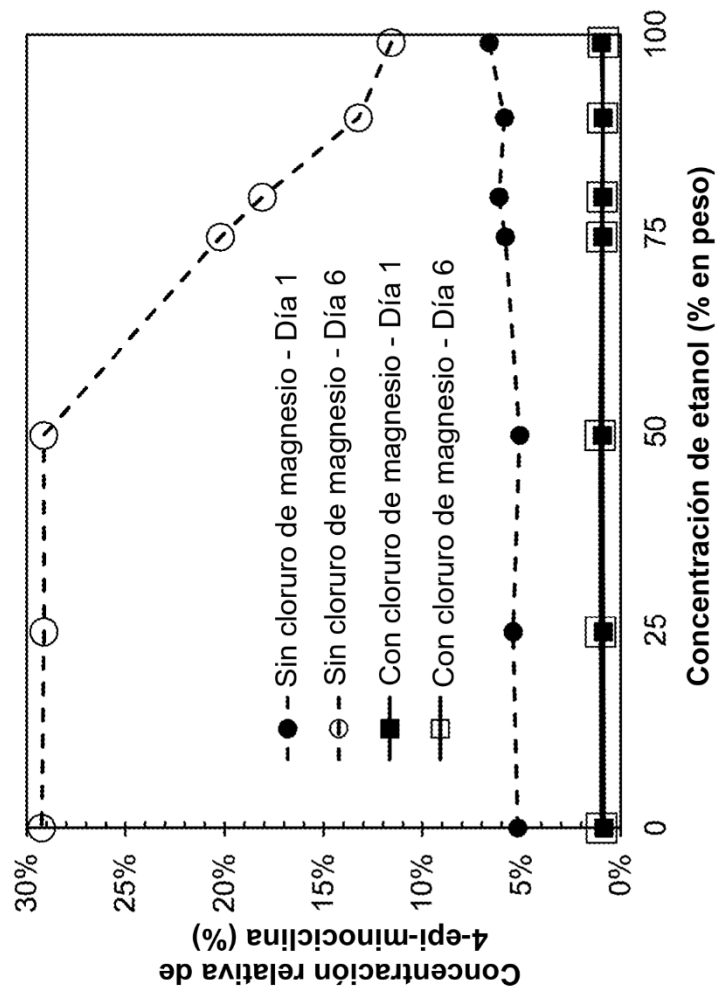
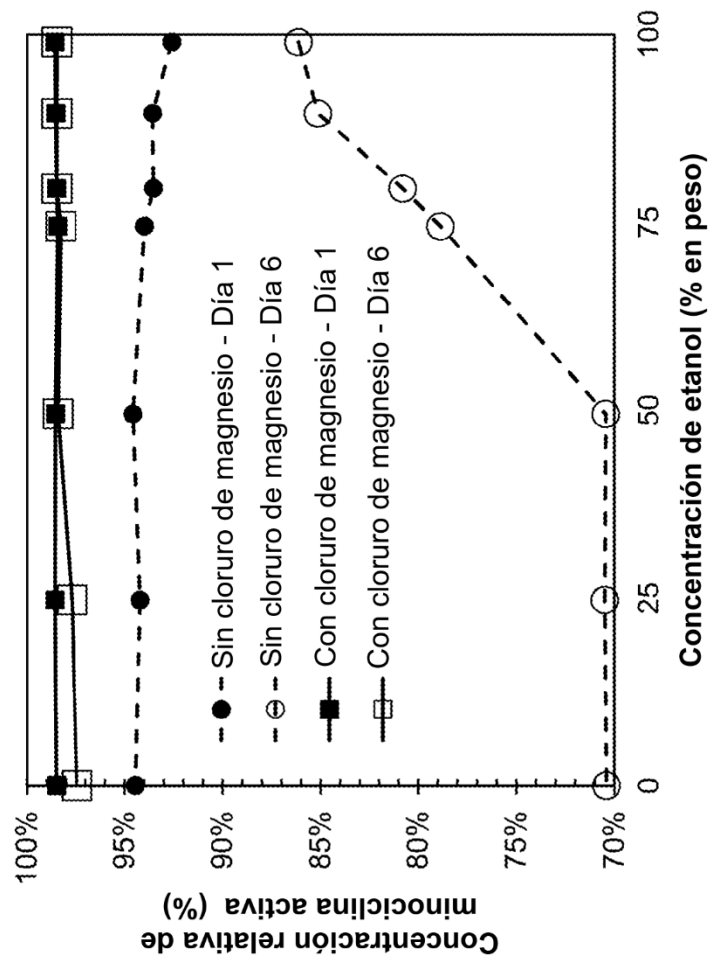


FIG 2A

**FIG 2B**

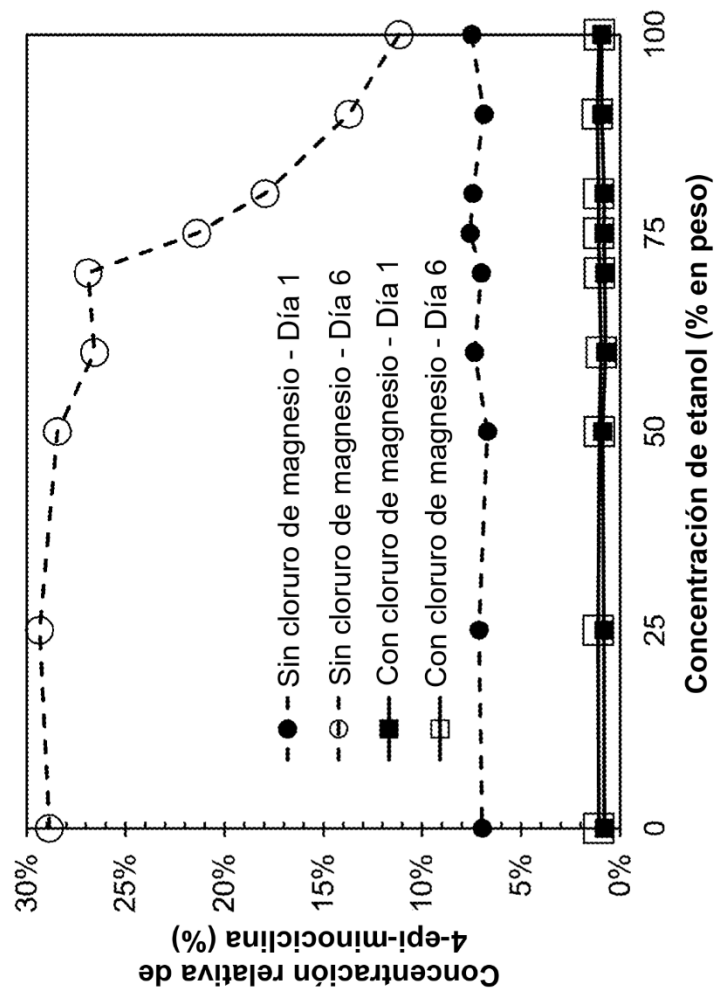


FIG 2C

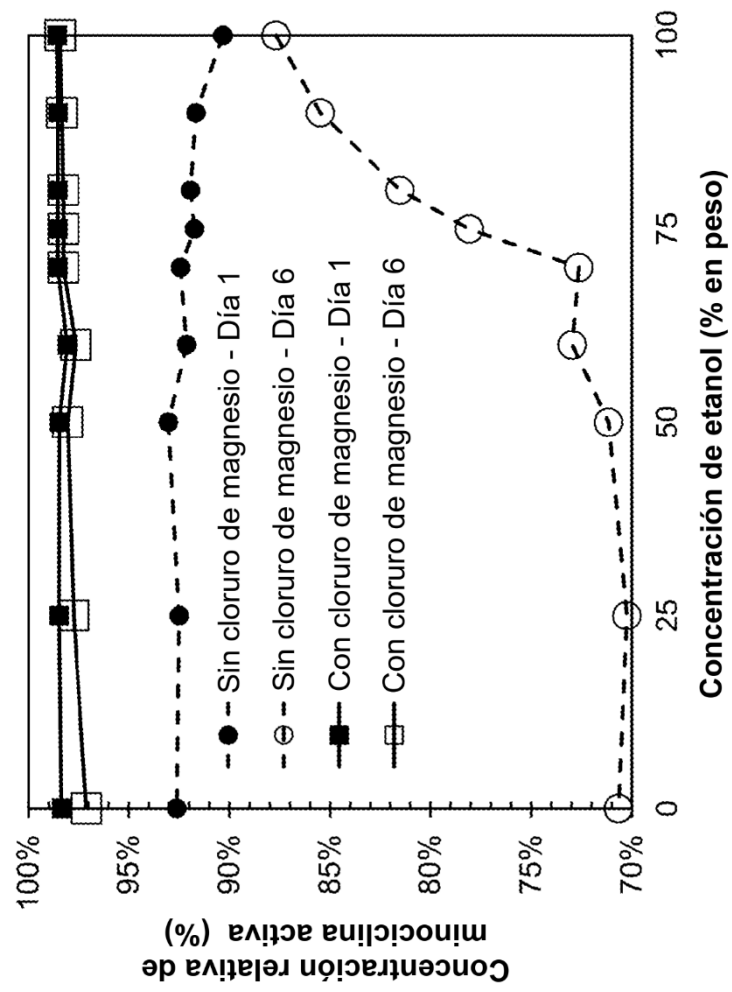


FIG 2D

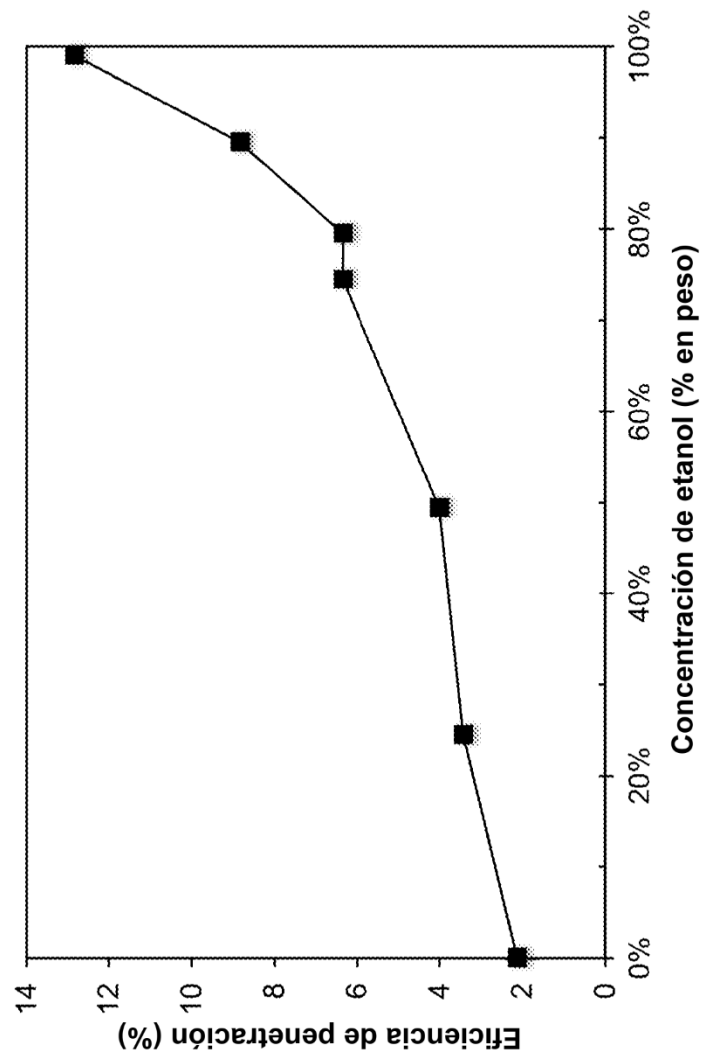


FIG 3

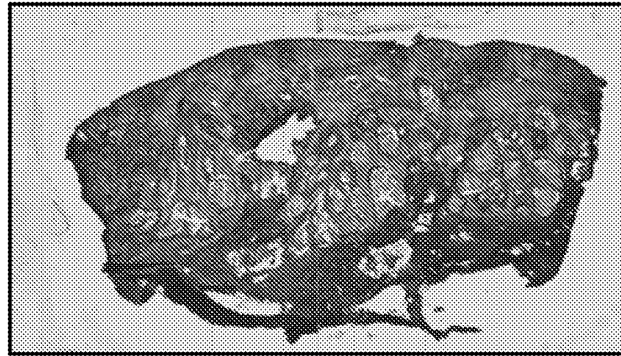


FIG 4A

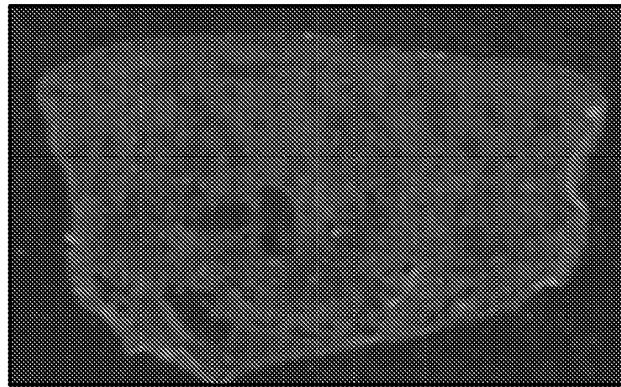


FIG 4B

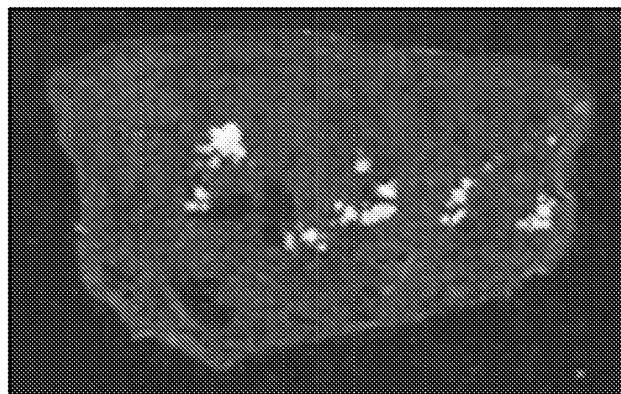


FIG 4C

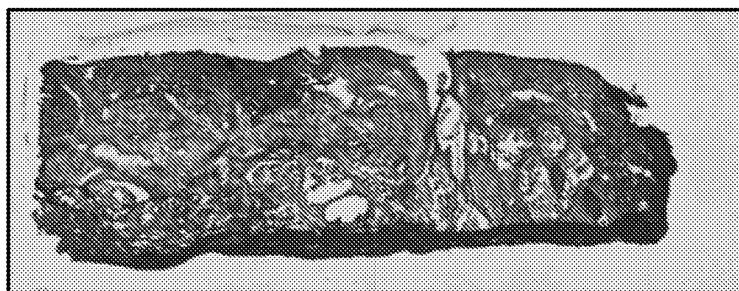


FIG 5A



FIG 5B



FIG 5C

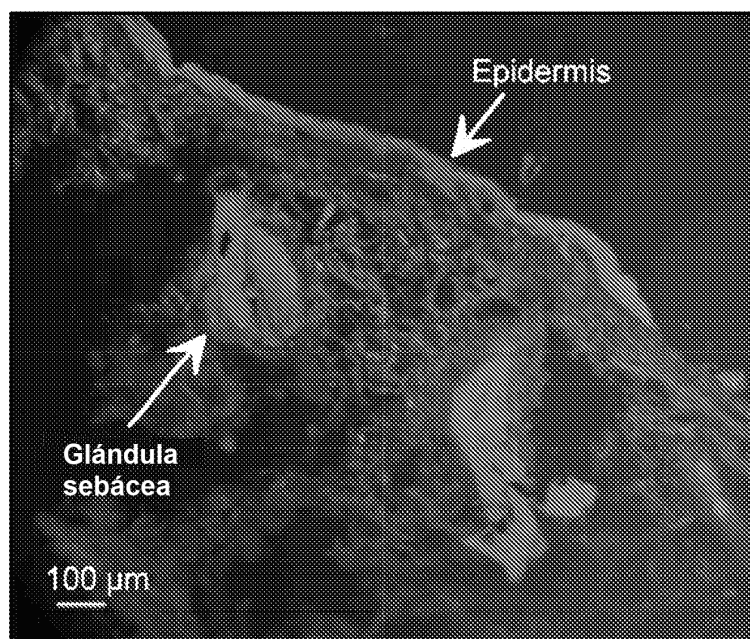


FIG 6

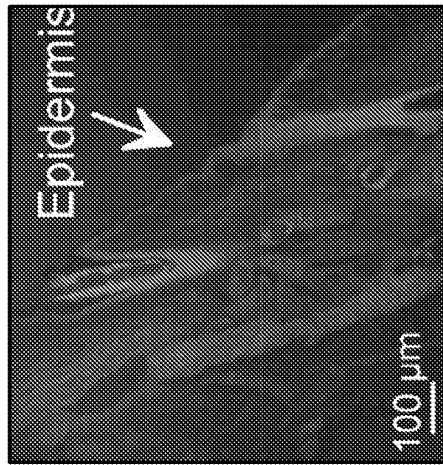


FIG 7C

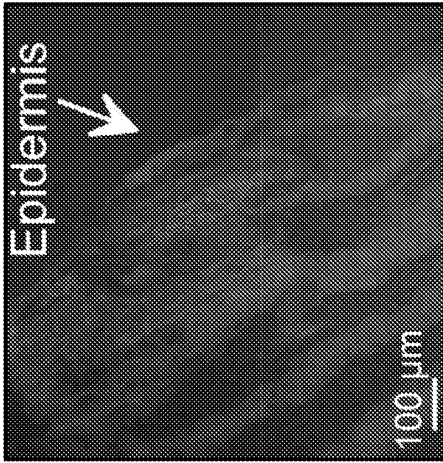


FIG 7B

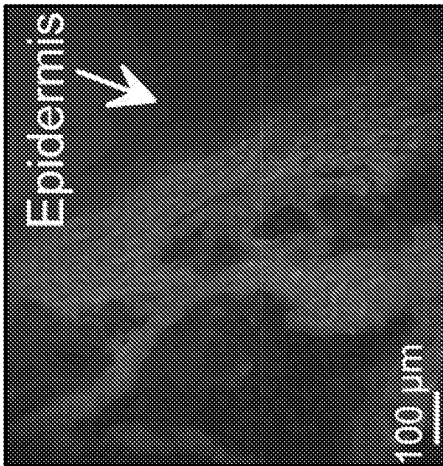
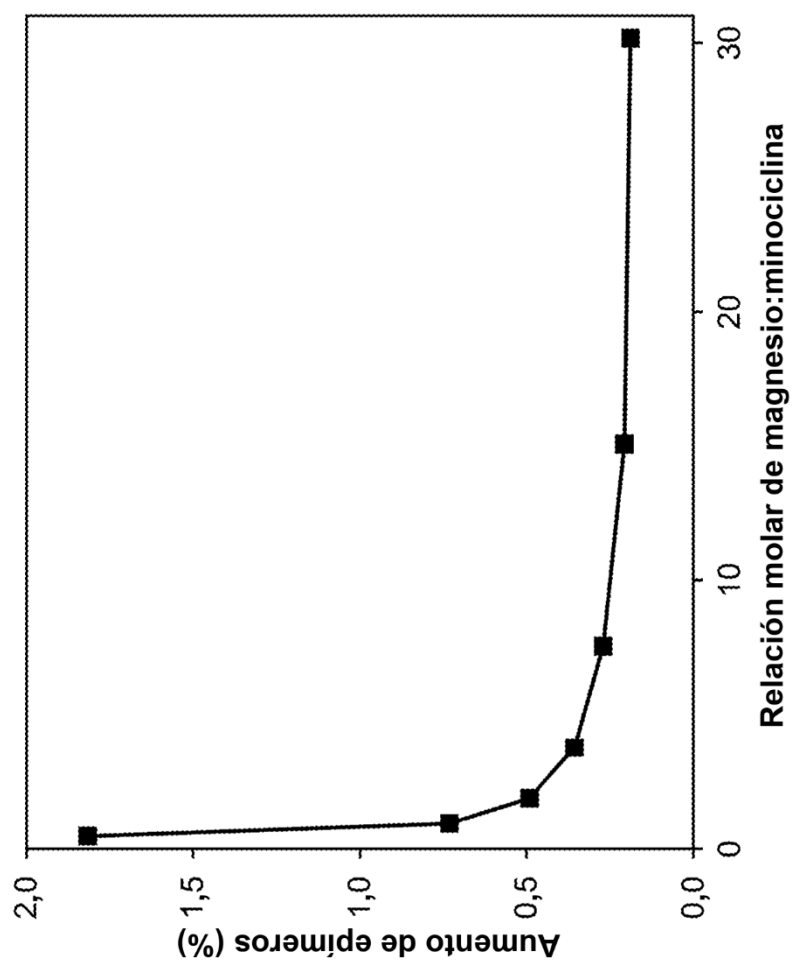


FIG 7A

**FIG 8A**

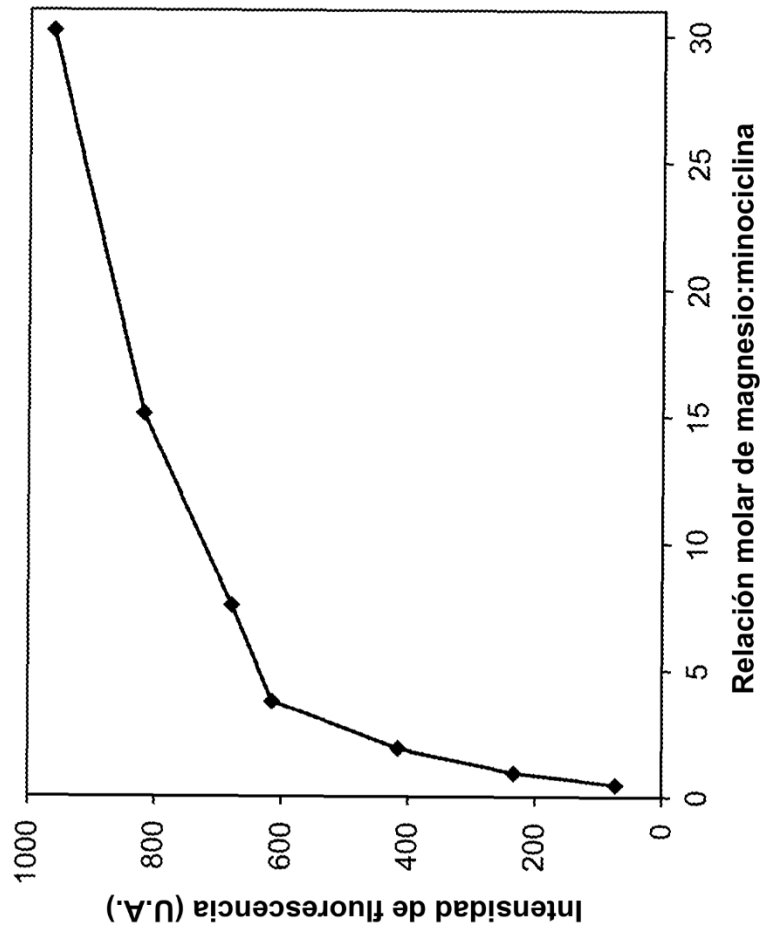
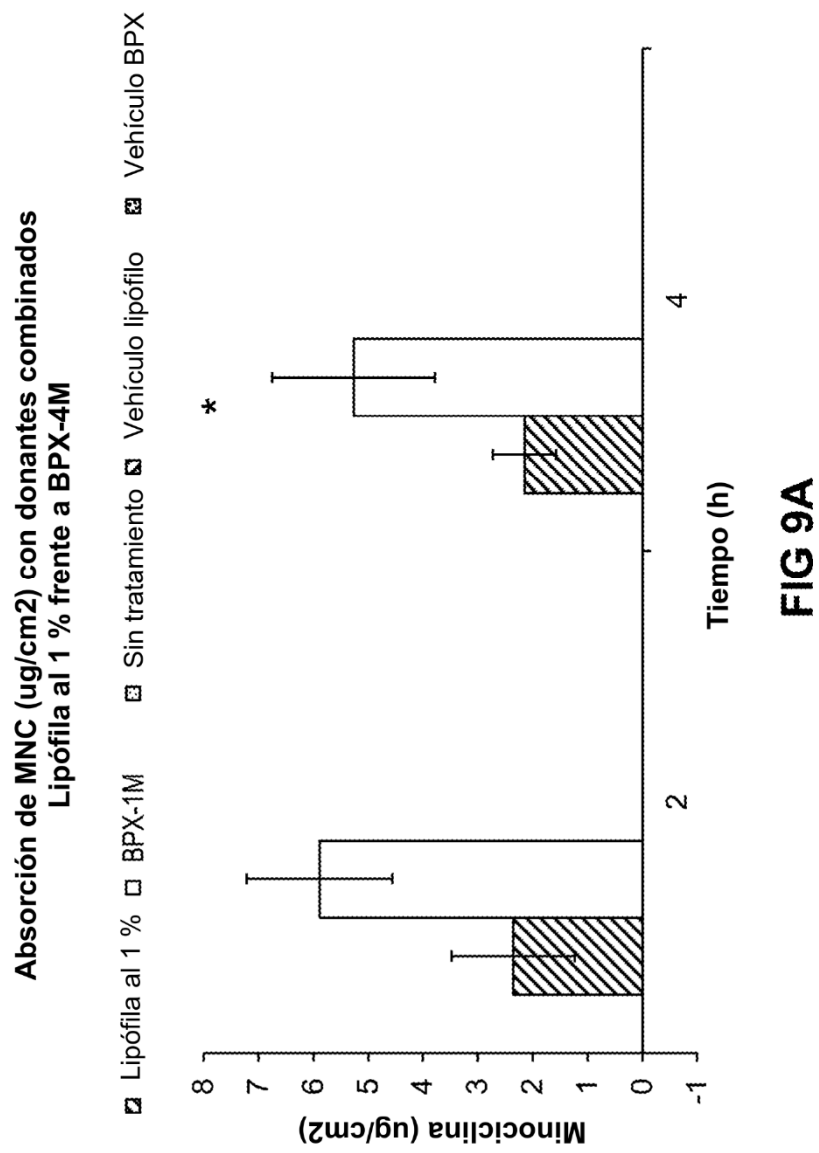
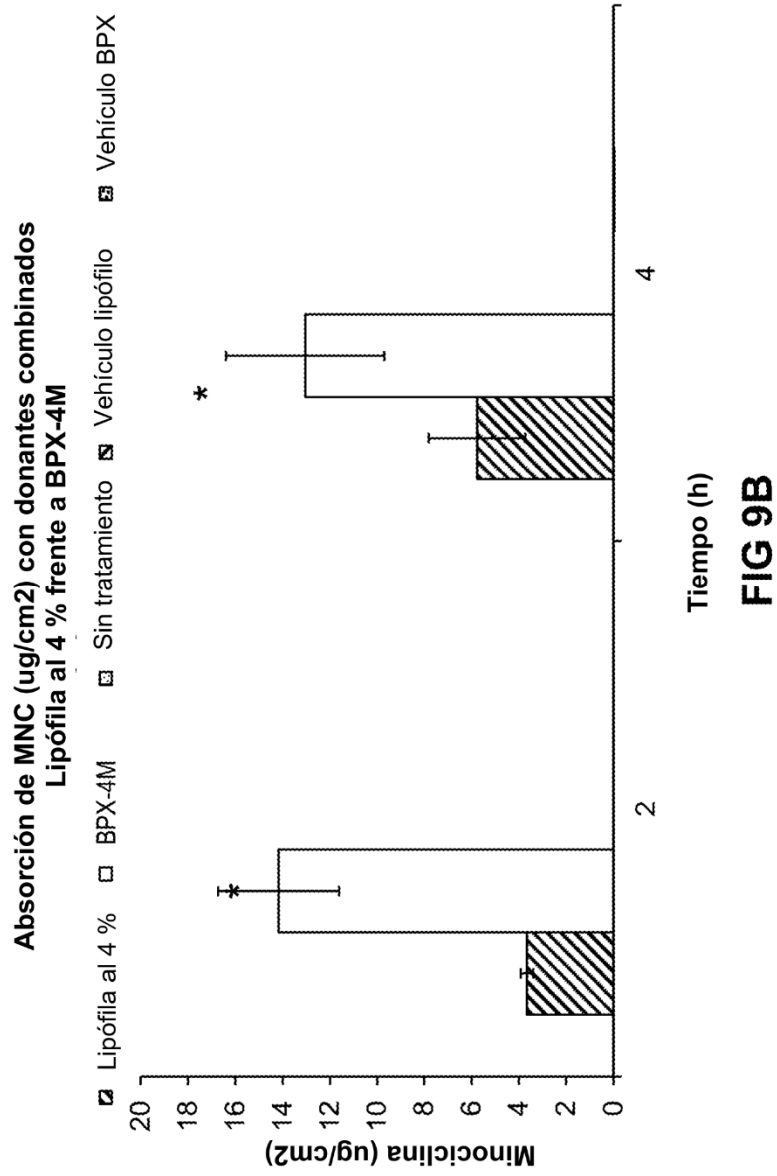


FIG 8B





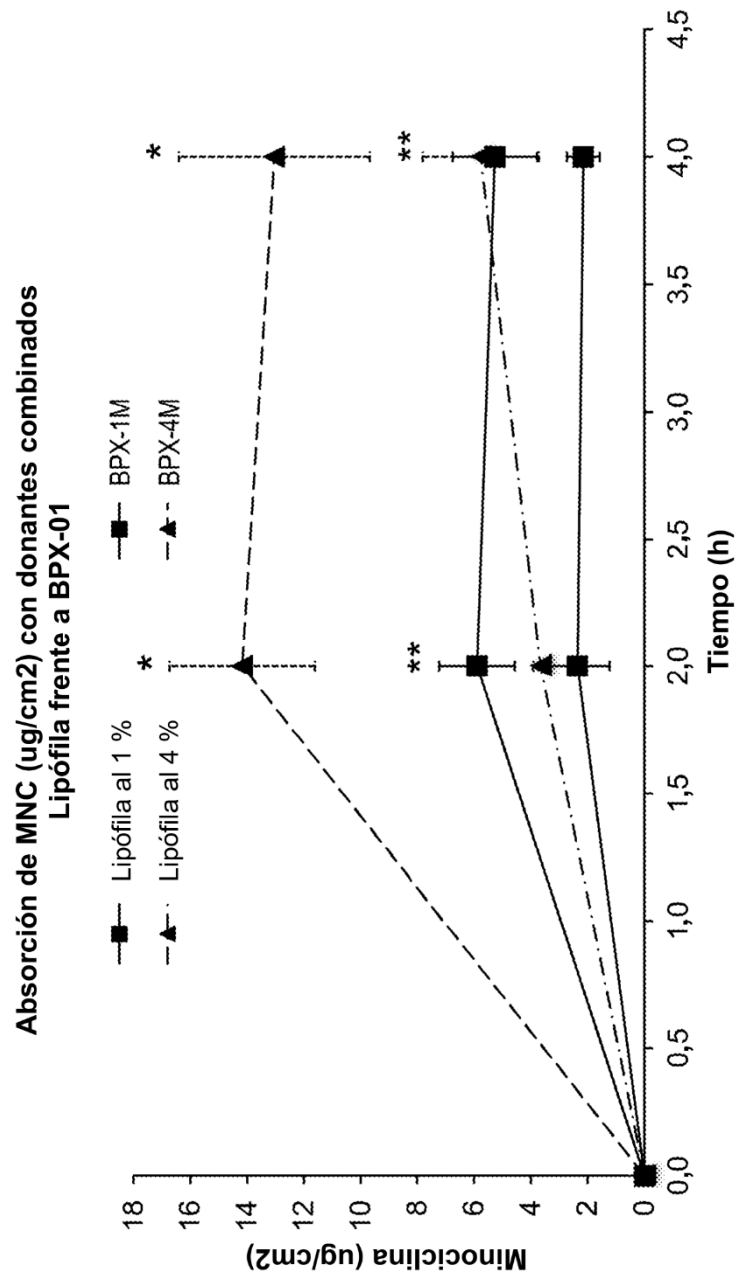


FIG 10

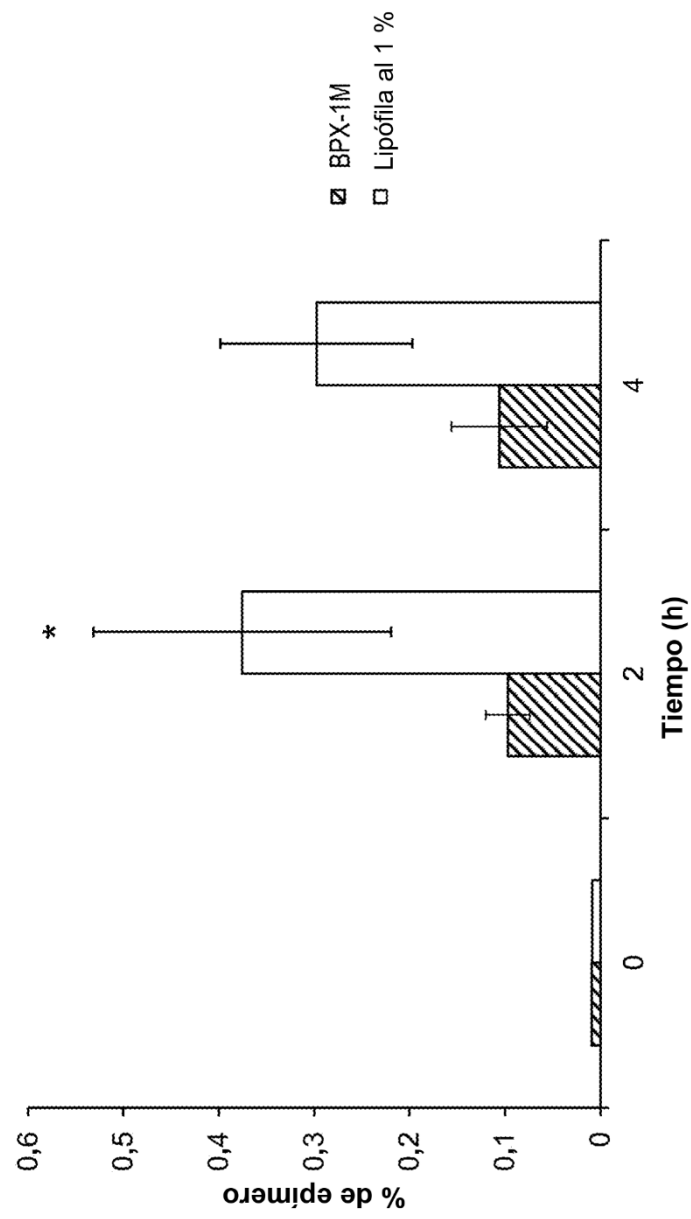


FIG 11A

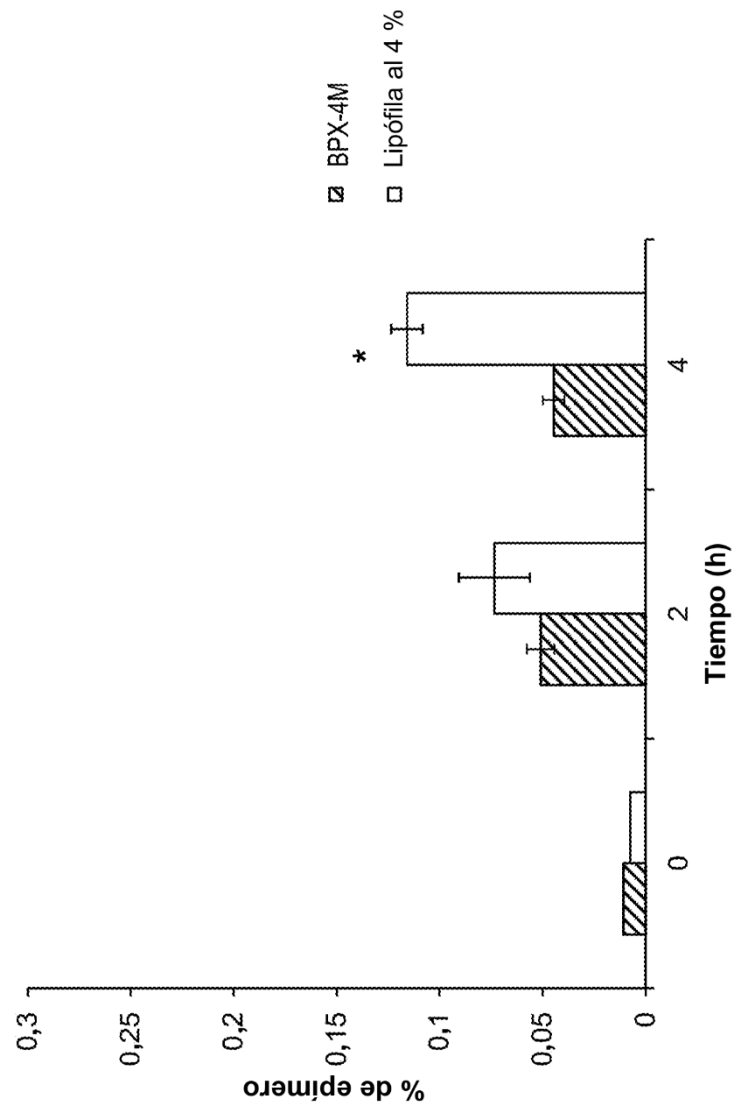


FIG 11B

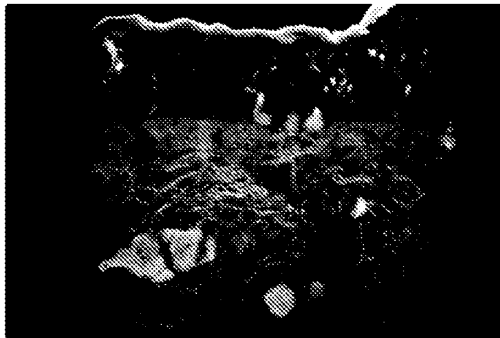


FIG 12A

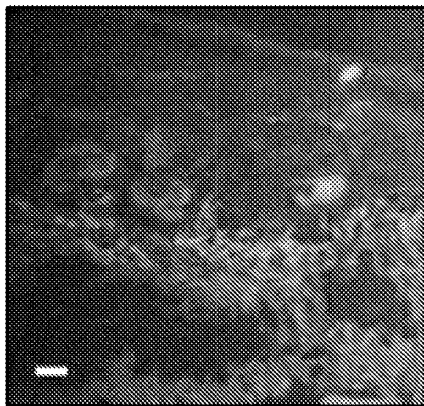


FIG 12B

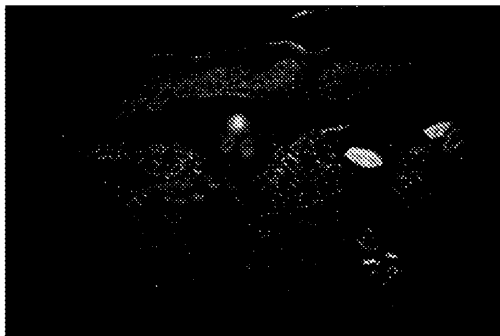


FIG 12C

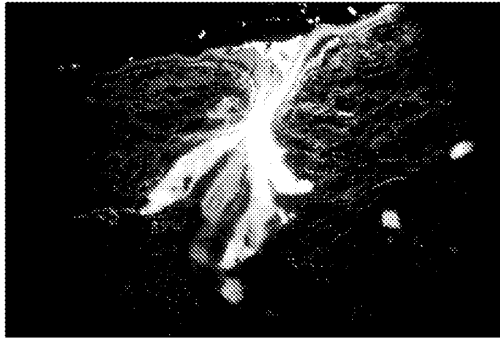


FIG 12D

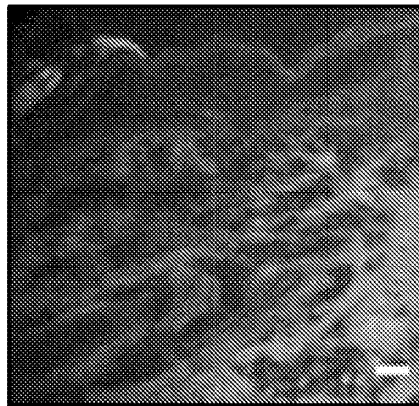
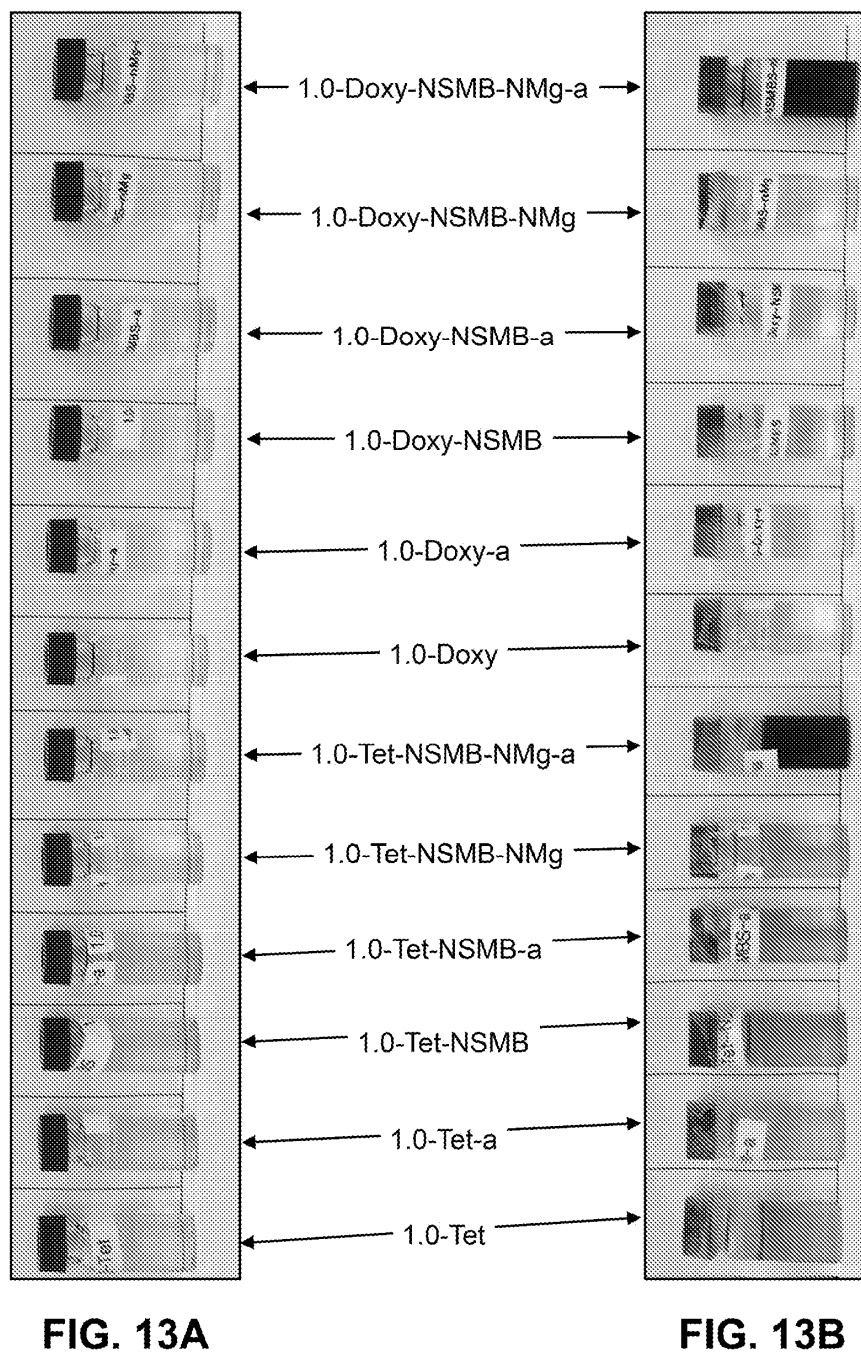


FIG 12E



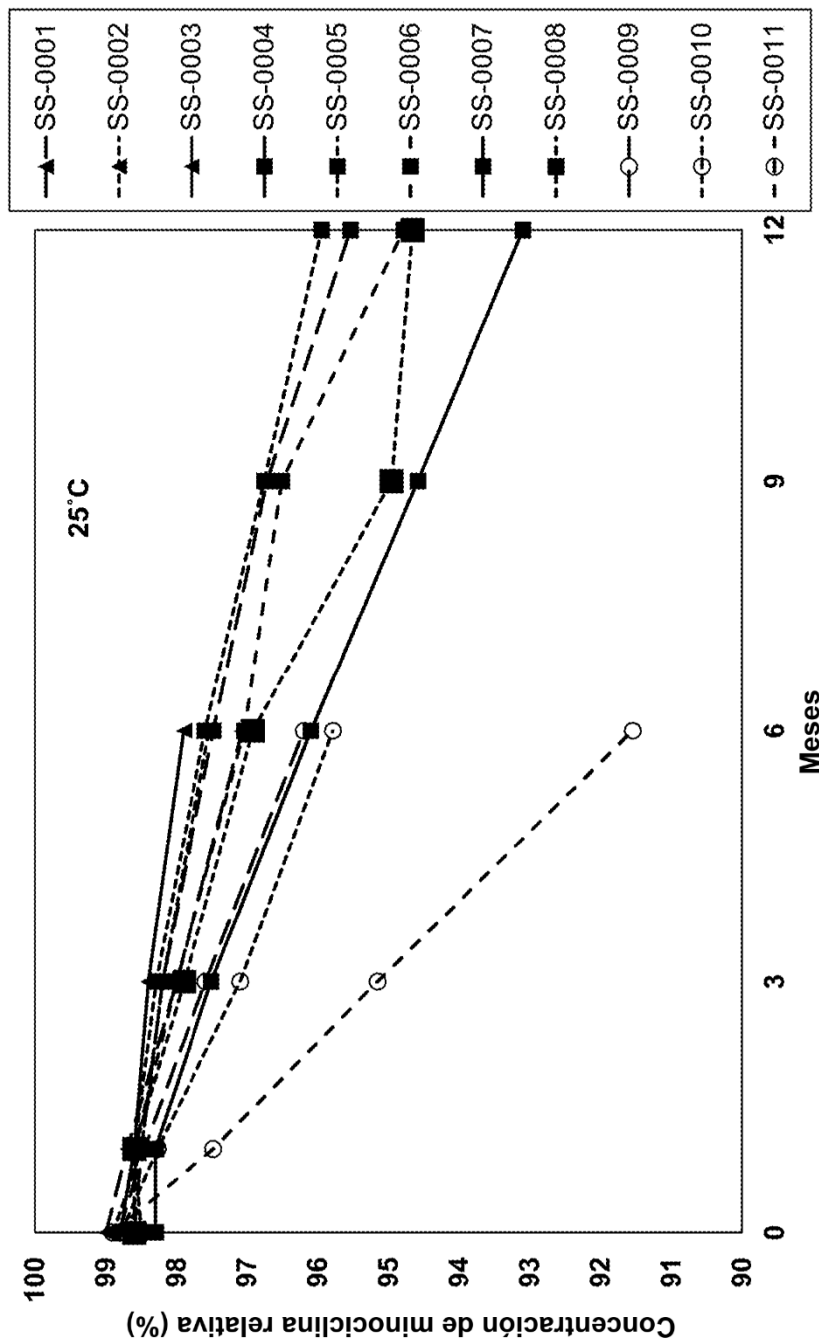


FIG. 14A

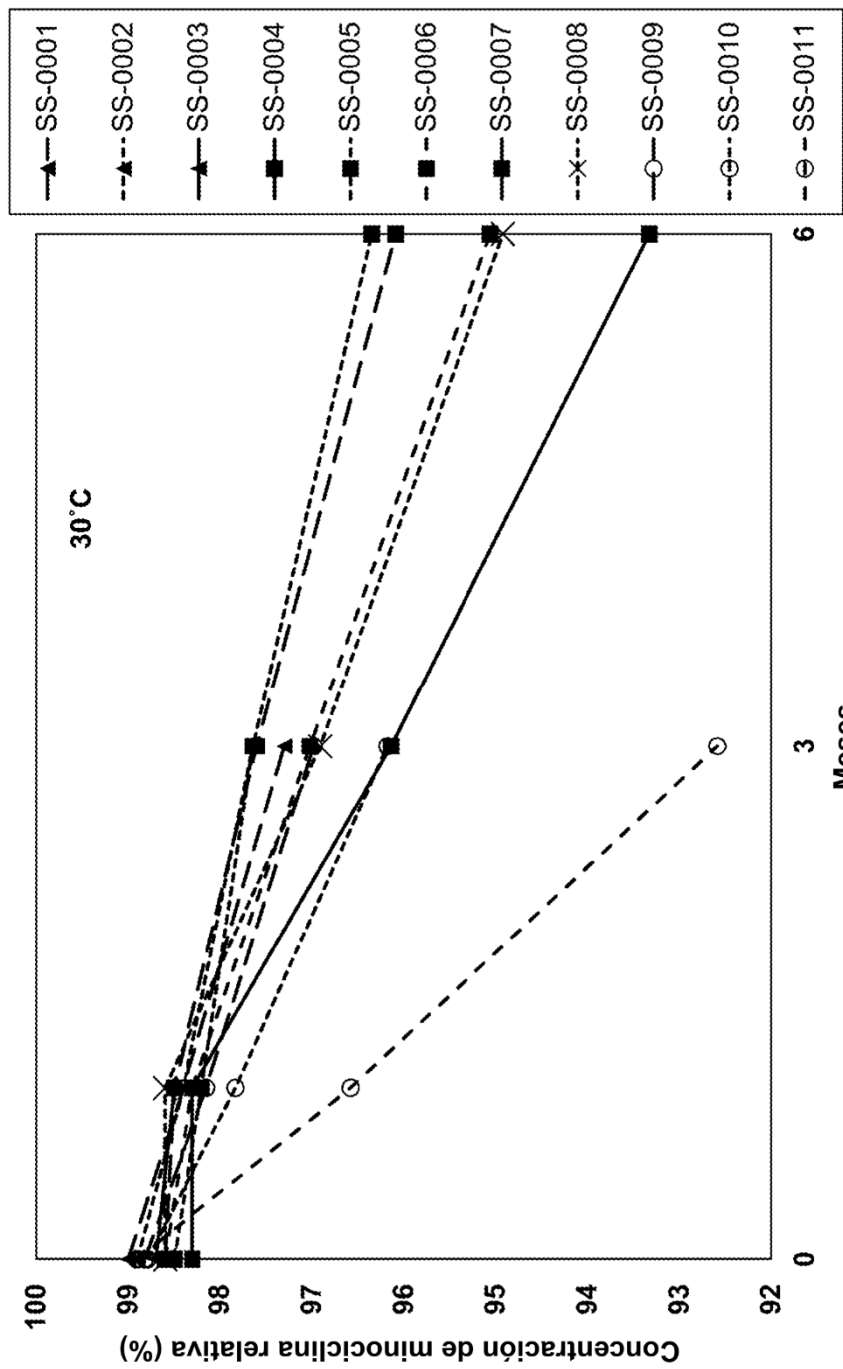


FIG. 14B

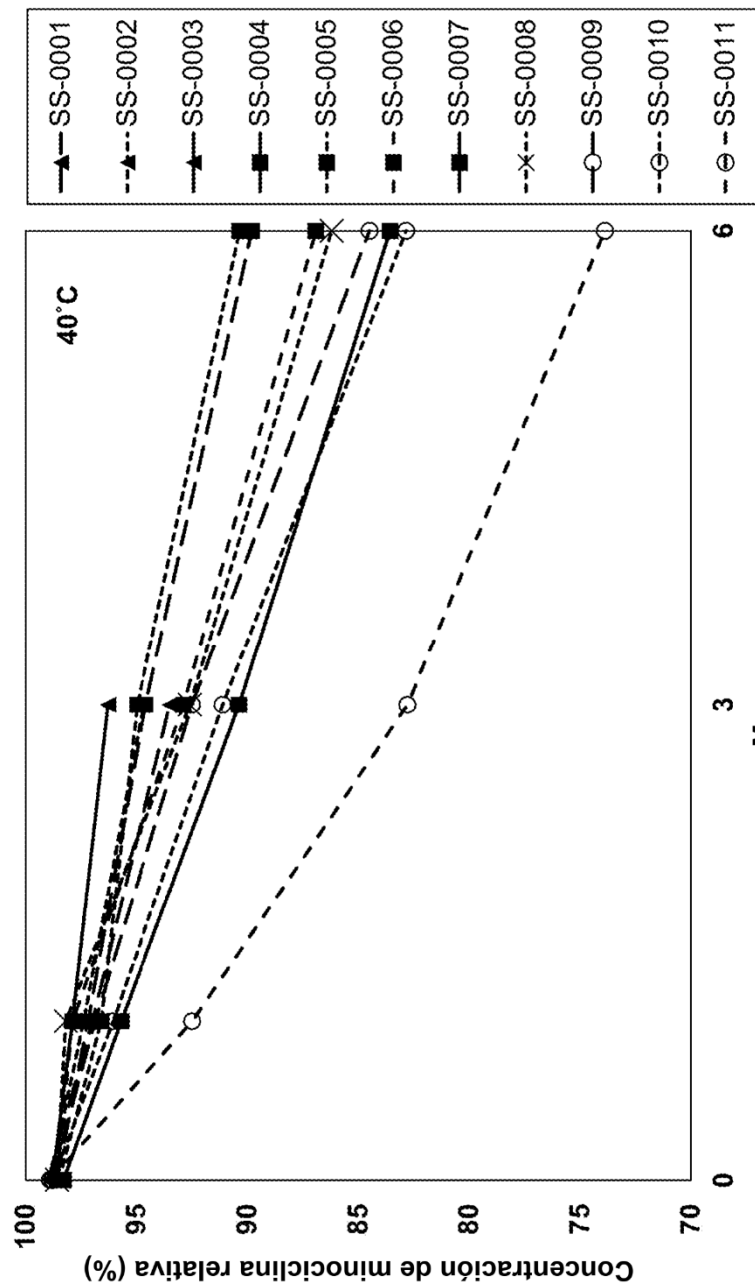


FIG. 14C

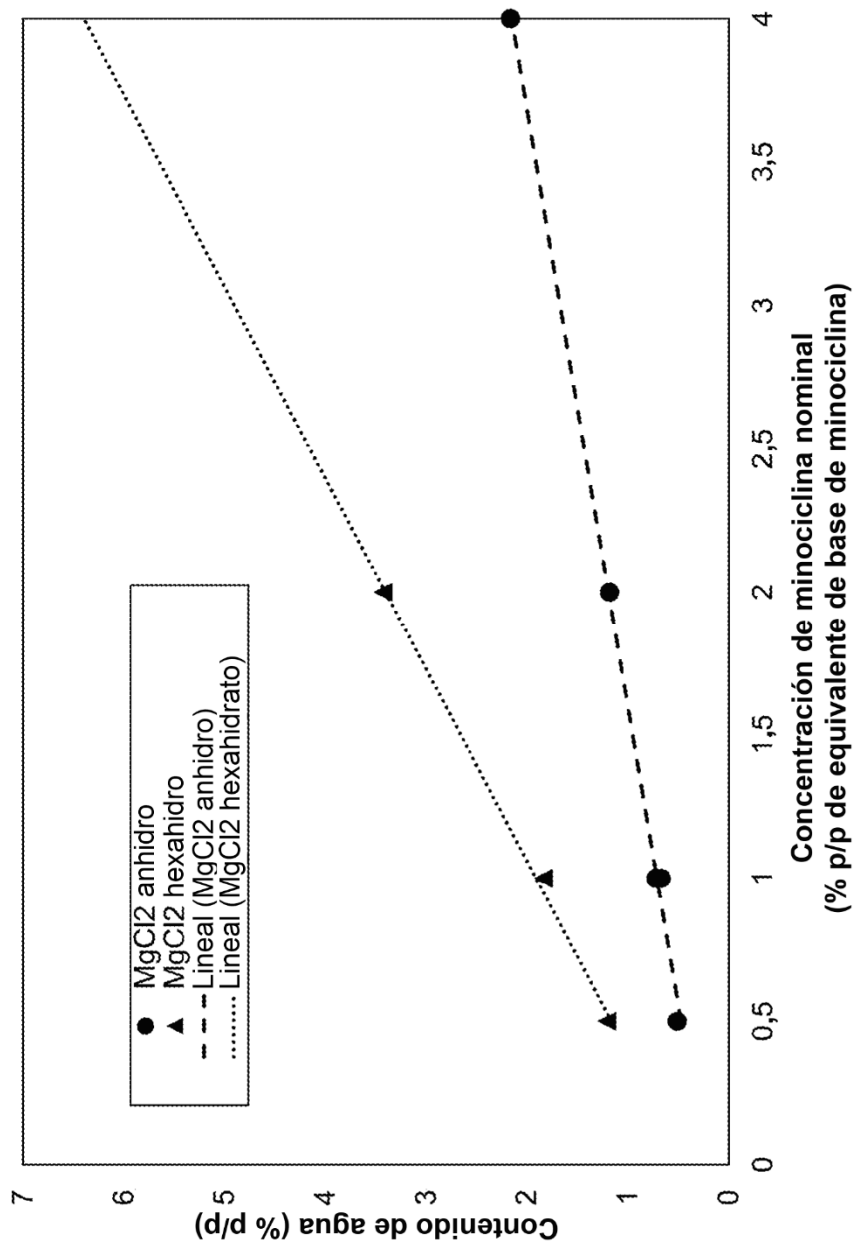


FIG. 15

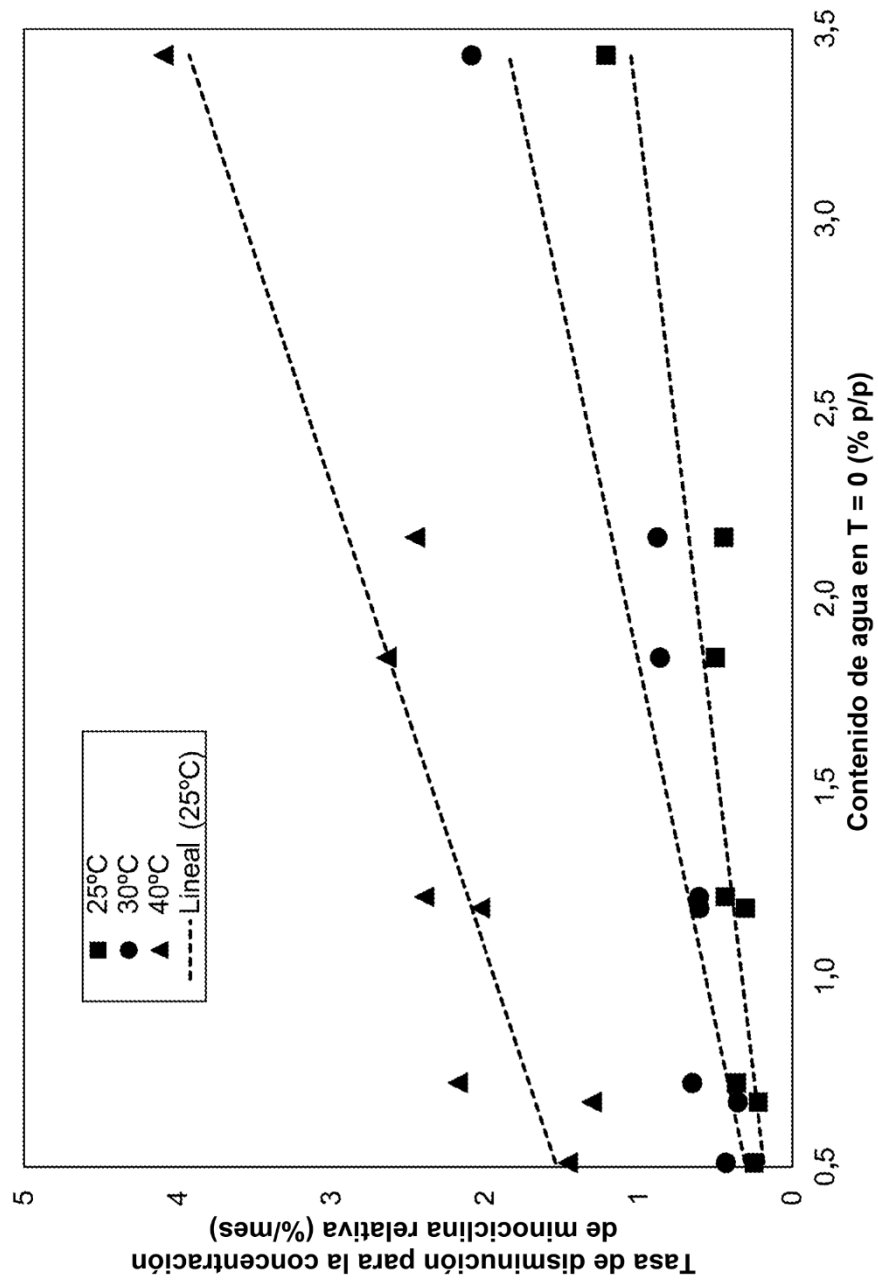


FIG. 16