



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 548**

51 Int. Cl.:  
**A61K 47/00** (2006.01)  
**A61K 31/00** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00984305 .3**  
86 Fecha de presentación : **13.12.2000**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1239884**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2002**

54 Título: **Procedimientos para preparar formulaciones farmacéuticas.**

30 Prioridad: **22.12.1999 US 171696 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**  
**Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue**  
**Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB**

72 Inventor/es: **Floyd, Alison G.;**  
**Hashim, Mir A.;**  
**Lin, Peiyuan;**  
**Mook, Robert A.;**  
**Sefler, Andrea;**  
**Ricciarelli, Patricia, N. y**  
**Spitzer, Timothy, Neal**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 284 548 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

Procedimientos para preparar formulaciones farmacéuticas.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere al uso de un agente activo farmacéuticamente que se sabe que provoca liberación de histamina cuando se administra por vía intravenosa a un animal. De forma más particular, la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento para preparar una formulación farmacéutica de dicho agente que resuelve la liberación de histamina inducida farmacéuticamente.

Los efectos cardiovasculares y respiratorios que indican grados indeseables de liberación de histamina que son específicos de algunos agentes farmacológicos convencionales han supuesto una preocupación para los médicos durante décadas. Las observaciones clínicas típicas asociadas a un grado indeseable de liberación de histamina son rubor cutáneo en la cara, cuello y/o pecho, acompañado algunas veces de hipotensión y/o taquicardia y/o náuseas y vómitos. En algunos casos, las manifestaciones físicas de un grado indeseablemente elevado de liberación de histamina puede incluir reacciones muy graves y potencialmente mortales tales como broncoespasmo, sibilancias y reacciones anafilactoides y choque anafiláctico. Durante años los científicos no han dado con la explicación de la(s) razón(es) por las que estos agentes farmacológicos provocan la liberación de histamina *in vivo*.

Los agentes farmacológicos convencionales que se sabe que provocan o que se sospecha que son capaces de provocar la liberación de histamina incluyen hipnóticos, analgésicos, sedantes, opiáceos, anestésicos, agentes bloqueantes musculares (es decir, "bloqueantes neuromusculares"), agentes de contraste empleados en la obtención de imágenes (es decir, medios de contraste para radiografías, agentes para la obtención de radioimágenes y otros agentes de contraste, en lo sucesivo denominados de forma colectiva "agentes para la obtención de imágenes"), hormonas para procedimientos de diagnóstico y ciertos antibióticos, AINE, anticoagulantes, inhibidores de ACE y antagonistas de los receptores de benzodiazepinas administrados por vía intravenosa. Estos agentes pueden administrarse por vía intravenosa de forma embolada o por infusión rápida que, además de sus efectos terapéuticos, diagnósticos o medicinales pueden provocar la liberación de histamina. La liberación de histamina a menudo es la reacción adversa más prevalente de algunos de estos agentes farmacológicos.

La liberación de histamina podría producirse a través de mecanismos tanto inmunológicos como no inmunológicos. Se cree que las reacciones más inmediatas o rápidas provocadas por estos agentes farmacológicos se producen por la liberación de histamina mediante un mecanismo no inmunológico. A estas últimas a menudo se les denomina reacciones anafilactoides.

El mecanismo preciso por el que estos fármacos provocan la liberación de histamina no está claro. Los mastocitos y los basófilos son las posibles fuentes de la histamina liberada, pero también pueden existir otras fuentes *in vivo*. Los estudios mecanísticos, especialmente los estudios realizados *in vitro* con mastocitos son complicados debido a la tremenda heterogeneidad que existe no sólo entre distintas especies, sino en un único individuo. Dado el número de fuentes de histamina, es posible que en cualquier momento dado estén implicados mecanismos diferentes en células y tejidos diferentes.

Clínicamente se sabe que al disminuir la velocidad de inyección de estos agentes de 5 segundos a 30 segundos disminuye la incidencia de los efectos cardiovasculares típicos de la liberación de histamina. La disminución de la velocidad de administración es el procedimiento preferido actualmente para evitar el riesgo asociado a la liberación sustancial de histamina. Sin embargo, disminuir la velocidad de administración no es un procedimiento aceptable en algunas situaciones clínicas. Por ejemplo, ralentizar la velocidad de administración no es aceptable en situaciones de emergencia médica, especialmente cuando la anestesia y la intubación deben realizarse rápidamente antes de un proceso quirúrgico de emergencia. Además, es sabido que ralentizar la administración de ciertos agentes farmacológicos puede disminuir de forma desproporcionada la velocidad del inicio de la actividad y/o la potencia del fármaco.

El documento EP0707853 describe una solución estabilizada de un agente bloqueante neuromuscular esteroideo que no se basa en la preparación de una sal de adición orgánica o inorgánica farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto se describe una composición farmacéutica que comprende un agente bloqueante neuromuscular esteroideo y al menos una sustancia zwitteriónica.

El documento WO9927914 describe una formulación farmacéutica de 2,16-bispiperidinilandrostando monocuatario para la administración intramuscular, un procedimiento de fabricar una preparación para la administración intramuscular y un procedimiento para proporcionar relajación muscular que comprende dicha formulación farmacéutica.

Sigue existiendo la necesidad en la técnica de procedimientos para resolver el efecto secundario de la liberación de histamina con estos agentes farmacológicos.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica de la tensión superficial (mN/m) en función de la concentración creciente de de dicloruro de (Z)-2-Cloro-1-{3-[(1R,2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-{3-[(1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butendioato (denominado "Compuesto 1") (mg/ml).

La Figura 2 es una gráfica que representa (-▲-) la velocidad de relajación en RMN protónica (T, valor en segundos) para soluciones que contienen dicloruro de (Z)-2-Cloro-1-{3-[(1R,2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-{3-[(1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butendioato (denominado "Compuesto 1") 80 mM, y diversas concentraciones de d<sub>4</sub>-citrato (3,13, 6,25, 12,5, 25 y 50 mM) en solución salina deuterada a pH 3, y (-●-) la liberación de histamina inducida farmacéuticamente a partir de células de leucemia basófila de rata en términos de porcentaje del valor de control, que se induce mediante la exposición de las células RBL a una formulación que contiene 160 mM del mismo compuesto, y diversas concentraciones de ácido cítrico (5, 10, 25 y 50 mM) en agua destilada a pH 3.

### Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que contiene un agente liberador de histamina y un excipiente fisiológicamente aceptable, comprendiendo dicho procedimiento combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho agente liberador de histamina con una concentración del excipiente fisiológicamente aceptable; en el que dicha concentración del excipiente fisiológicamente aceptable, cuando se combina en una solución acuosa con el agente liberador de histamina a una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica, es suficiente para reducir la agregación del agente liberador de histamina en la solución acuosa al menos aproximadamente un 25 por ciento comparada con la agregación del agente liberador de histamina en la solución acuosa que sustancialmente no contiene excipiente fisiológicamente aceptable; en el que el agente liberador de histamina es dicloruro de (Z)-2-Cloro-1-{3-[(1R,2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-{3-[(1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butendioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el excipiente fisiológicamente aceptable se selecciona del grupo constituido por sales inorgánicas divalentes, ácidos carboxílicos orgánicos, ácido fosfórico, aminoácidos, agentes quelantes, albúminas y sus combinaciones.

En una realización de la invención, el excipiente fisiológicamente aceptable se selecciona del grupo constituido por cloruro cálcico, sulfato sódico, sulfato magnésico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido glucurónico, ácido fosfórico, glicina, lisina, arginina, EDTA, albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana y sus combinaciones.

En una realización de la invención, la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable se determina mediante las etapas de:

a) medir la agregación de dicho agente liberador de histamina en una solución de referencia constituida esencialmente por dicho agente liberador de histamina en una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica de la solución acuosa;

b) medir la agregación de dicho agente liberador de histamina en una solución comparativa constituida esencialmente por dicho agente liberador de histamina y una concentración preseleccionada del excipiente fisiológicamente aceptable en la solución acuosa, en el que la concentración de dicho agente liberador de histamina en la solución comparativa es sustancialmente igual a la concentración de dicho agente liberador de histamina en la solución de referencia;

c) opcionalmente repetir la etapa b) una o más veces con una solución comparativa que tiene una concentración preseleccionada diferente del excipiente fisiológicamente aceptable;

d) identificar una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable que sea suficiente para reducir la agregación de dicho agente liberador de histamina en la solución comparativa en al menos aproximadamente un 25 por ciento comparada con la agregación de dicho agente liberador de histamina en la solución de referencia;

en el que dicha concentración identificada de la etapa d) es la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable para combinar con dicho agente liberador de histamina para preparar la formulación farmacéutica.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una formulación farmacéutica, preparada de acuerdo con el procedimiento anterior.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona el uso de una formulación farmacéutica preparada de acuerdo con el procedimiento anterior para la fabricación de un medicamento para suprimir la liberación de histamina inducida farmacéuticamente en un animal que se esté tratando con el agente liberador de histamina.

Estos y otros aspectos de la presente invención se describen adicionalmente en la Descripción detallada de la invención, a continuación y en las reivindicaciones.

## Descripción detallada de la invención

5

### I. Definiciones

“Agente farmacéutico” tal como se usa en la presente memoria se referirá a agentes que tienen actividad terapéutica (es decir, agentes que se administran a un animal, preferiblemente a un ser humano, para el tratamiento o prevención de una afección médica), agentes que tienen actividad diagnóstica (es decir, agentes que se administran a un animal, preferiblemente un ser humano, para ayudar o colaborar al diagnóstico de una afección médica) y agentes que tienen otra utilidad medicinal (es decir, agentes que se administran para facilitar los procedimientos médicos y/o quirúrgicos) cuando se administran a un animal, preferiblemente a un ser humano (por ejemplo, bloqueantes neuromusculares, agentes anestésicos, analgésicos y similares).

15

“Agente liberador de histamina” tal como se usa en la presente memoria se refiere a un agente farmacéutico que se selecciona del grupo constituido por agentes anestésicos, opiáceos, bloqueantes neuromusculares, agentes para la obtención de imágenes, hormonas para procedimientos de diagnóstico, antibióticos glicopeptídicos tricíclicos, antibióticos cefalosporínicos, penicilina y antibióticos derivados de penicilina, agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), anticoagulantes, inhibidores de ACE y antagonistas de los receptores de benzodiazepina que se administran por vía intravenosa, que cuando se administran por vía intravenosa en forma embolada rápida o de infusión rápida a un animal, provocan la elevación de las concentraciones de histamina en plasma o en los tejidos por encima de los niveles fisiológicos. Los agentes liberadores de histamina se caracterizan por una estructura que tiene una o más porciones cargadas (catiónicas o aniónicas) hidrófilas distanciadas de una o más porciones hidrófobas. De forma más particular, los “agentes liberadores de histamina” incluyen agentes farmacéuticos que, cuando se administran por vía intravenosa en forma de una inyección embolada rápida o infusión rápida a un animal, provocan una liberación de histamina *in vivo* que es suficiente para producir manifestaciones fisiológicas que se seleccionan del grupo constituido por rubefacción cutánea, picor, urticaria, edema, náuseas, vómitos, secreción elevada de ácido gástrico, efectos vestibulares, efectos cardiovasculares tales como hipotensión (descenso de la tensión sanguínea), taquicardia (elevación del ritmo cardíaco), y efectos respiratorios tales como broncoconstricción, reacciones anafilactoides y choque anafiláctico, y combinaciones de cualesquiera dos o más de los anteriores. Los “niveles fisiológicos normales de histamina” pueden diferir entre especies distintas y entre miembros individuales de una única especie. Por lo tanto, “niveles fisiológicos normales de histamina” se refiere a un nivel medio de histamina en plasma de un animal no tratado de la misma especie que la que se esté tratando con el agente liberador de histamina. Los niveles fisiológicos normales de histamina de diversas especies de animales se reseñan en INFLAMMATION: BASIC PRINCIPLES AND CLINICAL CORRELATES (Editores J. I. Gallin, I. M. Goldstein, y R. Snyderman, Capítulo 11, *Measurement of Histamine*, página 202, Raven Press, Nueva York, 1992; y Bertini, S. y cols., *Gen. Pharmac.* 31: 625-631 (1998).

Tal como se usa en la presente memoria, el término “cantidad terapéuticamente eficaz de un agente liberador de histamina” quiere decir una cantidad del agente farmacéutico que es un agente liberador de histamina (definido anteriormente), cantidad que es suficiente para lograr la actividad farmacéutica deseada (es decir, actividad terapéutica, actividad diagnóstica o utilidad medicinal) del agente. Así, en la realización en la que el agente liberador de histamina es un bloqueante neuromuscular, una “cantidad terapéuticamente eficaz del agente liberador de histamina” es la cantidad del bloqueante neuromuscular que es suficiente para provocar la relajación de la musculatura esquelética en el animal al que se le administra el bloqueante neuromuscular. En la realización en la que el agente liberador de histamina es un agente anestésico, una “cantidad terapéuticamente eficaz del agente liberador de histamina” es la cantidad de agente anestésico que es suficiente para inducir la anestesia en el animal al que se administra el agente anestésico. En la realización en la que el agente liberador de histamina es un agente para la obtención de imágenes, una “cantidad terapéuticamente eficaz del agente liberador de histamina” es la cantidad de agente para la obtención de imágenes que es suficiente para producir un nivel apropiado de contraste de imagen en un procedimiento de diagnóstico en el animal al que se le administra el agente para la obtención de imágenes. Una persona de experiencia en la técnica puede determinar fácilmente la cantidad terapéuticamente eficaz de un agente liberador de histamina particular basándose en la explicación anterior y en los ejemplos, y en el conocimiento convencional de la técnica sobre estos agentes farmacéuticos.

El término “excipiente fisiológicamente aceptable” quiere decir un agente, distinto del agua, que se utiliza en la formulación de un agente farmacéutico en forma de una formulación farmacéutica, que no es perjudicial para el animal al que se le administra la formulación y que no afecta sustancialmente a la actividad farmacéutica del agente farmacéutico con el que se formula. Habitualmente, los excipientes fisiológicamente aceptables se emplean con el fin de facilitar la formulación del agente farmacéuticamente activo.

60

El término “solución acuosa” tal como se usa en la presente memoria se refiere a soluciones que contienen agua (que incluye agua deuterada), preferiblemente agua destilada, y “soluciones salinas” (definidas más adelante), y son soluciones que sustancialmente no contienen otros aditivos, pero cuyo pH puede ajustarse con ácido clorhídrico o con hidróxido sódico, según sea necesario o deseable para facilitar la solvatación de ciertos agentes liberadores de histamina en la solución acuosa.

65

El término “solución salina” tal como se usa en la presente memoria se refiere a soluciones que contienen cloruro sódico aproximadamente al 0,9% disuelto en agua (que incluye agua deuterada), preferiblemente agua destilada, y

son soluciones que sustancialmente no contienen otros aditivos pero cuyo pH puede ajustarse con ácido clorhídrico o con hidróxido sódico, según sea necesario o deseable para facilitar la solvatación de ciertos agentes liberadores de histamina en la solución salina.

5 El término “agregación” tal como se usa en la presente memoria se refiere al tamaño medio del agregado de un agente farmacéutico, disuelto en solución acuosa. El tamaño del agregado puede estar en función de la conformación de las moléculas o agregados, o del número de moléculas que forman el agregado, o del radio hidrodinámico del agregado.

## 10 II. Liberación de histamina de forma general

Aunque durante años los científicos no han dado con la explicación de la(s) razón(es) por la(s) que estos agentes farmacológicos provocan la liberación de histamina, los estudios de los presentes inventores sugieren que la liberación de histamina se produce por una combinación de al menos dos factores, posiblemente interrelacionados: en concreto, 15 la concentración del agente liberador de histamina y ciertas propiedades estructurales de los agentes liberadores de histamina que pueden provocar la agregación del agente liberador de histamina en solución y en la sangre tras la administración intravenosa a un animal.

Actualmente se cree que la liberación de histamina puede estar relacionada con la concentración inicial en el bolo 20 del agente liberador de histamina, y que los eventos críticos que provocan la liberación de histamina se producen muy pronto después de la inyección. La ralentización de la velocidad de la inyección reduce la concentración del agente liberador de histamina de forma eficaz dado que los agentes liberadores de histamina inyectados por vía intravenosa se diluyen en la corriente sanguínea que pasa por la zona de la inyección mientras se está inyectando el agente.

Al estudiar las propiedades de la tensión superficial de los agentes liberadores de histamina, se ha encontrado que 25 ciertos agentes liberadores de histamina tienden a asociarse entre sí o a agregarse en la solución acuosa. Actualmente se cree que esta agregación del agente liberador de histamina desencadena la liberación de histamina. Los presentes inventores han identificado propiedades estructurales que comparten diversos agentes liberadores de histamina, que pueden provocar la agregación.

Los agentes liberadores de histamina a los que hace referencia comparten las características estructurales comu- 30 nes de una o más porciones hidrófilas distanciadas de una o más porciones hidrófobas. Por ejemplo, los bloqueantes neuromusculares son sales de amonio bis-cuaternarias que poseen dos cargas catiónicas en los extremos de la molécula, separados por un enlazador hidrófobo, lipófilo. En el caso de los bloqueantes neuromusculares no esteroideos (por ejemplo, de tipo bencilisoquinolina), el enlazador hidrófobo es habitualmente largo y flexible. En el caso de los 35 bloqueantes neuromusculares esteroideos, el enlazador hidrófobo puede ser voluminoso y/o rígido.

Debido a esta característica estructural, los agentes liberadores de histamina son solubles tanto en agua como en 40 disolventes orgánicos. Las características estructurales y de solubilidad de los agentes liberadores de histamina son similares a las de los tensioactivos y detergentes. Se sabe que los tensioactivos y los detergentes se agregan en solución de forma dependiente de la concentración. La presencia de una porción hidrófila cargada distanciada de una porción hidrófoba de la molécula puede imponer sobre el agente liberador de histamina una tendencia de autosolvatación o agregarse en solución justo igual que un detergente o tensioactivo, lo que explicaría la observación de las propiedades de modificación de la tensión superficial de los agentes liberadores de histamina.

Los estudios de los presentes inventores indican que los agentes liberadores de histamina pueden agregarse en 45 solución. Las posibles disposiciones de los agregados en solución incluyen pero sin limitación dímeros, trímeros, micelas, barras, placas y láminas. En general, los agentes liberadores de histamina tienden a agregarse en disposiciones que buscan aislar la(s) porción(es) hidrófoba(s) de la molécula de la solución acuosa en la que están disueltos. Esto 50 puede lograrse, por ejemplo, formando micelas en las que la porción hidrófoba de la molécula del agente liberador de histamina esté orientada hacia el centro de la micela y la porción hidrófila de la molécula esté orientada hacia el exterior desde el centro de la micela. Por ejemplo, las moléculas de un bloqueante neuromuscular podrían curvarse en la región de la porción hidrófoba permitiendo que múltiples moléculas se agregaran posicionando la porción hidrófoba de cada molécula cerca de las porciones hidrófobas de las otras moléculas, mientras que la porción hidrófila y catiónica se extendería hacia el exterior. Esta disposición agregada de moléculas de bloqueante neuromuscular provoca una 55 agregación en la que las superficies policatiónicas que se extienden hacia el exterior desde el centro del agregado. Se ha encontrado que el grado de agregación es dependiente de la concentración, de tal forma que las concentraciones mayores del agente liberador de histamina provocan una mayor agregación y/o agregados de orden superior (por ejemplo, micelas en lugar de dímeros).

Muchos agentes farmacéuticos, que incluyen la mayoría de los bloqueantes neuromusculares, se administran por 60 vía intravenosa a concentraciones en el intervalo milimolar (mM); un intervalo de concentración en el que es probable que el fármaco esté parcialmente agregado y que puede estar próximo a su concentración micelar crítica. La “concentración micelar crítica” es la concentración a la que las moléculas en un entorno dado se agregan formando micelas. La concentración micelar crítica de un agente dado puede medirse usando las técnicas que se describen en 65 la presente memoria así como otras técnicas convencionales, que incluyen las que describe Anacker, E. W. (1970), en MICELLE FORMATION OF CATIONIC SURFACTANTS IN AQUEOUS MEDIA, *Cationic Surfactants*, E. Jungermann. Nueva York, Marcel Dekker, Inc.; Attwood, D. (1995), *Advances in Colloid and Interface Science* 55: 271-303;

y Mukerjee, P. y K. J. Mysels (1971), CRITICAL MICELLE CONCENTRATIONS IN AQUEOUS SURFACTANT SYSTEMS, Washington, D.C., U.S. Dept. of Commerce, cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria por referencia.

5 Tal como conocen los expertos en la técnica, la concentración micelar crítica depende de numerosos factores. Véase, Attwood, D. y A. T. Florence (1983), SURFACTANT SYSTEMS: THEIR CHEMISTRY, PHARMACY, AND BIOLOGY, Londres, Chapman y Hall; Rosen, M. J. (1978), SURFACTANTS AND INTERFACIAL FENOMENA, Nueva York, Wiley-Interscience; Jungermann, E., Editores. (1970), CATIONIC SURFACTANTS, Nueva York, Marcel Dekker, Inc.; y Jonsson, B., B. Lindman, y cols. (1998), SURFACTANTS AND POLYMERS IN AQUEOUS SOLUTION, Chichester, John Wiley and Sons (cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria por referen-  
10 cia) para una descripción de los factores que pueden afectar a la concentración micelar crítica. Uno de tales factores es la naturaleza de la solución o suspensión en la que se forman los agregados. Por ejemplo, los datos obtenidos para el dicloruro de (Z)-2-Cloro-1-{3-[(1R,2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio}propil}-4-{3-[(1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butendioato, un bloqueante neuromuscular de acción ultrarrápida, en agua son consistentes con una con-  
15 centración micelar crítica a aproximadamente 15 mg/ml (aproximadamente 14 mM), mientras que en solución salina, los datos obtenidos para este fármaco son consistentes con una concentración micelar crítica a entre 40 y 80 mM. La concentración de bloqueantes neuromusculares que se usa clínicamente, varía habitualmente en el intervalo desde aproximadamente 1 a aproximadamente 55 mM.

20 La agregación del agente liberador de histamina y la concentración micelar crítica muestran una fuerte dependencia de muchos factores. Un factor es la estructura de la molécula del agente liberador de histamina particular, que incluye la presencia y estructura de uno o más dominios hidrófobos distanciados de uno o más dominios hidrófilos que a menudo contienen grupos catiónicos o aniónicos. Además, la agregación y concentración micelar crítica muestran una fuerte  
25 dependencia de la concentración del agente liberador de histamina en solución, de la presencia y concentración de otras moléculas en la solución, del pH, de la identidad y valencia de los contraponos de cualesquiera grupos catiónicos o aniónicos y de la temperatura y presión de la solución.

30 Tras la inyección de los agentes liberadores de histamina en la sangre, se cree que la nueva solución resultante (es decir, la solución de agente liberador de histamina en sangre) cambia muchos de los factores que se enumeran anteriormente muy rápidamente. Dadas las rápidamente cambiantes condiciones de la solución tales como la composición iónica de la sangre y la presencia de muchos otros solutos disueltos, de células, proteínas, etc., es razonable esperar que estas condiciones favorezcan una mayor agregación y/o una menor concentración micelar crítica. De forma global,  
35 es probable que estos agentes liberadores de histamina estén ya muy agregados en la formulación que se administra y que el acto físico de mezclarlos con la sangre venosa al inyectarlos pueda favorecer una mayor agregación y/o la formación de micelas.

Actualmente se cree que las moléculas de agente liberador de histamina agregadas inducen la liberación de histamina de las células, tejidos y fluidos esencialmente del mismo modo que las moléculas de tensioactivos agregadas.  
40 Las moléculas de tensioactivos agregadas pueden provocar una acción detergente que puede solvatar las moléculas orgánicas en agua, extraer las proteínas de las membranas y provocar que las membranas celulares se vuelvan permeables. Al aumentar la permeabilidad de la membrana se facilita la entrada de moléculas en la célula y la liberación de las moléculas del interior de la célula, tales como las moléculas de histamina.

45 Actualmente se ha observado que los agentes liberadores de histamina tienden a agregarse. Estos agregados pueden mostrar propiedades de tipo detergente. Por consiguiente, se cree que las propiedades de tipo detergente del agente liberador de histamina agregado pueden provocar que las membranas celulares se alteren posiblemente hasta el punto de la lisis celular. La alteración de las membranas celulares de las células que contienen histamina, o de los tejidos o fluidos y/o la lisis de estas células pueden provocar la liberación de los componentes y moléculas intracelulares  
50 al entorno que las rodea. Se sabe que los tensioactivos y detergentes provocan la liberación de histamina al lisar la membrana celular de los mastocitos, que se sabe que almacenan y liberan histamina. Otros tipos celulares pueden comportarse de forma similar. Por ejemplo, también se sabe que los basófilos presentes en la sangre almacenan y liberan histamina y sería de esperar que se comportaran de forma similar a los mastocitos cuando se exponen a un tensioactivo o a un agente liberador de histamina agregado.

55 Incluso los agregados de orden inferior (es decir, dímeros y trímeros) pueden provocar la liberación de histamina que puede o no estar relacionada con efectos de tipo detergente. Véase, Read, G.W. y J.F. Lenney, *Journal of Medicinal Chemistry* 15(3): páginas 320-23 (1972). Por ejemplo, debido a que los agentes bis-catiónicos tales como los bloqueantes neuromusculares, portan dos grupos de amonio por molécula, actualmente se espera que puedan esperarse efectos de liberación de histamina cuando se agregan tan sólo 2-4 moléculas de bloqueante neuromuscular.

60 Además de la explicación de la liberación de histamina por este mecanismo directo, también es posible que la liberación de histamina pueda provocarse por mecanismos indirectos. Las células que no almacenan histamina, tales como las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos pueden provocar la liberación de histamina mediante un mecanismo indirecto. Los agregados de los agentes liberadores de histamina pueden provocar la liberación de componentes celulares de las células endoteliales (o de otras células que no almacenan histamina), y esos componentes pueden desplazarse hasta las células que contienen histamina y señalar la liberación de histamina a esas células de almacenamiento.

### III. Procedimientos para preparar formulaciones

La presente invención proporciona un procedimiento de preparar una formulación farmacéutica que contiene un agente liberador de histamina y un excipiente fisiológicamente aceptable, cuyo objetivo es resolver las tendencias, anteriormente mencionadas, de los agentes liberadores de histamina de agregarse y provocar la liberación de niveles indeseables de histamina tras la administración *in vivo*.

#### A. Agentes liberadores de histamina

El agente liberador de histamina al que se refiere la presente invención y que se emplea en el procedimiento de preparar una formulación farmacéutica, es el agente bloqueante neuromuscular no esteroideo dicloruro de (Z)-2-Cloro-1-{3-[(1R,2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio}propil}-4-{3-[(1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butendioato (en lo sucesivo denominado algunas veces "Compuesto 1" para mayor brevedad).

Las sales farmacéuticamente aceptables también son contempladas por la presente invención. Así, la presente invención contempla el uso de sales farmacéuticamente aceptables del Compuesto 1, y similares.

El Compuesto 1 y las formulaciones farmacéuticas y los procedimientos de tratamiento que usan este compuesto se describen en las publicaciones de patentes PCT n.º 98/42674 y 98/42675, publicadas ambas el 1 de octubre de 1998, de Glaxo Wellcome Inc. y Cornell Research Foundation, cuyo contenido se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

#### B. Excipientes fisiológicamente aceptables

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el agente liberador de histamina se combina con un excipiente fisiológicamente aceptable, que puede ser un único excipiente fisiológicamente aceptable o una combinación de dos, tres o más excipientes fisiológicamente aceptables. "Excipiente" tal como se usa en la presente memoria quiere decir tanto un único excipiente fisiológicamente aceptable como una combinación de dos, tres o más excipiente fisiológicamente aceptables.

Los excipientes preferidos son los que se emplean convencionalmente en formulaciones parenterales o inyectables autorizadas. Los excipientes que se emplean en la presente invención se caracterizan físicamente por la presencia de carga (por ejemplo, excipientes iónicos) y/o la presencia de restos orgánicos que pueden afectar a la solvatación del agente liberador de histamina. De forma más particular, los excipientes pueden ionizarse en solución y/o pueden solvatar el agente liberador de histamina o ayudar a la solvatación del agente liberador de histamina.

Los excipientes adecuados para usar en la presente invención pueden seleccionarse a partir de una variedad de categorías, que incluyen, pero sin limitación sales inorgánicas divalentes (es decir, sales inorgánicas que tienen un anión divalente, un catión divalente, o ambos), ácidos carboxílicos orgánicos, ácido fosfórico, aminoácidos, agentes quelantes, albúminas y sus combinaciones. Los excipientes preferidos se seleccionan del grupo constituido por sales inorgánicas divalentes, ácidos carboxílicos orgánicos, ácido fosfórico, aminoácidos, agentes quelantes, albúminas y sus combinaciones. En una realización, el excipiente es una sal inorgánica divalente. En una realización, el excipiente es un ácido orgánico. En una realización, el excipiente es un agente quelante. En una realización, el excipiente es un aminoácido.

Ejemplos de sales inorgánicas divalentes adecuadas incluyen, pero sin limitación, cloruro cálcico, sulfato magnésico, cloruro magnésico, sulfato sódico y sus combinaciones. El cloruro cálcico es un excipiente preferido para usar en la presente invención.

Ejemplos de ácidos carboxílicos orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido tartárico (que incluye ácido tartárico racémico, ácido D-tartárico y ácido L-tartárico), ácido maleico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido glucurónico, y sus combinaciones. "Ácido cítrico" tal como se usa en la presente memoria se refiere a ácido cítrico y cualesquiera hidratos y sales del mismo, es decir, los citratos. El ácido cítrico es un excipiente preferido para usar en la presente invención.

El término "ácido fosfórico" tal como se usa en la presente memoria también incluye sales de ácido fosfórico, tales como fosfato sódico. Tal como será fácilmente obvio para una persona de experiencia en la técnica, el uso de ácido fosfórico como excipiente en la presente invención requerirá que se proporcione a una concentración que sea fisiológicamente aceptable.

Ejemplos de aminoácidos adecuados incluyen, pero sin limitación, glicina, lisina, arginina y sus combinaciones. La glicina es un excipiente preferido para usar en la presente invención.

Ejemplos de agentes quelantes adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido etilendiamintetracético (EDTA), sales de EDTA (que incluyen EDTA-disodio y EDTA-calcio disodio) y sus combinaciones. "EDTA" tal como se usa en la presente memoria, se referirá a EDTA y a cualesquiera sales del mismo. El EDTA es un excipiente preferido para usar en la presente invención.

Ejemplos de albúminas adecuadas incluyen albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana y sus combinaciones.

El excipiente puede ser una combinación de cualesquiera dos, tres o más excipientes todos seleccionados a partir de una de las siguientes categorías, o una combinación de cualesquiera dos, tres o más excipientes que se seleccionan a partir de dos o más categorías diferentes de las anteriores. Por ejemplo, el excipiente puede ser una combinación de una sal inorgánica divalente y un ácido carboxílico orgánico. En otra realización, el excipiente puede ser un ácido carboxílico orgánico y un agente quelante. En otra realización, el excipiente puede ser una combinación de una sal inorgánica divalente y un agente quelante. Todavía en otra realización, el excipiente puede ser una combinación de una sal inorgánica divalente, un ácido carboxílico orgánico y un agente quelante. Todavía en otra realización, el excipiente puede ser una combinación de una sal inorgánica divalente y un aminoácido.

El único requisito para utilizar las combinaciones de excipientes en los procedimientos y formulaciones de la presente invención es que los excipientes seleccionados no interactúen entre sí de una forma que sea perjudicial para su capacidad de funcionar en los procedimientos y formulaciones de la presente invención. Las técnicas que se describen más adelante para la determinación de las concentraciones de los excipientes adecuados son igualmente aplicables para determinar otras combinaciones diferentes de dos, tres o más excipientes que pueden emplearse en la presente invención.

En una realización preferida, el excipiente es una combinación de cualesquiera dos o más (es decir, dos, tres o los cuatro) excipientes que se seleccionan del grupo constituido por glicina, EDTA, ácido cítrico y cloruro cálcico. En una realización preferida, el excipiente es una combinación de ácido cítrico y EDTA. En una realización preferida, el excipiente es una combinación de ácido cítrico y cloruro cálcico. En una realización preferida, el excipiente es una combinación de glicina y EDTA. En una realización preferida, el excipiente es una combinación de glicina y ácido cítrico. En una realización preferida, el excipiente es una combinación de ácido cítrico, glicina y cloruro cálcico.

### C. Procedimientos para determinar una concentración adecuada de excipiente

De acuerdo con los procedimientos de la presente invención, las formulaciones farmacéuticas se preparan combinando una cantidad terapéuticamente eficaz del agente liberador de histamina con una concentración del excipiente fisiológicamente aceptable. Los excipientes preferidos para usar en estos procedimientos de la presente invención pueden seleccionarse del grupo constituido por sales inorgánicas divalentes, ácidos carboxílicos orgánicos, ácido fosfórico, aminoácidos, agentes quelantes, albúminas y sus combinaciones. En general, la concentración del excipiente es una concentración que es suficiente para suprimir la liberación de histamina inducida farmacéuticamente en un animal que se esté tratando con un agente liberador de histamina. De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la concentración del excipiente es una concentración que cuando se combina en una solución acuosa con el agente liberador de histamina a una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica del agente liberador de histamina, es suficiente para reducir la agregación del agente liberador de histamina en la solución acuosa al menos en aproximadamente el 25 por ciento comparado con la agregación del agente liberador de histamina a la misma concentración en la solución acuosa que sustancialmente no contiene excipiente.

“Que sustancialmente no contiene excipiente” quiere decir que la solución o mezcla está sustancialmente libre de excipiente, es decir, no contiene una cantidad de excipiente que sea suficiente para reducir la agregación del agente liberador de histamina en solución o para suprimir la liberación de histamina inducida farmacéuticamente *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente, “que sustancialmente no contiene excipiente” quiere decir que la solución o mezcla no contiene una cantidad de excipiente que sea suficiente para reducir la agregación del agente liberador de histamina en más del 10 por ciento o para suprimir la liberación de histamina inducida farmacéuticamente *in vitro* o *in vivo*, en más del 5 por ciento.

En otras palabras, en una solución acuosa que contiene el agente liberador de histamina en una concentración igual o superior a su concentración micelar crítica y uno o más excipientes fisiológicamente aceptables en concentraciones adecuadas, la agregación del agente liberador de histamina será al menos aproximadamente un 25 por ciento inferior a la agregación del agente liberador de histamina en una solución acuosa que contiene sustancialmente la misma concentración de agente liberador de histamina y que sustancialmente no contiene excipiente fisiológicamente aceptable. La inclusión del excipiente fisiológicamente aceptable en la solución que contiene el agente liberador de histamina reduce sustancialmente la agregación del agente liberador de histamina de la solución.

“Agregación reducida,” “agregación menor” o “agregación disminuida” se refiere a una disminución del tamaño medio del agregado (que puede estar en función de la conformación de las moléculas o agregados o del número de moléculas que forman el agregado) y/o un descenso en el número de agregados por unidad de volumen. Los procedimientos para medir la agregación del agente liberador de histamina, y así identificar una concentración de excipiente que es adecuada para preparar las formulaciones de la presente invención, se describen más adelante. Preferiblemente, la concentración del excipiente será una concentración que sea suficiente para el agente liberador de histamina y el excipiente particulares que se emplean, para reducir la agregación del agente liberador de histamina en la solución acuosa en al menos aproximadamente el 50 por ciento, y más preferiblemente en al menos aproximadamente el 60 por ciento, comparada con una solución acuosa de agente liberador de histamina que sustancialmente no contiene excipientes.

La presente invención proporciona un procedimiento para determinar una concentración de excipiente que es adecuada para combinar con el agente liberador de histamina para preparar las formulaciones farmacéuticas de la presente

invención. Una concentración adecuada de excipiente que se emplea en la presente invención dependerá de diversos factores que incluyen por ejemplo, el agente liberador de histamina con el que se combinará el excipiente, el animal que se esté tratando con el agente liberador de histamina o al que se le administrará la formulación farmacéutica y el excipiente particular (o combinación de excipientes) que se emplee. En algunos casos, también el pH puede desempeñar un papel en la optimización de la concentración de los excipientes. En general, la concentración adecuada del excipiente será una concentración fisiológicamente aceptable.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la concentración de excipiente se determina mediante el procedimiento que comprende las etapas de: a) medir la agregación del agente liberador de histamina en una solución de referencia constituida esencialmente por el agente liberador de histamina en una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica en la solución acuosa; b) medir la agregación del agente liberador de histamina en una solución comparativa constituida esencialmente por el agente liberador de histamina y una concentración preseleccionada del excipiente fisiológicamente aceptable en la solución acuosa, en el que la concentración del agente liberador de histamina en la solución comparativa es sustancialmente igual a la concentración del agente liberador de histamina en la solución de referencia; c) opcionalmente repetir la etapa b) una o más veces con una solución comparativa que tiene una concentración preseleccionada diferente del excipiente fisiológicamente aceptable; d) identificar una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable que sea suficiente para reducir la agregación del agente liberador de histamina en la solución comparativa en al menos aproximadamente el 25 por ciento comparada con la agregación del agente liberador en la solución de referencia. La concentración identificada en la etapa d) es la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable para combinar con el agente liberador de histamina para preparar la formulación farmacéutica.

El orden de las etapas a), b) y c) no es crítico. Estas etapas pueden realizarse en cualquier orden que se desee, tal como entenderán los expertos en la técnica. No es necesario medir la agregación del agente liberador de histamina en la solución de referencia antes de medir la agregación del agente liberador de histamina en la solución comparativa, y la presente invención contempla procedimientos que comprenden estas etapas en cualquier orden adecuado.

La etapa c) de, opcionalmente, repetir la etapa b) una o más veces quiere decir que la etapa b) puede repetirse con múltiples soluciones comparativas, pero no es necesario. Una persona de experiencia en la técnica es capaz de determinar si es deseable en un caso particular realizar la etapa c), (es decir, repetir la etapa b)) o no. En general, los procedimientos preferidos de la invención incluyen repetir la etapa b) al menos una vez y más preferiblemente más de una vez.

La solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s) puede(n) prepararse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, la solución de referencia puede prepararse disolviendo el agente liberador de histamina, a una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica del agente liberador de histamina, en solución acuosa.

Una o más solución(es) comparativa(s), que incluye(n) cada una una concentración preseleccionada diferente de excipiente, puede(n) prepararse de acuerdo con varios procedimientos diferentes. Cada solución comparativa, tras la adición de la concentración preseleccionada de excipiente, tendrá una concentración de agente liberador de histamina que sea sustancialmente igual a la concentración del agente liberador de histamina en la solución de referencia. Concentración “sustancialmente igual” quiere decir que la diferencia de la concentración del agente liberador de histamina entre la solución de referencia y la solución comparativa no es suficiente para producir un efecto cuantificable sobre la agregación del agente liberador de histamina. Más preferiblemente, la concentración del agente liberador de histamina en la(s) solución(es) comparativa(s) se considerará que es sustancialmente igual que la concentración en la solución de referencia cuando la concentración de la(s) solución(es) comparativa(s) sea la concentración de la solución de referencia más o menos aproximadamente el 5%. Para que la comparación sea lo más informativa posible sobre la agregación del agente liberador de histamina en la solución de referencia comparada con la agregación del agente liberador de histamina en la solución comparativa, cada una de la solución de referencia y de la(s) solución(es) comparativa(s) contendrá una concentración equivalente de agente liberador de histamina.

De acuerdo con una realización, la(s) solución(es) comparativa(s) se prepara(n) valorando concentraciones preseleccionadas, o conocidas por otros medios, del excipiente en una solución acuosa que contiene la concentración apropiada del agente liberador de histamina. El excipiente puede valorarse en la solución que contiene el agente liberador de histamina por aumento o por disminución, de acuerdo con técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Así, se proporciona un procedimiento para determinar una concentración adecuada de excipiente para combinar con el agente liberador de histamina para preparar una formulación farmacéutica que comprende las etapas de: 1) medir la agregación del agente liberador de histamina en una solución de referencia constituida esencialmente por el agente liberador de histamina a una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica de la solución acuosa; 2) valorar el excipiente fisiológicamente aceptable en la solución de referencia, para preparar soluciones comparativas; y 3) identificar una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable suficiente para reducir la agregación del agente liberador de histamina en la solución comparativa en al menos aproximadamente el 25 por ciento comparada con la agregación medida de la etapa 1). La concentración identificada es la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable a combinar con el agente liberador de histamina para preparar la formulación farmacéutica. La etapa de “valorar el excipiente” se refiere a añadir de forma incremental cantidades conocidas de excipiente (o reducir por dilución a cantidades de excipiente conocidas) a la vez que se controla la agregación del agente liberador de histamina en la solución.

## ES 2 284 548 T3

La(s) solución(es) comparativa(s) también pueden prepararse disolviendo una concentración preseleccionada de excipiente en solución acuosa para crear una solución madre que tenga la mayor concentración de excipiente, diluyendo una porción de la solución madre por un factor de dilución adecuado (por ejemplo, dilución seriada de la solución madre) una o más veces para preparar múltiples soluciones acuosas de excipiente que cada una contenga una concentración preseleccionada de excipiente, y después disolviendo la cantidad apropiada de agente liberador de histamina en cada solución acuosa de excipiente preparada obteniendo una o más soluciones comparativas que cada una tenga una concentración de agente liberador de histamina sustancialmente igual a la concentración de agente liberador de histamina en la solución de referencia.

Las soluciones comparativas que contienen concentraciones diferentes de una combinación de dos o más excipientes pueden utilizarse en el procedimiento de la presente invención igual que las soluciones comparativas que contienen concentraciones diferentes de sólo un excipiente. Esta dentro de la experiencia de una persona de experiencia en la técnica preparar soluciones comparativas múltiples, que contenga cada una una concentración preseleccionada diferente de dos o más excipientes diferentes. Por ejemplo, esto puede lograrse preparando múltiples soluciones comparativas diferentes que cada una tenga una concentración de sólo uno de los dos o más excipientes mientras que la concentración del/de los otro(s) excipiente(s) se mantendrá constante. De forma alternativa, pueden prepararse múltiples soluciones comparativas, que cada una tenga una concentración diferente de más de uno, o incluso todos los excipientes. Cuando el excipiente que se emplea en los procedimientos y formulaciones de la presente invención es una combinación de dos o más excipientes, lo único que se necesita es conocer la concentración de cada uno de los dos o más excipientes de cada solución comparativa.

Las etapas a) y b) de medir la agregación del agente liberador de histamina en la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s), pueden realizarse de muchas formas distintas. De forma ventajosa, la agregación puede medirse usando equipamiento y técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica.

### a) *Análisis de tensión superficial*

Según una técnica, se llevan a cabo las etapas a) y b) midiendo la agregación del liberador de histamina en solución acuosa usando el análisis de tensión superficial. Se describen generalmente procedimientos para medir la agregación por tensión superficial en Anacker, e. W. (1970), MICELLE FORMATION OF CATIONIC SURFACTANTS IN AQUEOUS MEDIA CATIONIC SURFACTANTS, E. Jungermann, Nueva York, Marcel Dekker; Inc.; Iwunze, M. O., Lambert, *et al.*, (1997), *Monatshefte fur CEIME* 128: 582-592; Atwood, d. y R. Natarajan (1979), *J. Pharm. Pharmacology* 32: 460-462; Moroi, Y *et al.*, (1990), *Journal of Physical Chemistry* 94: 842-845; y Rosen, M J., H. Mathias, *et al.*, (1999), *Langmuir* 15(21): 7340-73246, cuyas descripciones se incorporan a la presente memoria descriptiva por referencia en su integridad.

Cuando se mide la agregación por análisis de tensión superficial, la solución acuosa es preferiblemente agua (incluyendo agua deuterada), la cual puede ser de pH ajustado con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio si fuese necesario o deseable facilitar o estabilizar física y/o químicamente la solubilización de algunos liberadores de histamina en la solución acuosa durante suficiente tiempo para permitir la medición de la agregación del liberador de histamina usando el análisis de tensión superficial. Puesto que se reduce la tensión superficial de la mayoría de los líquidos con un incremento de temperatura, es necesario controlar la temperatura del sistema mientras se evalúa la tensión superficial de la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s).

Se puede medir la agregación del liberador de histamina en la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s) midiendo la tensión superficial de cada una de la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s) usando el procedimiento del anillo de Dunouy, como se describe en PHYSICAL PHARMACY: PHYSICAL CHEMICAL PRINCIPLES IN THE PHARMACEUTICAL SCIENCES, Editores: Alfred Martín, James Swarbrick, Arthur Cammarata, Tercer Edición, Lea Et Febiger, Filadelfia, 1983. La tensión superficial puede proporcionar una medición de la concentración crítica micelar del liberador de histamina en solución y por esta razón es un indicador de la agregación del liberador de histamina en la solución. Se puede identificar la concentración crítica micelar del liberador de histamina en una solución midiendo la tensión superficial de las soluciones que contienen concentraciones crecientes de liberador de histamina y que observan en un diagrama de la tensión superficial (eje y) respecto de la concentración de liberador de histamina (eje x), el punto en el cual una mayor concentración de liberador de histamina produce sustancialmente la misma tensión superficial o incluso una inferior a la tensión superficial de la concentración inferior anterior del liberador de histamina. La figura 1 es un diagrama de la tensión superficial de soluciones que contienen el liberador de histamina, el Compuesto 1, respecto de la concentración creciente del compuesto 1. Los datos consisten en una concentración crítica micelar en aproximadamente 15 mg/ml del Compuesto 1.

Se sabe que la tensión superficial de una solución que contiene un compuesto o un material que se agrega se reduce generalmente a medida que la concentración del compuesto o material en solución aumenta debido a la adsorción del compuesto o material en solución en la superficie de la solución. De este modo, como las concentraciones crecientes de liberador de histamina se añaden a una solución acuosa, la tensión superficial de la solución tenderá a reducirse a causa del incremento de la adsorción del liberador de histamina en la superficie de la solución hasta el punto en el que la superficie se satura. Otra adición del liberador de histamina a la solución dará como resultado la formación de agregados en la solución en masa. El un poco por encima de un intervalo estrecho de concentración donde se produce esta agregación o formación de micelas y esta es la concentración crítica micelar.

## ES 2 284 548 T3

Un diagrama de la tensión superficial de las soluciones comparativas que contienen una concentración constante de liberador de histamina y diversas concentraciones típicamente crecientes del excipiente, permitirá la observación de un extremo o una inversión de la tendencia reductora de la tensión superficial o una variación en la concentración crítica micelar del liberador de histamina. Se puede observar gráficamente un extremo de la tendencia reductora la tensión superficial mediante un cambio en la pendiente en el diagrama de tensión superficial respecto de la concentración. El extremo o la inversión de la tendencia reductora de la tensión superficial indica una reducción en la adsorción del liberador de histamina en la superficie de la solución en la solución comparativa comparado con la adsorción del liberador de histamina en la superficie de la solución en la solución de referencia. Esta reducción se correlaciona su vez con una reducción de agregación del liberador de histamina en solución.

Una variación en la concentración crítica micelar del liberador de histamina en la(s) solución(es) comparativa(s) es otro medio para identificar una reducción en la agregación de liberador de histamina por el análisis de tensión superficial. Se identifica una variación en la concentración crítica micelar del liberador de histamina en la solución comparativa mediante la observación de una mayor concentración crítica micelar del liberador de histamina en la solución de referencia. De este modo, se puede identificar una reducción en la agregación observando una concentración crítica micelar del liberador de histamina en la solución comparativa que se produce a una concentración superior de liberador de histamina que la concentración crítica micelar del liberador de histamina en la solución de referencia que no contiene sustancialmente excipiente fisiológicamente aceptable.

Con el objeto de comparar la agregación del liberador de histamina en la solución de referencia con la agregación del liberador de histamina en la(s) solución(es) comparativa(s), se pueden observar las propiedades de tensión superficial de las soluciones como un diagrama o curva de la tensión superficial (eje Y) respecto de la concentración de excipiente (eje x). La solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s) representan cada una un punto sobre la curva de tensión superficial respecto de concentración. De esta manera se pueden observar fácilmente las tendencias en la tensión superficial de las soluciones cuando se altera la concentración de excipiente (es decir se eleva o reduce).

### (b) Procedimientos de resonancia magnética nuclear (RMN)

Según otra técnica, se llevan a cabo las etapas a) y b) midiendo la agregación del liberador de histamina en solución acuosa usando espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN). Se describen los procedimientos para medir la agregación RMN en Wiedmer, S. K., M. L. Riekkola, *et al.*, (1997), *Analytical Chemistry* (69(8): 1577-1584 y Jonson, B., B. Lindman *et al.*, (1998), *SURFACTANTS AND POLYMERS IN AQUEOUS SOLUTION*. Chichester, John Wiley Et Sons, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria descriptiva por referencia en su integridad.

Los espectros RMN de protones del liberador de histamina en solución acuosa se pueden medir usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica de la espectroscopia RMN sobre un espectrómetro RMN convencional. Basándose en los espectros obtenidos, se pueden medir los cambios de desplazamiento químico (véase Y. S. Lee *et al.*, *Bull. Korean Chem Soc.*, 1993, 14(3) 392-398), los cambios de ancho de línea (véase, J. H. Bradbury, *et al.*, *Nature*, 1968, 218, 1049-1050; L Hwang, *et al.*; *J. Phys. Chem.*, 1988, 92, 4753-4758), la relajación (las constantes de velocidad de relajación  $T_1$  y  $T_2$ ) (véase, Y. S. *et al.*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 1993, 14 (3), 392-398; B. P. Hills, *et al.*, *Macromolecules*, 1991, 24, 2944-2950), y los coeficientes de difusión (véase K. F. Morris, *et al.*, *JACS* 1993; 115, 4291-4299; P. Stilbs, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 1987, 19, 1-45).

Típicamente se mide la agregación del liberador de histamina en la solución de referencia y la solución comparativa por relación RMN.

Existen dos tipos de relajación RMN, la relajación espín-red y la relajación espín-espín, denominadas respectivamente valores  $T_1$  y  $T_2$ .  $T_1$  y  $T_2$  son constantes de velocidad que miden la relajación de la magnetización RMN que vuelve al equilibrio (denominada de ahora en adelante colectivamente como "Velocidades de relajación RMN"). Para las pequeñas moléculas en las cuales se denomina límite extremo de estrechamiento, se incrementan tanto  $T_1$  como  $T_2$  en proporción inversa a la velocidad giratoria de volteo  $\tau_c$ , que a su vez, es directamente proporcional al tamaño medio del agregado. De este modo, para las pequeñas moléculas, los incrementos en las velocidades de  $T_1$  y  $T_2$  con la adición de excipiente a la solución que contiene el liberador de histamina, en ausencia de cambios significantes en la viscosidad de la solución, indica una reducción en la agregación.

Según una realización, las etapas a) y b) para medir la agregación del liberador de histamina en la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s) comprenden medir las velocidades de relajación RMN de protones del liberador de histamina en la solución de referencia y la solución comparativa.

La agregación del liberador de histamina en cada solución comparativa se mide y se compara con la medida de agregación del liberador de histamina en la solución de referencia. La comparación con la medida de agregación del liberador de histamina en la solución de referencia permitirá la rápida identificación de la(s) solución(es) comparativa(s) que exhiben una medida de agregación del liberador de histamina que es al menos aproximadamente un 25% inferior a la medida de agregación del liberador de histamina en la solución de referencia. La etapa para identificar la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable que es suficiente para reducir la agregación del liberador de histamina en la(s) solución(es) comparativa(s) en al menos aproximadamente un 25% comparado con la agregación del liberador de histamina en la solución de referencia se puede llevar a cabo después de comparar la agregación medida del liberador de histamina en cada una de la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s), ya que se

preselecciona o se conoce la concentración de excipiente en cada solución comparativa. De este modo, en una realización del procedimiento para determinar la concentración de excipiente, la etapa d) para identificar una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable que es suficiente para reducir la agregación del liberador de histamina en la solución de referencia, comprende identificar una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable suficiente para ralentizar las velocidades medidas de relajación RMN del liberador de histamina en la solución comparativa en al menos aproximadamente un 25%, más preferiblemente aproximadamente un 50% y más preferiblemente aproximadamente un 60%, comparado con las velocidades medidas de relajación RMN del liberador de histamina en la solución de referencia. Un tiempo más largo en segundos para los valores medidos  $T_1$  y  $T_2$  es indicativo de una velocidad de relajación más lenta. Como será evidente para los expertos en la técnica, se deberán tener en cuenta los cambios de viscosidad se habrán de cuando se mida la agregación con velocidades de relajación.

También se puede usar la resonancia magnética nuclear de carbono 13 en las etapas a) y b) para medir la agregación de la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s) para determinar concentraciones de excipiente que son apropiadas para la preparación de las formulaciones farmacéuticas de la invención. Este procedimiento implica que medir las velocidades de relajación o los desplazamientos químicos cambia el protón por el carbono y tiene una ventaja porque la relajación del carbono es típicamente menos complicada que la relajación de protones y de este modo es a menudo más fácil de interpretar. Sin embargo, hay que apuntar que RMC- $^{13}\text{C}$  es 100 veces menos sensible que RMN- $^1\text{H}$ . Además, las mediciones se pueden hacer para otros núcleos activos de RMN (es decir,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ ) si la estructura del liberador de histamina contiene estos núcleos. Los procedimientos anteriores para preparar soluciones, medir la agregación e identificar la concentración de excipiente apropiado para su uso en las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden aplicar también a RMN-C para otros núcleos activos de RMN.

Como se ha mencionado anteriormente, los coeficientes de difusión también se pueden medir por RMN y pueden proporcionar otra medida de agregación además de o en lugar de la medida de velocidades de relajación anteriormente mencionada. Los coeficientes de difusión reflejan cambios en el tamaño medio de agregado y/o el número de agregados y por lo tanto son una valiosa medida de agregación del liberador de histamina en la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s). Como será evidente para los expertos en la técnica, se deberán tomar en cuenta los cambios de viscosidad cuando se mida la agregación con coeficientes de difusión.

Los procedimientos anteriores para medir la agregación del liberador de histamina en la solución de referencia y la(s) solución(es) comparativa(s) e identificar una concentración de excipiente que es suficiente para reducir la agregación en al menos aproximadamente un 25% son ilustrativos de los procedimientos de la presente invención, pero no son exhaustivos de los posibles modos de llevar a cabo este procedimiento de la presente invención. Un experto en la técnica apreciará rápidamente las diversas maneras por las que la agregación del liberador de histamina se puede medir, como los ejemplos anteriores demuestran que cualquier técnica apropiada para medir la agregación de una molécula en una solución será también útil en los procedimientos de la presente invención para medir la agregación de un liberador de histamina. Los procedimientos adicionales (y las referencias que describen tales procedimientos) para medir la agregación incluyen los siguientes:

Tensión interfacial (véase Rosen M. J., J. H. Mathias, *et al.*, (1999), *Langmuir* 15(21): 7340-7346);

Dispersión luminosa (véase Anacker, E. W. (1970), MICHELLE FORMATION OF CATIONIC SURFACTANTS IN AQUEOUS MEDIA. CATIONIC SURFACTANTS, E. Jungermann, Nueva York, Marcel Dekker, Inc.; Attwood, D y R. Natarajan (1979), *J. Pharm. Pharmacology* 32: 460-462; Moroi, Y *et al.*, (1990), *Journal of Physical Chemistry* 94: 842-845; Moroi, Y., Y. Murata, *et al.*, (1992), *Journal of Physical Chemistry* 96: 8610-13; y Rosen, M. J. (1978), SURFACTANTS AND INTERFACIAL PHENOMENA, Nueva York, Wiley. Interscience);

Conductividad (véase Anacker (1970) *supra*; Attwood, D. y R. Natarajan (1979), *supra*; Moroi, Y., Y. Murata, *et al.*, (1992), *supra*; Streng, W. H., D. H. -S. Yu, *et al.*, (1996), *International Journal of Pharmaceutics* 135: 43:52; Iwunze, M. O., Lambert, *et al.*, (1997), *Monatshefte fur Chemie* 128: 582-592; Wiedmer, S. K., M. L. Riekkola, *et al.* (1997), *Analytical Chemistry* 69(8): 1577-1584; y Rosen (1978) *supra*);

Calorimetría (véase Paula, S., W. Sus, *et al.*, (1995), *Journal of Physical Chemistry* 99(30): 11742-11751; Streng, Yu *et al.*, (1996), *supra*; y Cooper, a., M. A. Nutley, *et al.*, (1998), *Analytical Chemistry* 70(23): 5024-5028);

Ultracentrifugación (véase Anacker (1970) *supra*; y Jonsson, B., B Lindman, *et al.*, (1998), SURFACTANTS AND POLYMERS IN AQUEOUS SOLUTION, Chichester, John Wiley Et Sons);

Espectroscopia ultrasónica, densimetría, dispersión luminosa elástica y cuasielástica, y dispersión de neutrones de ángulo pequeño y dispersión luminosa de Brillouin (véase D'Arrigo, G., F. Mallamace, *et al.*, (1991), *Physical Review A* 44(4): 2578-2587; y Rosen (1978) *supra*);

Mediciones de viscosidad (véase Anacker (1970) *supra*);

Índice refractivo (véase, Anacker (1970) *supra*; y Rosen (1978) *supra*);

Difracción por rayos X (véase, Anacker (1970) *supra*);

## ES 2 284 548 T3

Solubilización de colorante (véase, Anacker (1970) *supra*; y Rosen (1978) *supra*);

Espectroscopia fluorescente (véase, Iwunze (1997) *supra*; Rosen (1978) *supra*; y Jonson (1998) *supra*);

5 Electroforesis capilar (véase Wiedmer (1997) *supra*);

Potenciometría, espectrofotometría, y procedimientos cinéticos (véase Kopecky, F., *Pharmazie* 51 (3):135-144 (1996);

10 Osmometría (véase Streng, W. H. *Et al.*, (1996) *supra*; y Rosen (1978) *supra*), y

Microscopia, técnicas ópticas y no-ópticas (véase Binks, B. P., Ed. (1999) *Modern characterization Methods of surfactants systems SURFACTANTS SCIENCE SERIES* Nueva York, Marcel Dekker).

15 *Concentraciones de Excipientes*

Las concentraciones preferidas de excipiente(s) varían dependiendo de factores tales como la categoría de o el excipiente particular empleado y de si el excipiente es una combinación de dos o más excipientes.

20 En general, cuando el excipiente es una sal inorgánica divalente, la concentración del excipiente será al menos aproximadamente 15 mM, preferiblemente de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM, sin tener en cuenta si el excipiente se emplea sólo o en combinación con uno o más excipientes adicionales. En la realización de la invención en la cual el excipiente es una única sal inorgánica divalente, las concentraciones preferidas del excipiente serán de aproximadamente 25 mM a  
25 aproximadamente 75 mM y más preferiblemente aproximadamente 50 mM. En la realización en la cual el excipiente es cloruro de calcio, las concentraciones preferidas de excipiente serán de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM, y más preferiblemente aproximadamente 50 mM.

30 Cuando se emplea la sal inorgánica divalente en combinación con uno o más excipientes adicionales, la concentración de la sal inorgánica divalente puede ser inferior a aproximadamente 15 mM, particularmente como mínimo aproximadamente 10 mM, y es preferiblemente de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 75 mM y más preferiblemente a aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM.

35 En general, cuando el excipiente es un ácido carboxílico orgánico, la concentración del excipiente será al menos aproximadamente 15 mM, preferiblemente de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 300 mM, más preferiblemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM, sin tener en cuenta si el excipiente se emplea solo o en combinación con uno o más excipientes adicionales. En la realización de la invención en la cual el excipiente es un único ácido carboxílico orgánico, las concentraciones preferidas del excipiente serán de aproximadamente 25 mM a  
40 aproximadamente 75 mM y más preferiblemente aproximadamente 50 mM. En la realización en la cual el excipiente es ácido nítrico, las concentraciones preferidas de excipiente serán de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 200 mM, más preferiblemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 50 mM.

45 En la realización en la cual el excipiente es ácido fosfórico, la concentración del excipiente será típicamente de aproximadamente 6 mM a aproximadamente 10 mM, sin tener en cuenta si el excipiente se emplea solo o en combinación con uno o más excipientes adicionales.

50 En general, cuando el excipiente es un aminoácido, la concentración del aminoácido será al menos aproximadamente 5 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, y más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml a 30 mg/ml, sin tener en cuenta si el excipiente se emplea solo o en combinación con uno o más excipientes adicionales. En la realización de la invención en la cual el excipiente es un único aminoácido, las concentraciones preferidas del excipiente serán de aproximadamente 10 mg/ml aproximadamente 50 mg/ml, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 mg/ml, y aproximadamente 30 mg/ml, y más preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml. En particular  
55 cuando el excipiente es glicina o lisina, las concentraciones preferidas del excipiente serán de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, y más preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml.

60 Cuando el aminoácido se emplea en combinación con uno o más excipientes adicionales, la concentración del aminoácido puede ser inferior a aproximadamente 5 mg/ml, particularmente como mínimo 2 mg/ml, y preferiblemente de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml y más preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml.

65 La concentración de los aminoácidos se proporciona en unidades de mg/ml por razones prácticas, sin embargo, un experto en la técnica puede fácilmente calcular las concentraciones correspondientes de aminoácido en unidades mM usando el peso molecular de aminoácido particular empleado. Por ejemplo, el peso molecular de la glicina es 75, y según una concentración de 12,5 mg/ml de glicina corresponde a 166,5 mM.

## ES 2 284 548 T3

En la realización en la cual el excipiente es un agente quelante, la concentración del agente quelante será al menos aproximadamente un 0,02%, preferiblemente de aproximadamente un 0,02% a aproximadamente un 1%, más preferiblemente de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 0,5%, sin tener en cuenta si el excipiente se emplea solo o en combinación con uno o más excipientes adicionales. En la realización de la invención en la cual es excipiente es un único agente quelante, las concentraciones preferidas del excipiente serán de aproximadamente un 0,02% a aproximadamente un 1%, más preferiblemente de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 0,5%, y más preferiblemente aproximadamente un 0,1%. En particular, las concentraciones preferidas de EDTA estarán entre aproximadamente un 0,02% y aproximadamente un 1%, más preferiblemente de aproximadamente un 0,1% a aproximadamente un 0,5% y más preferiblemente aproximadamente un 0,1%. Los porcentajes están basados en el peso a menos que se indique otra cosa.

Cuando se emplea en combinación con uno o más excipientes adicionales, las concentraciones de los agentes quelantes son preferiblemente de aproximadamente un 0,05% a aproximadamente un 1% y más preferiblemente aproximadamente un 0,1%.

La concentración de los agentes quelantes se proporciona en unidades porcentuales por razones prácticas, sin embargo, un experto en la técnica puede calcular fácilmente las concentraciones correspondientes de agentes quelantes en unidades mM usando el peso molecular del agente quelante particular empleado. Por ejemplo, el peso molecular de EDTA (ácido libre) es 292,2, y de este modo una concentración del 0,1% de EDTA corresponde a 2,69 mM.

En la realización en la que el excipiente es albúmina, la concentración del excipiente será típicamente de aproximadamente 1 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 15 mg/ml, y más preferiblemente 10 mg/ml, sin tener en cuenta si el excipiente se emplea solo o en combinación con uno o más excipientes.

Además, para ilustrar concentraciones específicas del (los) excipiente(s) según la presente invención, se proporcionan las siguientes realizaciones que incluyen dos o más excipientes. En una realización, el excipiente es una combinación de ácido cítrico en una concentración no inferior a aproximadamente 15 mM, preferiblemente de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 100 mM y más preferiblemente aproximadamente 50 mM, y EDTA en una concentración de aproximadamente el 0,02% a aproximadamente el 1%, preferiblemente de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5% y más preferiblemente aproximadamente el 0,1%. En una realización preferida, el excipiente es una combinación de ácido cítrico en una concentración no inferior a aproximadamente 15 mM, preferiblemente de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 100 mM y más preferiblemente aproximadamente 50 mM, y cloruro de calcio en una concentración no inferior a aproximadamente 15 mM, preferiblemente de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM y más preferiblemente aproximadamente 50 mM. En una realización, el excipiente es una combinación de ácido cítrico en una concentración no inferior a aproximadamente 15 mM, preferiblemente de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 100 mM y más preferiblemente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml y más preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml. En una realización, el excipiente es una combinación de ácido cítrico en una concentración no inferior a aproximadamente 15 mM, preferiblemente de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 10 mg/ml y más preferiblemente aproximadamente 50 mM, glicina en una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml y más preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml, y EDTA en una concentración de aproximadamente el 0,2% a aproximadamente el 1%, preferiblemente de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5% y más preferiblemente el 0,1%. Otros ejemplos específicos de combinaciones de excipientes podrán ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica basándose en la descripción anterior para determinar concentraciones apropiadas y los ejemplos específicos.

### D. Combinar el Liberador de histamina y el Excipiente

Se puede llevar a cabo la etapa de combinar una cantidad terapéuticamente efectiva del liberador de histamina con la concentración de excipiente mediante cualquier medio apropiado conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el liberador de histamina y el excipiente se pueden mezclar en fase sólida. Alternativamente, el liberador de histamina o el excipiente se pueden solubilizar o suspender en un diluyente apropiado fisiológicamente aceptable. Y el otro componente se puede añadir al mismo y solubilizarse o suspenderse en el diluyente. En una realización preferida, el excipiente se solubiliza en un diluyente fisiológicamente aceptable y se añade el liberador de histamina a la solución que contiene el excipiente solubilizado en su interior. Si se desea, por razones de optimización de la formulación (como se describe más adelante), el pH de la solución que contiene el componente en el diluyente, es decir el excipiente o el liberador de histamina se puede ajustar antes de la adición del otro componente. En una realización preferida, el liberador de histamina y el excipiente se combinan solubilizando el excipiente en un diluyente fisiológicamente aceptable, ajustando el pH y a continuación añadiendo el liberador de histamina al diluyente y solubilizándose en su interior.

### E. Procedimientos para optimizar las formulaciones con pH

La agregación del liberador de histamina y la liberación de histamina *in vivo* puede verse afectada en algunas circunstancias por el pH. El pH de la formulación que contiene el liberador de histamina también puede desempeñar una función en la estabilización física y/o química de algunos liberadores de histamina en solución. Por ejemplo, algunos bloqueadores neuromusculares no esteroideos, tales como el compuesto 1, se sabe que son químicamente más

estables a pH ácido, preferiblemente un pH de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5. Por estas razones, puede ser deseable o ventajoso en algunos casos evaluar las soluciones comparativas y las mezclas de pH diferentes, con el objeto de optimizar las formulaciones farmacéuticas según la presente invención, y para maximizar la supresión de la liberación de histamina farmacéuticamente inducida.

5

De este modo, según una realización de la presente invención se optimiza la formulación farmacéutica para pH. El procedimiento para optimizar la formulación farmacéutica para pH comprende las etapas de: a) medir la agregación del liberador de histamina en una solución de referencia que consiste esencialmente en el liberador de histamina en una concentración de o por encima de la concentración crítica micelar en una solución acuosa; b) medir la agregación del liberador de histamina en una solución comparativa que consiste esencialmente en el liberador de histamina y una concentración preseleccionada o predeterminada del excipiente fisiológicamente aceptable en la solución acuosa en la cual la concentración del liberador de histamina en la solución comparativa es sustancialmente idéntica a la concentración del liberador de histamina en la solución de referencia, y en la cual la solución comparativa tiene un pH preseleccionado, c) repetir opcionalmente la etapa b) una o más veces con una solución comparativa que tiene sustancialmente la misma concentración o una concentración diferente preseleccionada de excipiente fisiológicamente aceptable y un pH diferente preseleccionado, y d) identificar el pH de la solución comparativa que proporciona la reducción óptima de agregación del liberador de histamina en la solución comparativa. El pH identificado de la etapa d) es el pH para preparar una formulación farmacéutica optimizada según la presente invención.

10

15

20

Según otra realización, la formulación farmacéutica preparada según los procedimientos de la presente invención se optimiza para el pH usando el procedimiento que comprende las etapas de: a) medir la liberación de histamina de una muestra biológica que contiene histamina en una mezcla de referencia que consiste esencialmente en: i) la muestra biológica que contiene histamina en un medio y ii) una solución acuosa del liberador de histamina a una concentración suficiente para provocar la liberación de histamina de la muestra biológica que contiene histamina; b) medir la liberación de histamina de la muestra biológica que contiene histamina en una mezcla comparativa que consiste esencialmente en: i) la muestra biológica que contiene histamina en un medio y ii) una solución acuosa del liberador de histamina y una concentración preseleccionada del excipiente fisiológicamente aceptable, en la cual el liberador de histamina en la mezcla comparativa está presente en una concentración que es sustancialmente idéntica a la concentración del liberador de histamina en la mezcla de referencia de la etapa a) y en la cual la mezcla comparativa tiene un pH preseleccionado; c) repetir opcionalmente la etapa b) una o más veces con una mezcla comparativa que tiene sustancialmente la misma concentración o una concentración diferente preseleccionada de excipiente fisiológicamente aceptable y un pH diferente preseleccionado, y d) identificar el pH de la mezcla comparativa que proporciona la reducción óptima de liberación de histamina de la muestra biológica que contiene histamina en la mezcla comparativa. El pH identificado de la etapa d) es el pH para preparar una formulación farmacéutica optimizada según la presente invención.

25

30

35

Basándose en los ejemplos anteriores, un experto en la técnica puede enseñar las explicaciones anteriores para optimizar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención sin tener en cuenta el procedimiento empleado para determinar la concentración del excipiente. La presente invención contempla expresamente la utilización de tales procedimientos para optimizar el pH de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención.

40

Sin embargo, la formulación farmacéutica óptima tendrá también en cuenta el efecto del pH de la formulación sobre la estabilidad del liberador particular de histamina en la formulación. Como se ha indicado anteriormente, algunos liberadores de histamina son más estables física y/o químicamente a pH ácido. Otros liberadores de histamina pueden ser más estables física y/o químicamente a pH básico.

45

Como será evidente para los expertos en la técnica, las formulaciones farmacéuticas preparadas según los procedimientos de la presente invención se pueden ajustar para el pH valorando formulaciones de liberador de histamina y excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s) con un agente apropiado para ajustar el pH. Los agentes apropiados para ajustar el pH serán evidentes para los expertos en la técnica y pueden incluir por ejemplo ácidos, bases, tampones de pH y sales.

50

Típicamente, el pH de las formulaciones farmacéuticas optimizadas de la presente invención se ajustarán lo necesario para obtener un pH de la formulación farmacéutica que está entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10. en una realización preferida, el pH de la formulación farmacéutica optimizada estará entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8. en una realización preferida, el pH de la formulación farmacéutica optimizada estará entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, más preferiblemente entre aproximadamente 2 y 4. Para el compuesto 1, la formulación farmacéutica optimizada tendrá típicamente un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 4, y más preferiblemente aproximadamente 3.

55

#### 60 IV. Formulaciones

Las formulaciones farmacéuticas preparadas según el procedimiento anterior de la presente invención pueden incluir sólo la cantidad terapéuticamente efectiva del liberador de histamina y la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable. Sin embargo, en las realizaciones preferidas, las formulaciones farmacéuticas de la invención incluyen también un diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable. El diluyente facilita la distribución del liberador de histamina y el excipiente al animal tratado con el mismo. La selección de un diluyente apropiado dependerá del tipo de formulación farmacéutica (por ejemplo, solución, dispersión, emulsión, etc.) y se determina fácilmente por los expertos en la técnica de las ciencias farmacéuticas.

65

## ES 2 284 548 T3

Las formulaciones farmacéuticas de la invención están en forma de administración parenteral, y preferiblemente en forma apropiada para la administración intravenosa. Las formulaciones apropiadas para la administración intravenosa incluyen soluciones estériles acuosas de inyección, suspensiones estériles acuosas y no acuosas, y emulsiones estériles.

5 Las soluciones estériles acuosas de inyección comprenden típicamente el liberador de histamina y el excipiente en un diluyente fisiológicamente aceptable tal como agua para inyección, cloruro sódico para inyección, o dextrosa para inyección. Las soluciones estériles de inyección también pueden contener otros aditivos fisiológicamente aceptables tales como otros ácidos (por ejemplo ácido clorhídrico) y bases (por ejemplo hidróxido sódico) para ajuste de pH, tampones de pH, y cosolventes. Los ejemplos de cosolventes apropiados que se pueden emplear en las formulaciones  
10 de la presente invención incluyen pero no se limitan a etanol, propilenglicol, alcohol bencílico y las combinaciones de los mismos. Otros aditivos apropiados serán evidentes para los expertos en la técnica. Las soluciones estériles de inyección se pueden preparar usando técnicas convencionales de las ciencias farmacéuticas.

15 Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir, además del liberador de histamina, excipiente, diluyente, y aditivos previamente mencionados, agentes de suspensión y agentes espesantes, y liposomas u otros sistemas microparticulados. Las suspensiones estériles no acuosas, pueden emplear agua, parabenos, glicerol, aceite de soja, aceite de cártamo, y similares y también las combinaciones de los mismos como el diluyente. Las suspensiones se pueden preparar usando técnicas conocidas en la técnica de las ciencias farmacéuticas.

20 Las emulsiones estériles pueden incluir emulsiones de aceite en agua y emulsiones de agua en aceite. Las emulsiones pueden incluir glicerol, aceite de soja, aceite de cártamo, y similares y las combinaciones de los mismos como la fase aceite. Las emulsiones estériles se pueden preparar usando técnicas conocidas en la técnica de las ciencias farmacéuticas. Las emulsiones también pueden incluir los otros aditivos previamente mencionados.

25 Las formulaciones también se pueden presentar como sólidos liofilizados para su reconstitución. Tales formulaciones liofilizadas se reconstituyen típicamente con agua para inyección, cloruro sódico para inyección o solución de dextrosa. Las formulaciones liofilizadas pueden incluir agentes de carga de liofilización convencionales tales como  $\beta$ -ciclodextrina y lactosa. Tales formulaciones se presentan típicamente en formas unitarias de dosificación tales como viales o dispositivos de inyección desechables. También se pueden presentar en formas multidosis tales como botellas  
30 a partir de la cual se puede extraer la dosis apropiada. Todas las formulaciones de este tipo deberían ser estériles.

La dosificación apropiada del liberador de histamina para su inclusión en las formulaciones de la invención dependerá del efecto terapéutico deseado. Ventajosamente, se pueden emplear las dosificaciones convencionales del liberador de histamina en los procedimientos y las formulaciones de la presente invención.

35 Las formulaciones preferidas de la presente invención incluyen un Compuesto 1, como el liberador de histamina y uno o más excipientes, en una forma apropiada para administración intravenosa. Los excipientes preferidos para su uso en las formulaciones de la presente invención se pueden seleccionar entre el grupo constituido por sales inorgánicas divalentes, ácidos carboxílicos orgánicos, ácido fosfórico, aminoácidos, agentes quelantes, albúminas y las combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, la formulación también incluye un diluyente seleccionado a partir del grupo constituido de agua para inyección, cloruro sódico para inyección y soluciones de dextrosa. La concentración de bloqueador neuromuscular es típicamente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 55 mM. La concentración apropiada de excipiente se determina según los procedimientos anteriores.

45 En una realización preferida, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-{(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio}propil}-4-3[1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mM, más preferiblemente aproximadamente 50 mM.

50 En una realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-{(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio}propil}-4-3[1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con EDTA en una concentración de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%, más preferiblemente aproximadamente el 0,1%.

60 En una realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-{(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio}propil}-4-3[1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con una combinación de ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mM, más preferiblemente aproximadamente 50 mM y EDTA en una concentración de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%, más preferiblemente aproximadamente el 0,1%.

65 En una realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-{(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio}propil}-4-3[1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con cloruro sódico en una concentración de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mM, más preferiblemente aproximadamente 50 mM.

## ES 2 284 548 T3

En una realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-[(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-3[1S, 2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con una combinación de ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mM, más preferiblemente aproximadamente 50 mM y cloruro sódico en una concentración de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mM, más preferiblemente aproximadamente 50 mM.

En una realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-[(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-3[1S, 2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con glicina en una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml.

En una realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-[(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-3[1S, 2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con una combinación de glicina en una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml, y EDTA en una concentración de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%, más preferiblemente aproximadamente el 0,1%.

En una realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-[(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-3[1S, 2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con una combinación de glicina en una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml, y ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mM, más preferiblemente aproximadamente 50 mM.

En una realización, la formulación comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-[(1R2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-3[1S, 2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con una combinación de glicina en una concentración de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, preferiblemente aproximadamente 12,5 mg/ml, ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 25 a aproximadamente 75 mM, más preferiblemente aproximadamente 50 mM y EDTA en una concentración de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,5%, más preferiblemente el 0,1%. Los ejemplos específicos anteriores particularmente preferidos de las formulaciones farmacéuticas son formulaciones que tienen un pH entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, más preferiblemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 y más preferiblemente aproximadamente 3. en las formulaciones anteriormente mencionadas, el ajuste de pH a los intervalos indicados puede o no puede ser necesario dependiendo de los excipientes particulares y las concentraciones empleados.

### V. Procedimientos para suprimir la liberación de histamina

Se proporcionan también procedimientos para suprimir la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en un animal tratado con un liberador de histamina. “Liberación de histamina farmacéuticamente inducida” tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a la liberación de histamina *in vivo* que es inducida o al menos parcialmente producida por la administración intravenosa rápida de bolo o la administración rápida de infusión de un liberador de histamina. Se describe la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en Goodmann Et Gilman’s THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 9ª Ed. McGraw-Hill, Nueva York (1966), pp. 581-593.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, “suprimir la liberación de histamina farmacéuticamente inducida” significa prevenir sustancialmente por completo la liberación de histamina o reducir la cantidad o la velocidad de liberación de histamina de las células, los tejidos o los fluidos que contienen histamina *in vitro* previa exposición a un liberador de histamina; o prevenir sustancialmente por completo la liberación de histamina o reducir la cantidad o la velocidad de liberación de histamina de las células, los tejidos o los fluidos que contienen histamina *in vivo* previa administración de una formulación que contiene un liberador de histamina a un animal. Más específicamente, “supresión de la liberación de histamina farmacéuticamente inducida” *in vivo* se refiere a la supresión de la liberación de histamina *in vivo* previa administración intravenosa de un liberador de histamina en forma de un bolo rápido o una infusión rápida. La supresión de la liberación de histamina farmacéuticamente inducida se puede observar cualitativa y/o cuantitativamente.

La liberación de histamina farmacéuticamente inducida se puede observar cualitativamente administrando por vía intravenosa un bolo rápido o una infusión rápida del liberador de histamina al animal y observando las manifestaciones físicas descritas anteriormente, que están asociadas a concentraciones elevadas de plasma y/o tejido de histamina. La supresión de la liberación de histamina farmacéuticamente inducida, se observa por lo tanto cualitativamente administrando por vía intravenosa al animal tratado, un bolo rápido o una infusión rápida de cualesquiera formulaciones farmacéuticas de la presente invención y observando comparativamente las manifestaciones fisiológicas menos severas, o incluso una ausencia de las manifestaciones fisiológicas, asociadas a los niveles elevados de histamina en plasma y/o en tejidos.

## ES 2 284 548 T3

La supresión de la liberación de histamina farmacéuticamente inducida se puede observar cuantitativamente administrando por vía intravenosa al animal tratado un bolo rápido o una infusión rápida de la formulación farmacéutica según la presente invención y observando, y midiendo los niveles de histamina en plasma y/o tejidos presentes en el animal después de la administración. Los niveles de histamina en plasma presentes en el animal después de la administración se pueden medir extrayendo una muestra de sangre del animal después de la administración de la formulación farmacéutica. La muestra de sangre se extrae preferiblemente de la región de o cerca del sitio de administración de la formulación farmacéutica. Los niveles de histamina en tejidos presentes en el animal después de la administración se pueden medir tomando una muestra de tejido del animal después de la administración de la formulación farmacéutica. La muestra se toma preferiblemente de la región de o cerca del sitio de administración de la formulación farmacéutica. Los niveles de histamina presentes en la muestra de plasma o de tejido se pueden medir usando las técnicas descritas anteriormente para detectar la liberación de histamina de una muestra biológica, por ejemplo los ensayos ELISA, RIA y fluorométricos.

En general, los procedimientos para suprimir la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en un animal tratado con un liberador de histamina comprende administrar al animal, cualquier formulación farmacéutica según la presente invención. En los procedimientos preferidos, la formulación farmacéutica incluirá un excipiente seleccionado entre el grupo constituido por sales inorgánicas divalentes ácidos carboxílicos orgánicos, ácido fosfórico, aminoácidos, agentes quelantes, albúminas y las combinaciones de los mismos.

La etapa de administrar comprende administrar por vía parenteral la formulación farmacéutica al animal, más preferiblemente, administrar por vía intravenosa la formulación farmacéutica, y más preferiblemente administrar por vía intravenosa la formulación farmacéutica en forma de un bolo rápido o una infusión rápida. Las formulaciones de la presente invención permiten ventajosamente la administración intravenosa en forma de un bolo rápido o una infusión rápida, a la par que suprime la liberación concomitante de histamina que se observa típicamente con la administración de las formulaciones convencionales de los liberadores de histamina por esta técnica.

Más específicamente, un procedimiento para suprimir la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en un animal tratado con un liberador de histamina comprende administrar a un animal que lo requiere, una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del liberador de histamina y una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable cuya concentración, cuando se combina en una solución acuosa con el liberador de histamina en o por encima de la concentración crítica micelar, es suficiente para la agregación del liberador de histamina en la solución acuosa en al menos aproximadamente un 25% comparado con la agregación del liberador de histamina en una solución acuosa que no contiene sustancialmente ningún excipiente fisiológicamente aceptable.

Otro procedimiento para suprimir la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en un animal tratado con un liberador de histamina comprende administrar a un animal que lo requiere, una formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del liberador de histamina y una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable cuya concentración, está determinada por el procedimiento que comprende las etapas de a) medir la agregación del liberador de histamina en una solución de referencia que constituye esencialmente el liberador de histamina en una concentración en o por encima de la concentración crítica micelar en una solución acuosa; b) medir la agregación del liberador de histamina en una solución comparativa que constituida esencialmente por el liberador de histamina y una concentración preseleccionada del excipiente fisiológicamente aceptable en la solución acuosa, en la cual la concentración del liberador de histamina en la solución comparativa es sustancialmente la misma que la concentración del liberador de histamina en la solución de referencia; c) repetir opcionalmente la etapa b) una o más veces con una solución comparativa que tiene una concentración preseleccionada diferente del excipiente fisiológicamente aceptable, d) identificar una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable que es suficiente para reducir la agregación del liberador de histamina en la solución comparativa en al menos aproximadamente un 25% comparado con la agregación del liberador de histamina en la solución de referencia; en la cual la concentración identificada de la etapa d) es la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable que es suficiente para suprimir la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en un animal tratado con un liberador de histamina y es la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable para combinar con el liberador de histamina para preparar la formulación farmacéutica para su administración al animal tratado con la misma.

La liberación de histamina *in vivo* se puede producir de manera distinta entre y dentro de las especies animales (por ejemplo se pueden ver implicados diferentes sitios y diferentes animales pueden tener diferentes sensibilidades). Por consiguiente, los procedimientos de tratamiento se pueden optimizar por un experto en la técnica, para una especie particular o un sujeto individual. Los procedimientos de tratamiento son útiles para el tratamiento de diversos animales, preferiblemente mamíferos, incluyendo los seres humanos, los perros y los primates. (por ejemplo, los monos) y más preferiblemente los humanos.

Igualmente se proporcionan procedimientos para prevenir los efectos cardiovasculares y respiratorios mediados por la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en un animal tratado con liberador de histamina. "Efectos cardiovasculares y respiratorios mediados por la liberación de histamina farmacéuticamente inducida" tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a efectos cardiovasculares y respiratorios inducidos por niveles elevados de histamina en plasma y/o en tejido, es decir niveles de histamina en plasma y en tejido por encima de los niveles fisiológicos normales. Tales efectos cardiovasculares y respiratorios inducidos por la histamina pueden incluir, pero no limitarse a sofocos, hipotensión, taquicardia, broncoconstricción, reacciones anafilactoides y choque anafiláctico, y las combinaciones de cualesquiera dos o más de los anteriores.

## ES 2 284 548 T3

El término “prevenir” o “prevención” tal como se usa en la presente memoria descriptiva con referencia a una afección particular se refiere a una reducción en la incidencia y/o en la severidad de la afección, así como al evitar la afección.

5 El procedimiento para prevenir los efectos cardiovasculares mediados por la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en un animal tratado con un liberador de histamina comprende administrar al animal, cualquier formulación farmacéutica según la presente invención. Suprimiendo la liberación de histamina típicamente inducida por la administración intravenosa de un bolo rápido o una infusión rápida de un liberador de histamina se previenen los efectos cardiovasculares no deseables que tiene como resultado niveles elevados de histamina en plasma y en tejidos.

10 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva “mM” significa milimolar; “nm” significa nanomolar; “mg/ml” significa miligramos por mililitro; “%” significa porcentaje en peso, “NaCl” significa cloruro sódico, “D20” significa agua deuterizada; “salina D20” significa solución salina deuterizada; “NaOD” significa hidróxido sódico deuterizado; “DCI” significa ácido clorhídrico deuterizado; “d<sub>4</sub>-citrate” significa ácido cítrico deuterizado; “CaCl<sub>2</sub>” significa cloruro cálcico; “pD” significa pH incorrecto para el efecto del isótopo de deuterio; “μl” significa microlitro; “μm” significa micrómetro; “MHz” significa megahercio; “ppm” significa partes por millón, “°C” significa grados centígrados; “mmHg” significa milímetros de mercurio; y “Compuesto 1” significa dicloruro de (Z)-2-cloro-1-{3-[(1R,2S)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-3[1S,2R)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butenedioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

### Ejemplo 1

#### *Análisis de tensión superficial*

25 Las propiedades de la tensión superficial del agente liberador de histamina se pueden evaluar usándole el procedimiento del *anillo de DuNouy*. Este y otros procedimientos para evaluar las propiedades de la tensión superficial son descritos en la literatura. Véase PHYSICAL PHARMACY: PHYSICAL CHEMICAL PRINCIPLES IN THE PHARMACEUTICAL SCIENCES, Editores: Alfred Martín, James Swarbrick, Arthur Cammarata, Tercera Edición, Lea Et Febiger, Filadelfia, 1983.

30 El tensiómetro de DuNouy, comercialmente disponible en Krüss GMBH, Hamburgo Alemania, se usa para medir la tensión superficial e interfacial de los líquidos. El principio del instrumento depende del hecho de que la fuerza necesaria para desprender un anillo de platino-iridio sumergido en la superficie es proporcional a la tensión superficial.

La fuerza requerida para desprender el anillo de esta manera es proporcionada por un alambre de torsión y se registra en dinas en un cuadrante calibrado. La tensión superficial es dada por la fórmula

$$40 \quad \gamma = \frac{\text{lectura del cuadrante en dinas}}{2 \times \text{circunferencia del anillo} \times \text{factor de corrección}}$$

donde la circunferencia del anillo y el factor de corrección son equipamiento específico.

45 La tensión superficial de la mayoría de los líquidos se reduce casi linealmente con un incremento de temperatura, y de este modo es necesario controlar la temperatura del sistema cuando se llevan a cabo determinaciones de tensión superficial.

50 El tensiómetro se calibra con el agua filtrada y la tensión superficial de una solución de 50 mg/ml de Compuesto 1 en agua se evalúa a temperatura ambiente. La solución se diluye para obtener soluciones que tienen las siguientes concentraciones (mg/ml) de compuesto 1: 47,5, 45, 42,5, 40, 37,5, 35, 32,5, 30, 27,5, 25, 22,5, 20, 17,5, 15, 12,5, 10, 5,3, 2 y 1.

55 La tensión de superficie de cada solución se evalúa a temperatura ambiente y los resultados se registran en una curva de tensión de superficie (eje Y) : concentración de fármaco (eje x). Los resultados se indican en la figura 1. La figura 1 indica que el compuesto 1 es activo en superficie a dosis terapéuticamente efectivas y descubre concentraciones una reducción de la tensión superficial dependiente de la concentración.

60 En referencia a la figura 1, el cambio de pendiente del gráfico de tensión superficial con una concentración creciente del Compuesto 1, que se produce a aproximadamente 15-17,5 mg/ml indica la concentración crítica micelar del Compuesto 1 en agua.

65

## Ejemplo 2

*El análisis RMN de protón*5 *A. Procedimientos generales*

El Compuesto 1 y el excipiente (en las diversas cantidades indicadas más adelante) se disuelven en 200  $\mu$ l de D<sub>2</sub>O con 0,15 M NaCl ajustado a pD 3,0 con NaOD y/o DCI por razones de estabilidad del compuesto. Se usa solución salina deuterizada en la solución de referencia porque los picos (o señales) críticos del compuesto se solapan cuando se emplea agua deuterizada. Se preparan muestras en una serie de valoración por diluciones en serie. Todos los espectros RMN se registran a 30°C en un espectrómetro Varian Unity Plus 500 MHz. Los espectros están referenciados como D<sub>2</sub>O a 4,65 ppm. Todos los espectros se procesan usando el software v6 1<sup>a</sup> de Viran VNMR<sup>®</sup>. Las velocidades de relajación T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> se miden usando los experimentos estándar de inversión-recuperación de Carr-Purcell-Meiboom-Gill respectivamente, siendo ambos provistos por el software Varian. Se describen los experimentos CPMG en M. Bulsing, *et al.*, *J. Chem. Soc. Chem. Común.* 1201-3 (1981); R. Freeman *et al.*, IN DYNAMICS NMR SPECTROSCOPY, Eds L. Jakman y F. Cotton (1975), pp 131-162, Academic Press, Londres y Nueva York, y D. Rabenstein *et al.*, *J. Magn. Reson.* 64:541-546 (1985).

20 *B. Determinación de la concentración de Compuesto 1 para la solución de referencia*

Se preparan una serie de soluciones con concentraciones crecientes de Compuesto 1 en solución salina D<sub>2</sub>O, pD3,0 y se miden las constantes de velocidad de relajación RMN Se mide las dos T<sub>1S</sub> y T<sub>2S</sub> porque el fármaco, con un peso molecular de 1064,1, podría encontrarse fuera del límite extremo de estrechamiento de movimiento para RMN, en cuyo caso se esperaría que T<sub>1S</sub> se redujera y que T<sub>2S</sub> se incrementara con una reducción en la agregación. Véase K. Wüthrich, NMR OF PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS (1986) John Wiley Et Sons, Nueva York. Sin embargo, los datos muestran un incremento tanto en T<sub>1S</sub> como en T<sub>2S</sub> con agregación en descenso, que indica que el fármaco sigue estando dentro del límite extremo de estrechamiento de movimiento en estas condiciones. La Tabla 1 resume los valores T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> para el protón vinilo del Compuesto 1 que está situado en el centro de la molécula y se observa para exhibir los grandes cambios.

30

TABLA 1

Conc. Fármaco	pD	NaCl (mM)	T <sub>1</sub> (segs)	T <sub>2</sub> (segs)
160	3	150	0,83	0,13
80	3	150	1,20	0,38
40	3	150	2,49	1,96
20	3	150	2,30	2,04
10	3	150	2,05	--

Los datos muestran que tanto los valores T<sub>1</sub> como T<sub>2</sub> cambian a medida que la concentración de fármaco aumenta. Aunque se estaría tentado en atribuir una parte del cambio en T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> a un aumento esperado en la viscosidad de la solución con concentración creciente de fármaco (esto se observó visualmente), tal cambio sería lineal en proporción con el cambio en la concentración de fármaco. Los datos muestran un cambio relativamente pequeño en los valores T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> entre 80-160 mM de fármaco. La reducción pronunciada de T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> es una evidencia de que la concentración crítica micelar del Compuesto 1 en la solución salina D<sub>2</sub>O se encuentra entre 40-80 mM. Por esta razón se seleccionó una concentración de 80 mM como la concentración del fármaco para la solución de referencia.

55

*C. Excipiente de ensayo: Ácido cítrico*

Se prepararon una serie de soluciones que contienen 80 mM del compuesto 1 con concentraciones crecientes de d<sub>4</sub>-citrato en solución salina D<sub>2</sub>O pD 3,0, y se midieron las velocidades de relajación RMN. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 2 y se representan gráficamente en la figura 2.

65

ES 2 284 548 T3

TABLA 2

Conc. Fármaco (mM)	pD	NaCl (mM)	D <sub>4</sub> -Citrato (mM)	T <sub>1</sub> (segs)	T <sub>2</sub> (segs)
80	3	150	100	1,96	0,85
80	3	150	50	2,13	1,31
80	3	150	25	2,03	0,87
80	3	150	12,5	2,09	1,01
80	3	150	6,25	1,24	0,69
80	3	150	3,13	1,69	0,67
80	3	150	1,56	1,65	0,59
80	3	150	0,78	1,53	0,57
80	3	150	0	1,20	0,38

Los datos muestran que tanto los valores de T<sub>1</sub> como de T<sub>2</sub> aumentan con concentración creciente de d<sub>4</sub>-citrato. Esta tendencia es indicativa de la agregación de reducción con un efecto máximo obtenido a 50 mM de d<sub>4</sub>-citrato. Los cambios de viscosidad se descuentan como teniendo un efecto mínimo sobre los valores T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> medidos, porque no se tienen noticia de cambios visibles en la viscosidad y no se espera que la adición de d<sub>4</sub>-citrato a una solución salina en estas concentraciones altere sustancialmente la viscosidad.

Los datos muestran que una concentración de 50 mM de d<sub>4</sub>-citrato exhibió velocidades de relajación al menos un 25% más lentas que la velocidad de relajación de la solución de referencia que contiene la misma concentración del fármaco (un mayor tiempo en segundos para los valores T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> medidos es indicativo de una velocidad de relajación más lenta, que es indicativa de agregación reducida). De este modo, el ácido cítrico a una concentración de 50 mM es un excipiente apropiado para reducir la agregación del Compuesto 1 en solución.

D. Excipiente de ensayo: Ácido cítrico + Cloruro cálcico

Se prepararon una serie de soluciones que contenían 80 mM del Compuesto 1 y concentraciones variables de CaCl<sub>2</sub> y d<sub>4</sub>-citrato en solución salina D<sub>2</sub>O, pD 3,0, y se midieron las velocidades de relajación RMN. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 3.

TABLA 3

Conc, Fármaco (mM)	pD	NaCl (mM)	D <sub>4</sub> -Citrato (mM)	CaCl <sub>2</sub> (mM)	T <sub>2</sub> (segs)
80	3	150	0,78	100	2,78
80	3	150	50	100	2,26
80	3	150	5	100	2,14
80	3	150	5	50	1,94
80	3	150	5	25	1,89
80	3	150	5	12,5	1,51
80	3	150	5	6,25	1,47
80	3	150	5	3,13	1,45
80	3	150	0	0	1,2

## ES 2 284 548 T3

Como se puede ver a partir de los datos, todas excepto las dos concentraciones más bajas de  $\text{CaCl}_2$  producen un cambio en el valor  $T_1$  (es decir una ralentización de la velocidad de relajación) que es superior al 25% comparado con la velocidad de relajación de la solución de referencia que contiene la misma concentración del Compuesto 1. Este resultado indica que las combinaciones de cloruro cálcico y de ácido cítrico a estas concentraciones son suficientes para reducir la agregación del Compuesto 1 en al menos aproximadamente el 25%.

Los resultados obtenidos indican los excipientes a las concentraciones indicadas que producen un cambio en el valor  $T_1$  (es decir una ralentización de la velocidad de relajación) que es superior al 25% comparado con la velocidad de relajación de la solución de referencia que contiene la misma concentración de fármaco. Este resultado indica que estos excipientes y estas combinaciones de excipientes son suficientes para reducir la agregación del Compuesto 1 en solución en al menos aproximadamente el 25%.

### Ejemplo 3

#### 15 *Estudios in vitro de Células 2H3 de leucemia basofílica de rata (RBL)*

Se evalúa la histamina liberada por el Compuesto 1, en ausencia y presencia de excipientes añadidos usando células 2H3 de leucemia basofílica de rata (RBL). RBL 2H3 es una línea de mastocitos que almacena la histamina conseguida. Las células RBL 2H3 ( $8 \times 10^4$  células) se siembran en una placa de 96 pocillos durante una noche y se trata con una formulación que contiene 160 mM del Compuesto 1 y diversas concentraciones de ácido cítrico (0, 5, 10, 25 y 50 mM) en agua destilada a pH 3, durante 30 minutos a 37°C antes de recoger el medio libre de células. El control, que usa los mismos cultivos de células el mismo día, implica exponer las células a una formulación que contiene 160 mM de fármaco y 0 mM de ácido cítrico en agua destilada a pH 3. La histamina se cuantifica usando el kit de ensayo de histamina (ELISA) disponible comercialmente en Immunotech.

Los datos obtenidos son representados gráficamente en la figura 2.

La figura 2 muestra los efectos, en términos de porcentaje de la liberación de histamina farmacéuticamente inducida, producida por el fármaco, respecto del control, de las diversas concentraciones de ácido cítrico en la inhibición de la liberación de histamina a partir de las células RBL *in vitro*. La figura 2 muestra una relación inversa entre las concentraciones creciente de ácido cítrico y el porcentaje de histamina liberada a partir de las células RBL.

La figura 2 muestra también una relación inversa entre la liberación de histamina observada en las células RBL con concentración creciente de ácido cítrico y la agregación del Compuesto 1, como lo indica la velocidad de relajación RMN ( $T_1$ ) en soluciones que contienen las concentraciones correspondientes de ácido cítrico.

### Ejemplo 4

#### 40 *Estudios de la sangre humana*

La liberación de histamina inducida por el Compuesto 1 se cuantifica en ausencia y presencia de diversos excipientes en la sangre periférica (venosa) obtenida de donantes humanos. La sangre se hepariniza al ser recogida y se diluye en una relación de 1:1 con tampón salino. Se preparan soluciones de excipiente como soluciones acuosas a pH 3 y pH 7 solubilizando la cantidad apropiada del excipiente específico en agua para preparar una solución con la concentración deseada de excipiente. Se añade entonces una cantidad suficiente del Compuesto 1 a cada solución de excipiente para obtener una formulación que contiene 40 mM de fármaco y la concentración especificada de excipiente. Las formulaciones se ensayan tanto a pH 3 como a pH 7 para evaluar los efectos del fármaco en sangre una vez que la formulación es tamponada por la sangre.

Se incuba la sangre diluida con las formulaciones preparadas durante 5 minutos a 37°C antes de recoger el medio libre de células. Se lleva a cabo un control de la misma manera, usando una formulación que contiene la misma concentración del fármaco y sin excipientes adicionales. Se mide la cantidad de histamina en el medio utilizando un kit de inmunoensayo (ELISA) comercialmente disponible en Immunotech. Los resultados obtenidos para cada formulación están representados en la siguiente Tabla 5 en términos de, porcentaje de inhibición de liberación de histamina al pH indicado basado en el control.

60

65

ES 2 284 548 T3

TABLA 5

Conc. de Solución de Excipiente	% Inhibición de liberación de Histamina	
	pH 3	pH 7
glicina 12,5 mg/ml	75,2 ± 2,1	30,4 ± 2,5
EDTA-Na <sub>2</sub> al 0,1%	14,1 ± 8,3	10,4 ± 5,6
glicina 12,5 mg/ml + EDTA-Na <sub>2</sub> al 0,1%	45,4 ± 1,3	48,4 ± 1,7
glicina 12,5 mg/ml + ácido cítrico 50 mM	44,3 ± 4,0	40,7 ± 0,7
ácido cítrico 50 mM + EDTA-Na <sub>2</sub> al 0,1%	37,9 ± 5,7	37,4 ± 1,6
ácido cítrico 50 mM	90,8 ± 14,6	3,5 ± 0,9
ácido succínico 50 mM	77,5 ± 15,4	7,2 ± 14,6
ácido glucurónico 50 mM	66,9 ± 9,5	16,8 ± 8,5
ácido L-tartárico 50 mM	65,1 ± 13,1	0
ácido fosfórico 50 mM	60,4 ± 13,2	2,1 ± 8,8
ácido acético	59,9 ± 17,5	3,5 ± 0,6
ácido maleico 50mM	56,3 ± 7,9	0
10mg/ml de albúmina de suero bovino	39,8 ± 5,5	no testado
lisina	25,8 ± 5,9	0
ácido D-aspártico 0,32mg/ml	13,6 ± 7,7	0
arginina 12,5 mg/ml	0	30,4 ± 1,8
sulfato magnésico 50 mM	0	9,5 ± 2,6
Los colores se expresan como medias ± SE de experimentos duplicados. *La inhibición se expresa como un porcentaje de la liberación de histamina por el control del compuesto 1 en el mismo ensayo.		

Los resultados representados en la Tabla 5 indican que diversas formulaciones suprimen la liberación de histamina en la sangre humana. Los resultados demuestran que este procedimiento es útil para detectar diferentes excipientes a diferentes concentraciones y en diferentes condiciones de pH para determinar los excipientes y concentraciones y pH apropiados para un fármaco dado.

Ejemplo 5

Formulaciones

Se preparan formulaciones que contienen una variedad de fármacos conocidos sospechosos de poseer una potencia de efectos laterales adversos para la liberación de histamina *in vivo* cuando se administra como un bolo o infusión intravenosa rápida según el siguiente procedimiento. La cantidad deseada de excipiente se solubiliza en agua filtrada para inyección o cloruro sódico para inyección, se ajusta el pH lo necesario para obtener una solución que tiene el valor de pH indicado, se lleva la solución en volumen con agua o cloruro sódico para inyección para obtener la concentración deseada de excipiente, bien mezclada. Se añade la cantidad deseada del compuesto 1, se mezcla la formulación y a continuación se filtra en condición estéril usando membrana con dimensión de poros de 0,22-0,45 μm. Las formulaciones están representadas en la Tabla 6.

## ES 2 284 548 T3

TABLA 6

	Fármaco (conc.)	pH	Excipientes	
5	A	Compuesto 1 (10mg/ml)	3	glicina (12.5mg/ml)
	B	Compuesto 1 (5 ó 10mg/ml)	3	EDTA (0,1%)
10	C	Compuesto 1 (10mg/ml)	3	glicina (12,5mg/ml) + EDTA (0,1%)
	D	Compuesto 1 (10mg/ml)	3	glicina (12,5mg/ml) + ácido cítrico (50mM)
15	E	Compuesto 1 (2 ó 10mg/ml)	3	ácido cítrico (50mM) + EDTA (0,1%)
	F	Compuesto 1 (10mg/ml)	3	ácido cítrico (50mM)
20	G	Compuesto 1 (10mg/ml)	3	CaCl <sub>2</sub> (50mM)
	H	Compuesto 1 (10mg/ml)	3	glicina (12,5mg/ml) + ácido cítrico (50mM) + EDTA (0,1%)
25				
	I	Compuesto 1 (10mg/ml)	3	glicina (12,5mg/ml) + ácido cítrico (50mM) + CaCl <sub>2</sub> (50mM)
30				
	J	sulfato de morfina (8, 10 ó 15 mg/ml)	2,5-3,5	EDTA (0,1-0,2%)
35				
	K	sulfato de morfina (8, 10 ó 15 mg/ml)	2,5-3,5	ácido cítrico (60mM)
	L	sulfato de morfina (8, 10 ó 15 mg/ml)	2,5-3,5	glicina (20 mg/ml)
40				
	M	sulfato de morfina (8, 10 ó 15 mg/ml)	2,5-3,5	CaCl <sub>2</sub> (40mM)
45				
	N	sulfato de morfina (8, 10 ó 15 mg/ml)	2,5-3,5	glicina (15 mg/ml) + EDTA (0,15%)
	O	sulfato de morfina (8, 10 ó 15 mg/ml)	2,5-3,5	ácido cítrico (40mM) + EDTA (0,15%)
50				
	P	Nalbufrina HCl (10 ó 20 mg/ml)	3,5-3,7	EDTA (0,1-0,2%)
	Q	Nalbufrina HCl (10 ó 20 mg/ml)	3,5-3,7	ácido cítrico (60mM)
55				
	R	Nalbufrina HCl (10 ó 20 mg/ml)	3,5-3,7	glicina (20 mg/ml)
	S	Nalbufrina HCl (10 ó 20 mg/ml)	3,5-3,7	glicina (5 mg/ml) + ácido cítrico (20mM) + EDTA (0,1%)
60				
	T	Oximorfona HCl (1 ó 1,5 mg/ml)	3-5	ácido cítrico (40mM) + EDTA (0,2%)
	U	Oximorfona HCl (1 ó 1,5 mg/ml)	3-5	ácido cítrico (60mM)
65				
	V	remifentanil (10 mg/ml)	3	glicina (12,5mg/ml)

5	W	remifentanil (10 mg/ml)	3	glicina (7mg/ml) + ácido cítrico (50mM) + CaCl <sub>2</sub> (50mM)
	X	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	glicina (12,5mg/ml)
10	Y	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	EDTA (0,1%)
	Z	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	glicina (12,5 mg/ml) + EDTA (0,1%)
15	AA	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	glicina (12,5mg/ml) + ácido cítrico (50mM)
	BB	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	ácido cítrico (50mM) + EDTA (0,1%)
20	CC	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	ácido cítrico (50mM)
	DD	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	CaCl <sub>2</sub> (50mM)
25	EE	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	glicina (12,5 mg/ml) + ácido cítrico (50mM) + EDTA (0,1%)
	FF	mivacurio Cl (2 mg/ml)	3,5-5	glicina (12,5 mg/ml) + ácido cítrico (50mM) + CaCl <sub>2</sub> (50mM)
30	GG	atracurio besiloto (10 mg/ml)	3,25-3,65	EDTA (0,1%)
35	HH	atracurio besiloto (10 mg/ml)	3,25-3,65	glicina (12,5 mg/ml) + EDTA (0,1%)
40	II	atracurio besiloto (10 mg/ml)	3,25-3,65	ácido cítrico (55mM)
	JJ	atracurio besiloto (10 mg/ml)	3,25-3,65	glicina (12,5 mg/ml) + ácido cítrico (50mM) + EDTA (0,1%)
45	KK	Bromuro de rocuronio (2 ó 10 mg/ml)	4	EDTA (0,15%)
50	LL	Bromuro de rocuronio (2 ó 10 mg/ml)	4	ácido cítrico (60mM)
	MM	Bromuro de rocuronio (2 ó 10 mg/ml)	4	ácido cítrico (60mM) + EDTA (0,15%)
55	NN	Bromuro de rapacuronio	3-5	ácido cítrico (60mM)
60				

## Ejemplo 6

65 *Detección in vivo en perro*

Usando perros sabuesos anestesiados, las formulaciones A-I según el ejemplo 5, se seleccionan por su capacidad para inhibir *in vivo* la liberación de histamina farmacéuticamente inducida. Todos los estudios son realizados según

## ES 2 284 548 T3

el Acto de bienestar animal USDA y con un estricto respeto de las directrices establecidas por El comité de uso y de cuidado de los Animales.

Se anestesiaron perros sabuesos adultos machos, se le intubo y respiraron artificialmente. Se intubo la tráquea bajo anestesia tópica (2% de lidocaína) y se controló la ventilación a concentraciones de end-tidal CO<sub>2</sub> de 25-30 mmHg. Se ventiló el animal con una mezcla de oxígeno e isoflurano para mantener un nivel quirúrgico de anestesia a lo largo de todo el experimento. Se vigilaron continuamente la temperatura rectal, el end-tidal CO<sub>2</sub>, saturación de O<sub>2</sub> periférico (oximetría de pulso). Se introdujo un catéter en una arteria femoral y se conectó externamente a un transductor de presión. Se vigilaron continuamente la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca en un registrador cronológico.

En este experimento, la liberación de histamina se evaluó por cambios en la presión sanguínea (marcador cardiovascular indirecto de liberación de histamina) así como midiendo las concentraciones de histamina en plasma. La respuesta de la presión sanguínea a la liberación de histamina consiste en una breve caída de características en una latencia de aproximadamente 15-20 segundos desde el momento de la inyección del bolo. Una respuesta taquicárdica concomitante es a veces, pero no siempre, evidente.

Se recogen muestras de sangre en viales enfriados revestido con EDTA 1 minuto antes de la inyección y al pico de la respuesta de presión sanguínea. El plasma se extrae siguiendo los procedimientos estándar y se guarda inmediatamente a -70°C hasta su análisis. Se determinan los niveles de plasma de la histamina por inmunoensayo (ELISA) usando un kit de ensayo comercialmente disponible en Immunotech.

Cada animal sirve como su propio control: las respuestas base (control) a las dosis incrementales intravenosas de fármaco (en cloruro sódico para inyección, pH 3) se obtienen en primer lugar en cada animal. A intervalos de 2-3 semanas, se repite un protocolo idéntico de dosificación en cada animal con una formulación del fármaco. El activo es administrado por vía intravenosa en dosis incrementales de bolo a intervalos de aproximadamente 20 minutos. Los controles se vuelve a ensayar intermitentemente para estar en guardia contra cualquier cambio en las respuestas base. Los resultados de los ejemplos representativos se representan en las siguientes Tablas 7A-B.

TABLA 7-A

Semana	Formulación	Histamina en plasma†				Presión sanguínea arterial media♦			
		Dosis del compuesto 1 (mg/kg):				Dosis del compuesto 1 (mg/kg):			
		0,2	0,4	0,8	0,16	0,2	0,4	0,8	0,16
1	Control	6	90	846		1	9	-34	
3	A*	5	58	454	1042	1	-4	-13	-38
5	G*	21	113	585	975	5	-5	-7	-25
7	Control	48	417	1125		-2	-2	-26	
9	D*	4	65	180	707	2	0	-13	-21
11	Control	56	269	1169		14	12	-31	
13	E*	10	104	365	399	12	-5	-20	-29
15	A*	32	39	1125		1	2	-30	
17	Control	33	385	1289		2	-7	-20	
† Incremento en histamina en plasma (nM) de línea base									
♦ Cambio en la presión sanguínea arterial media (mmHg) de línea base									
* Formulación del ejemplo 5									

TABLA 7-B

Semana	Formulación	Histamina en plasma†			Presión sanguínea arterial media♦		
		Dosis del compuesto 1 (mg/kg):			Dosis del compuesto 1 (mg/kg):		
		0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
1	Control	29	283	1191	22	-7	-34
3	A*	4,4	60	585	13	11	-15
5	C*	6	36	190	3	13	-25
7	Control	9	229	1269	1	-8	-33
9	B*	1	25	181	3	4	-15
11	Control	7	69	531	-3	0	-51
13	D*	2	25	367	0	4	-47
15	B*	1	14	394	0	-5	-32
17	Control	8	31	1243	4	9	-33

† Incremento en histamina en plasma (nM) de la línea base  
♦ Cambio en la presión sanguínea arterial media (mmHg) de la línea base  
\* Formulación del ejemplo 5

Las Tablas 7A-B muestran los efectos de diversas formulaciones en la exploración de los perros sabueso anestesiados. Aunque, en algunos casos la magnitud de la respuesta depresora relacionada con la histamina al perro no parece estar consistentemente afectada por algunas formulaciones, los niveles de plasma de histamina en cada caso son reducido, especialmente a dosis mayores. Esta discrepancia aparente puede ser atribuible a: 1) la selección de estos animales se basa en su capacidad para elicitar una fuerte respuesta relacionada con la histamina al perro; y 2) los ensayos repetidos a intervalos cortos pueden haber mermado las reservas de histamina en estos animales, conduciendo a una mayor sensibilidad de los receptores de histamina. Las tablas 7A-B también muestran, en algunos casos, cambios en las respuestas de control a subidas en los niveles de histamina en plasma y/o caídas en la presión sanguínea arterial media (por ejemplo Dexter, semana 11). Estas variaciones se pueden atribuir a cambios en la condición física del animal (por ejemplo heridas de mordedura de otros perros, pérdida de apetito y peso, etc.) que conducen a reservas alteradas de histamina y/o sensibilidad alterada de los receptores de histamina. Estos ejemplos demuestran la necesidad de repetir los experimentos en los animales que muestran respuestas de control más consistentes. Igualmente, los largos periodos de descanso entre ensayos (3-4 semanas) ayudarían a reponer las reservas perdidas de histamina y retener la sensibilidad de los receptores de histamina. El último régimen de ensayo fue, por lo tanto aplicado con éxito a los estudios *in vivo* con monos descritos a continuación.

#### Ejemplo 7

##### *Estudios in vivo con monos*

Se evalúan las formulaciones A, B, y E (tanto para perfiles RMN como cardiovasculares) en monos Rhesus anestesiados. Estos estudios son llevados a cabo para garantizar que la formulación mejoró el perfil de liberación de histamina farmacéuticamente inducida del Compuesto 1 sin afectar negativamente las propiedades bloqueadoras neuromusculares primarias (es decir, terapéuticas) del fármaco en un modelo de primate. Todos los estudios son llevados a cabo de acuerdo con el Acta de bienestar de los animales USDA y con un estricto respeto de las directrices expuestas por el Comité institucional del uso y del cuidado de los Animales.

Las propiedades bloqueantes neuromusculares (NMB) y los efectos cardiovasculares relacionados con la histamina del fármaco formulado en las formulaciones A, B y E según el Ejemplo 5 se evaluó en los monos Rhesus anestesiados como sigue: Formulación A, 1 mono, formulación B, 3 monos y formulación E, 6 monos. Las caídas transitorias en la presión sanguínea arterial media (MAP) se vigilan como un índice de liberación de histamina. Las respuestas de contracción nerviosa de extensor de los dedos de pie evocado por estimulación eléctrica del nervio perineal se usan como un índice de actividad neuromuscular. Los parámetros NMB medidos o computados incluyeron: ED<sub>95</sub> (dosis que produce el 95% de la supresión de la contracción nerviosa) como un índice de potencia; aparición (tiempo de

## ES 2 284 548 T3

inyección a supresión pico de la contracción nerviosa) y duración del bloqueo (tiempo de inyección para recuperar el 95% de la contracción nerviosa).

5 La formulación del fármaco se administra por vía intravenosa en dosis incrementales de bolo (0,02-3,2 mg/kg) a intervalos de aproximadamente 30 minutos. Las primeras dosis (0,02-0,8 mg/ml) se administran para obtener datos para construir log-probit de ED<sub>95</sub>. La siguiente dosis administrada es de 0,8 mg/ml, después de la cual la dosis se dobla sucesivamente hasta que se elicit una fuerte respuesta MAP. Cada animal sirve como su propio control.

10 Las repuestas NMB y MAS de control (base) se obtiene en primer lugar en cada animal. La formulación de control incluye 10 mg/ml del fármaco y 10 mM de ácido cítrico en solución salina a pH 3. A intervalos (periodos de descanso) de 3-4 semanas, se vuelven a evaluar los efectos del fármaco en cada formulación en cada animal siguiendo un régimen idéntico de dosificación. El periodo de descanso de 3-4 semanas permite que los animales repongan sus reservas de histamina y se recuperen de la cirugía menor del experimento. Además, en los tres monos usados en los estudios de la formulación B, los experimentos de control se repiten a un intervalo de 13 semanas (durante cuyo periodo se evalúan otras formulaciones a intervalos de 3-4 semanas) para determinar el alcance de variación en las respuestas base NMB y MAP (control).

Los resultados del estudio se representan en la Tabla 8.

TABLA 8

Muestra temporal	Tratamiento/Dosis* del Compuesto 1	Cambios en Presión Sanguínea Arterial Media (mmHg)
<b>Resultados del Estudio de la Formulación B (n=3)</b>		
<b>Semana 1</b>	0,05	0 ± 1,0
<b>Control</b>	0,86	-12 ± 4,7
	1,71	-22 ± 6,0
<b>Semana 5</b>	0,05	4 ± 2,9
<b>Formulación B</b>	0,77	2 ± 1,9
	1,54	-11 ± 8,0
	3,09	-11 ± 10,2
<b>Semana 13</b>	0,04	1 ± 1,9
<b>Control</b>	0,86	-5 ± 3,6
	1,71	-21 ± 5,0
<b>Resultados del Estudio de la Formulación E (n=6)</b>		
<b>Semana 1</b>	0,05	0 ± 0,5
<b>Control</b>	0,81	-7 ± 3,1
<b>Resultados del Estudio de Formulación E (n=6)</b>		
	1,63	-15 ± 4,0
<b>Semana 5</b>	0,05	3 ± 1,7
<b>Formulación E</b>	0,77	-3 ± 1,6
	1,54	-9 ± 3,8
	3,09	-16 ± 3,2

**\*Dosis de fármaco en controles y en los experimentos de las formulaciones B y E no son idénticas debido a pequeñas correcciones realizadas basada en pequeñas diferencias (~10%) en el contenido del fármaco entre los dos lotes de fármaco usados en estos estudios. Las ligeras diferencias en dosis no afectan materialmente a los resultados del estudio.**

La Tabla 8 indica los cambios en MAP elicitados por las formulaciones B y E respecto de los controles. También se proporciona en la tabla los efectos de los controles vueltos a ensayas al final del estudio de la formulación B para determinar la fidelidad de cada respuesta. Como se muestra en la tabla, tanto la formulación B como la formulación E incrementaron la dosis media de fármaco requerida para elicitación una respuesta depresora relacionada con la histamina comparable por un factor de aproximadamente 2 (rango: 1 a 4 veces). Los errores estándar importantes en estos valores MAP para la formulación B dependen del número limitado de animales de estudio y a la variabilidad en la incidencia y la magnitud de las respuestas observadas a una dosis dada. Volver a ensayar los controles al final del estudio de la formulación B reveló algún grado de variabilidad en respuestas a dosis bajas, sin embargo, a dosis más elevadas, se volvían a reproducir las repuestas. La duración de acción del Compuesto 1 parecía algo recortada por la formulación E. ninguna de las propiedades NMB del fármaco parecía estar afectada negativamente por una de las dos formulaciones. Los datos indican que las formulaciones B y E suprimieron la liberación de histamina farmacéuticamente inducida en los animales tratados con el fármaco, sin afectar negativamente las propiedades NMB del fármaco.

La formulación A (n 0 1) no pareció mostrar un cambio estadísticamente significativo en los efectos del fármaco sobre la presión sanguínea arterial media en el único animal al cual fue administrada. Sin embargo, los resultados obtenidos son de una fiabilidad limitada debido a la población del estudio, es decir 1.

Se hace un estudio adicional en tres monos para permitir una comparación directa de la potencia bloqueadora neuromuscular del fármaco en formulaciones de control respecto del fármaco en la formulación E. En este estudio cruzado, se obtienen diversos puntos de datos (rendimiento < 99,9% del bloqueo de la contracción del extensor de los dedos) con dosis bajas (0,02-0,08 mg/ml) de los controles. Después de un intervalo de descanso de 1 hora, durante el cual se detiene la estimulación nerviosa, se sigue un protocolo idéntico de dosificación con el fármaco en la fórmula E. Los resultados de este estudio revelaron valores medios de ED<sub>95</sub> virtualmente idénticos entre los controles y la formulación E (0,11 ± 0,02 mg/kg) que indican que la formulación no afectó negativamente la potencia bloqueadora neuromuscular del fármaco.

## REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para preparar una formulación farmacéutica que contiene un agente liberador de histamina y un excipiente fisiológicamente aceptable, comprendiendo dicho procedimiento combinar una cantidad terapéu-  
ticamente eficaz de dicho agente liberador de histamina con una concentración del excipiente fisiológicamente aceptable; en el que dicha concentración del excipiente fisiológicamente aceptable, cuando se combina en una solución acuosa con el agente liberador de histamina a una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica, es suficiente para reducir la agregación del agente liberador de histamina en la solución acuosa al menos aproximadamente un 25 por ciento comparada con la agregación del agente liberador de histamina en la solución acuosa que sustancialmente no contiene excipiente fisiológicamente aceptable; en el que el agente liberador de histamina es dicloruro de (Z)-2-Cloro-1-{3-[(1*R*,2*S*)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-[(3,4,5-trimetoxifenil)metil]-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-4-{3-[(1*S*,2*R*)-6,7-dimetoxi-2-metil-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2,3,4-tetrahidro-2-isoquinolinio]propil}-2-butendioato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el excipiente fisiológicamente aceptable se selecciona del grupo constituido por sales inorgánicas divalentes, ácidos carboxílicos orgánicos, ácido fosfórico, aminoácidos, agentes quelantes, albúminas y sus combinaciones.

20 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el excipiente fisiológicamente aceptable se selecciona del grupo constituido por cloruro cálcico, sulfato sódico, sulfato magnésico, ácido tartárico, ácido maleico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido glucurónico, ácido fosfórico, glicina, lisina, arginina, EDTA, albúmina sérica bovina, albúmina sérica humana y sus combinaciones.

25 3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en el que la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable se determina mediante las etapas de:

30 a) medir la agregación de dicho agente liberador de histamina en una solución de referencia constituida esencialmente por dicho agente liberador de histamina en una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica de la solución acuosa;

35 b) medir la agregación de dicho agente liberador de histamina en una solución comparativa constituida esencialmente por dicho agente liberador de histamina y una concentración preseleccionada del excipiente fisiológicamente aceptable en la solución acuosa, en el que la concentración de dicho agente liberador de histamina en la solución comparativa es sustancialmente igual a la concentración de dicho agente liberador de histamina en la solución de referencia;

40 c) opcionalmente repetir la etapa b) una o más veces con una solución comparativa que tiene una concentración preseleccionada diferente del excipiente fisiológicamente aceptable;

45 d) identificar una concentración de excipiente fisiológicamente aceptable que sea suficiente para reducir la agregación de dicho agente liberador de histamina en la solución comparativa en al menos aproximadamente un 25 por ciento comparada con la agregación de dicho agente liberador de histamina en la solución de referencia;

50 en el que dicha concentración identificada de la etapa d) es la concentración del excipiente fisiológicamente aceptable para combinar con dicho agente liberador de histamina para preparar la formulación farmacéutica.

55 4. Una formulación farmacéutica preparada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

60 5. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de cualesquiera dos o más excipientes que se seleccionan del grupo constituido por glicina, EDTA, ácido cítrico y cloruro cálcico.

65 6. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es ácido cítrico en una concentración desde aproximadamente 15 mM a aproximadamente 300 mM.

70 7. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es EDTA en una concentración desde aproximadamente 0,02 por ciento a aproximadamente 1 por ciento.

75 8. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es cloruro cálcico en una concentración desde aproximadamente 15 mM a aproximadamente 200 mM.

80 9. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de ácido cítrico en una concentración desde aproximadamente 15 mM a aproximadamente 100 mM y EDTA en una concentración desde aproximadamente 0,02 por ciento a aproximadamente 1 por ciento.

85 10. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de ácido cítrico en una concentración desde aproximadamente 15 mM a aproximadamente 100 mM y cloruro cálcico en una concentración desde aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM.

## ES 2 284 548 T3

11. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es glicina en una concentración desde aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml.

5 12. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de glicina en una concentración desde aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml y EDTA en una concentración desde aproximadamente 0,02 por ciento a aproximadamente 1 por ciento.

10 13. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de glicina en una concentración desde aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml y ácido cítrico en una concentración desde aproximadamente 15 mM a aproximadamente 100 mM.

15 14. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de glicina en una concentración desde aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, ácido cítrico en una concentración desde aproximadamente 15 mM a aproximadamente 100 mM, y EDTA en una concentración desde aproximadamente 0,02 por ciento a aproximadamente 1 por ciento.

15. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 50 mM.

20 16. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es EDTA en una concentración de aproximadamente 0,1 por ciento.

17. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es cloruro cálcico en una concentración de aproximadamente 50 mM.

25 18. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 50 mM y EDTA en una concentración de aproximadamente 0,1 por ciento.

30 19. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 50 mM y cloruro cálcico en una concentración de aproximadamente 50 mM.

35 20. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es glicina en una concentración de aproximadamente 12,5 mg/ml.

21. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de glicina en una concentración de aproximadamente 12,5 mg/ml y EDTA en una concentración de aproximadamente 0,1 por ciento.

40 22. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de glicina en una concentración de aproximadamente 12,5 mg/ml y ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 50 mM.

45 23. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, en la que el excipiente fisiológicamente aceptable es una combinación de glicina en una concentración de aproximadamente 12,5 mg/ml, ácido cítrico en una concentración de aproximadamente 50 mM, y EDTA en una concentración de aproximadamente 0,1 por ciento.

50 24. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que además comprende un diluyente fisiológicamente aceptable.

25. La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha formulación tiene un pH desde aproximadamente 2 a aproximadamente 8.

55 26. El uso de una formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 25 para la fabricación de un medicamento para suprimir la liberación de histamina inducida farmacéuticamente en un animal que se está tratando con el agente liberador de histamina.

27. El uso de una formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el medicamento se administra por vía intravenosa.

60 28. El uso de una formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 25 para la fabricación de un medicamento para prevenir efectos cardiovasculares y respiratorios mediados por la liberación de histamina inducida farmacéuticamente en un animal que se está tratando con el agente liberador de histamina.

65 29. El uso de acuerdo con la reivindicación 28, en el que los efectos cardiovasculares y respiratorios mediados por la liberación de histamina inducida farmacéuticamente se seleccionan del grupo constituido por rubefacción, hipotensión, taquicardia, broncoconstricción, reacciones anafilactoides y choque anafiláctico, y combinaciones de cualesquiera dos o más de los mismos.

Figura 1

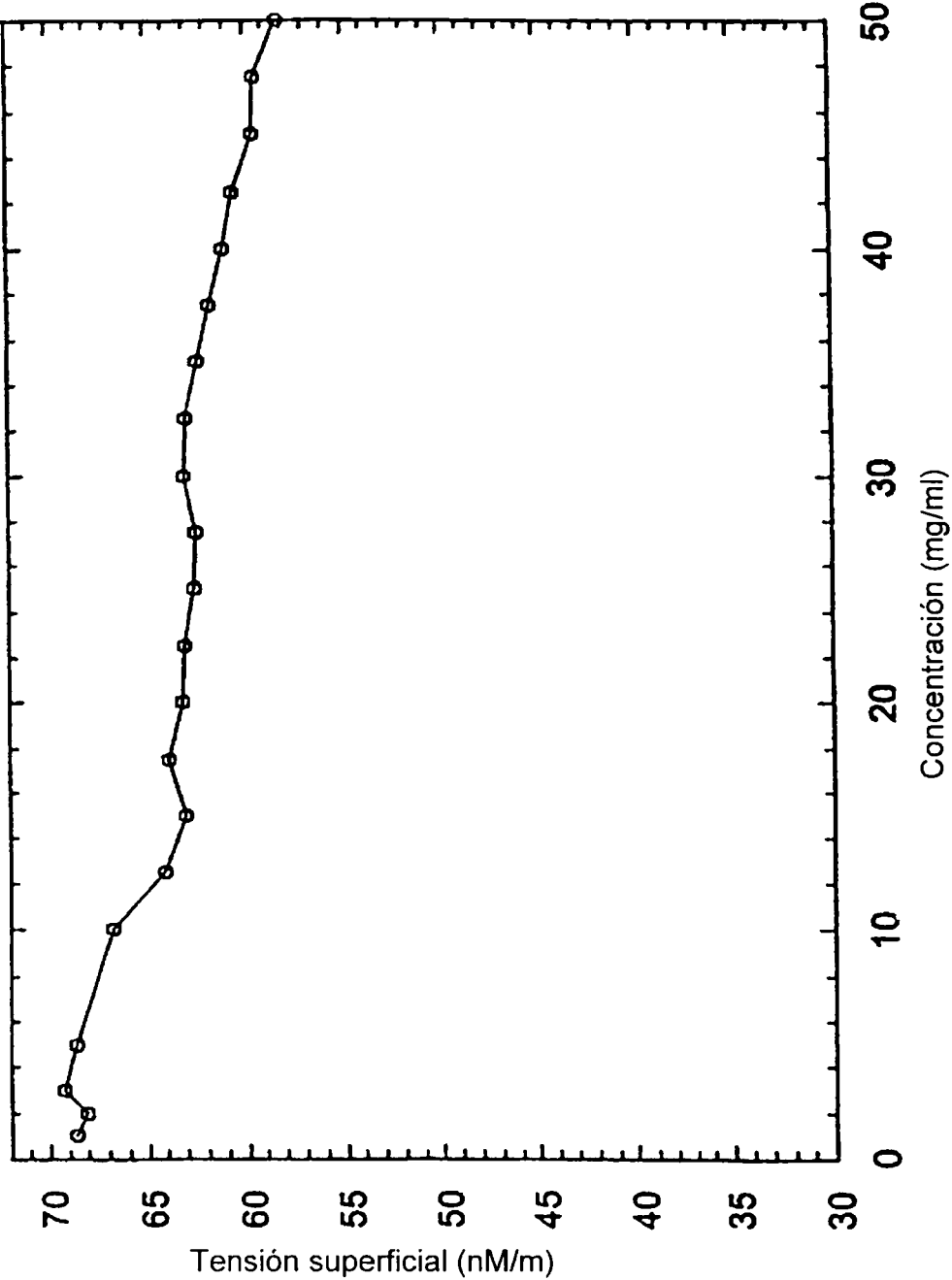


Figura 2

