

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 822 350**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/107** (2006.01)

**A61K 47/10** (2007.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 17175794 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3238709**

54 Título: **Formulaciones parenterales mejoradas de agentes farmacéuticos lipófilos y procedimientos de preparación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

**28.04.2011 US 201161480259 P**

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

**30.04.2021**

73 Titular/es:

**PLATFORM BRIGHTWORKS TWO, LTD. (100.0%)  
2632 Carolina Way  
Houston, TX 77005, US**

72 Inventor/es:

**ANDERSSON, BORJE S.;  
TARRAND, JEFFREY y  
VALDEZ, BENIGNO C.**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 822 350 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

Formulaciones parenterales mejoradas de agentes farmacéuticos lipófilos y procedimientos de preparación y uso de las mismas

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere generalmente a una composición mejorada y un procedimiento para preparar formulaciones parenterales que comprenden agentes farmacéuticos lipófilos solubilizados y usar estas formulaciones en tratamiento de enfermedades tales como enfermedades malignas y autoinmunes, trastornos infecciosos, o para su uso en la terapia de acondicionamiento que precede al trasplante de células madre hematopoyéticas.

10 **Descripción de técnica relacionada**

- 15 Las sustancias farmacéuticas lipófilas que tienen baja solubilidad en agua son una clase en desarrollo de fármacos con aplicabilidad creciente en una diversidad de áreas terapéuticas para una diversidad de patologías. Muchos compuestos aprobados para el uso farmacéutico son compuestos lipófilos con solubilidad y biodisponibilidad limitada. Compuestos relativamente insolubles, es decir, solubilidad en agua de menos de 200 µg/ml pueden mostrar actividad farmacéutica prometedora, pero su desarrollo como compuestos farmacéuticos, particularmente en forma farmacéutica parenteral, presenta un reto significativo para la industria farmacéutica. Entre las barreras principales para la administración eficaz de fármaco son la solubilidad y la estabilidad. Para ser absorbido en el cuerpo humano, un compuesto tiene que ser soluble en tanto agua como grasas (lípidos). Sin embargo, la solubilidad en agua con frecuencia está asociada a escasa solubilidad en grasa y viceversa.

- 20 La solubilidad y la estabilidad son, por lo tanto, obstáculos muy importantes que obstaculizan el desarrollo de agentes terapéuticos. La solubilidad acuosa es una propiedad necesaria pero frecuentemente esquiva para formulaciones de las estructuras orgánicas complejas encontradas en los compuestos farmacéuticos. Los sistemas de formulación tradicionales para fármacos muy insolubles han implicado una combinación de disolventes orgánicos, tensioactivos y condiciones de pH extremas. Estas formulaciones con frecuencia son irritantes para el paciente y  
25 pueden causar reacciones adversas. A veces, estos procedimientos son inadecuados para solubilizar suficiente de una cantidad de un fármaco para una formulación parenteral.

Por lo tanto, existe una necesidad de formulaciones y procedimientos que impliquen formulaciones que comprenden agentes farmacéuticos lipófilos solubilizados y estables, tales como Busulfán.

- 30 Como ejemplo particular, el agente alquilante de ADN bifuncional Busulfán (Bu; 1,4-butanodiol dimetanosulfonato, también conocido como butano-1,4-diil dimetanosulfonato;  $C_6H_{14}O_6S_2$ ) ha ganado durante las últimas décadas una impresionante reputación de su eficacia quimioterapéutica frente a numerosas enfermedades malignas. Sin embargo, esto se aprecia más fácilmente en su actividad frente a neoplasmas mieloides, tal como lo demostrado para leucemia mielógena crónica (LMC) (Haddow y Timmis, 1953; Hoffman y col., 1991).

- 35 El beneficio terapéutico obtenido con Bu en terapia con agente único (agente alquilante) en el tratamiento de LMC se consiguió por su mielotoxicidad general. Últimamente se ha reemplazado cada vez más por terapia guiada con inhibidores de tirosina quinasa, los cuales pueden regular a la baja selectivamente la proliferación aberrante del(de los) clon(es) maligno(s) y restaurar la hematopoyesis policlonal normal.

- 40 Por otro lado, Santos y colaboradores reconocieron, y además Tutschka y colaboradores refinaron más, que la notablemente potente (y selectiva) actividad mielosupresora de Bu, además de su eficacia antileucémica pronunciada, lo hace un agente casi ideal para su uso en la terapia de acondicionamiento pretrasplante para pacientes que se someten a trasplante de células madre hematopoyéticas para enfermedades malignas, autoinmunes o genéticas siempre y cuando su actividad mielosupresora se empareje con la actividad inmunosupresora de un segundo agente, ciclofosfamida (Cy), era normalmente la "pareja" es este marco. Variantes de esta combinación "Bu-Cy" rápidamente llegan a reconocerse como una alternativa(s) aceptable(s) a las  
45 combinaciones más frecuentemente usadas (en ese momento) de irradiación corporal total (ICT) y Cy (Santos y Tutschka, 1974; Santos y col., 1974; Tutschka y col., 1987; Ciurea y col., 2009). Cuando se acumuló más experiencia con las combinaciones Bu-Cy llegó a ser obvio que la absorción intestinal impredecible y la biodisponibilidad errática de Bu oral era una razón contributiva para la alta morbilidad y mortalidad pretrasplante, lo más importantemente causado por diversas toxicidades del hígado o hepatitis tóxica inducida por fármaco,  
50 clínicamente referido como una enfermedad veno-oclusiva del hígado (EVO). El riesgo de morir de EVO y otras complicaciones relacionadas con el tratamiento se informó que eran tan altas como 30 a 50 % ya dentro de los primeros 100 días después del TCMH (Blaise y col., 1992; Devergie y col., 1995; Hartman y col., 1998; Socie y col., 2001; Ciurea y col., 2009). La toxicidad a partir de virtualmente cualquier régimen preparativo mieloablativo se ha asociado con el desarrollo de EVO (Jones y col., 1987; McDonald y col., 1993; Bearman, 1995), pero EVO y/o  
55 insuficiencia hepato-renal después de la administración de Bu oral (combinado con Cy) se ha considerado frecuentemente un toxicidad "marca" asociada con Bu a alta dosis (tanto los regímenes de BuCy4 original [4 días de Cy] como BuCy2 variante [2 días de Cy]) (Santos y col., 1983; Tutschka y col., 1987; Grochow y col., 1989; Grochow, 1993; Slattery y col., 1997; Dix y col., 1996). Además, Bu oral está asociado con un efecto de extracción

de primer paso hepático que da como resultado localmente altas concentraciones de Bu en el sistema venoso portal-hepático, y esto puede contribuir al riesgo de EVO (Peters y col., 1987). Sin embargo, además de Bu, Cy es claramente hepatotóxico. Los resultados de McDonald y colaboradores sugieren que las diferencias interindividuales en el manejo del fármaco metabólico son de importancia para el desarrollo de EVO, de modo que, además de Bu, Cy contribuye posiblemente al riesgo total de EVO (McDonald y col., 2003). Por tanto, el riesgo de EVO está relacionado con el estrés metabólico inducido por fármaco en el hígado, especialmente cuando ambos agentes dependen de reservas de glutatión hepáticas (GSH) y de la actividad de la Glutatión-S-Transferasa (GST) para su detoxificación (McDonald y col., 2003; Hassan y col., 2000).

Además de EVO, la neurotoxicidad se asoció con Bu en animales (Deeg y col., 1999). Se informó de convulsiones en un ser humano que recibe Bu oral primero por Marcus y Goldman (1984). La incidencia de neurotoxicidad, actividad de convulsión generalizada especialmente serio, después de la terapia de acondicionamiento basada en Bu se ha estimado que es tan alta como el 10 % en adultos (Santos, 1989), y aproximadamente el 7 % en niños (Vassal y col., 1990). Vassal y col informaron que dosis mayores (>600 mg/mg<sup>2</sup> o 16 mg/kg) están asociadas con una probabilidad incrementada de manifestaciones neurotóxicas (Vassal y col., 1989). Las convulsiones son más comunes en pacientes mayores, y parecen ser dosis dependientes tanto en adultos como en niños. Las convulsiones están relacionadas con la unión a plasma limitada de Bu y, por lo tanto, su capacidad de cruzar la barrera sangre-cerebro (Vassal y col., 1990; Vassal y col., 1989; Hassan y col., 1989; Meloni y col., 1992). En adultos, las convulsiones generalmente se dan en el 3<sup>o</sup> y 4<sup>a</sup> día de administración de Bu, probablemente como resultado de acumulación de fármaco en tejido (Marcus y Goldman, 1984; Hassan y col., 1989; Meloni y col., 1992; Kobayashi y col., 1998; Martell y col., 1987; Sureda y col., 1989). Incluso sin actividad de convulsión patente las anomalías del EEG se dan hasta en el 60 % de pacientes (Kobayashi y col., 1998). Estos problemas necesitan que se usen diversas medicaciones anticonvulsivas para la profilaxis de la convulsión (Meloni y col., 1992; Kobayashi y col., 1998; Grigg y col., 1989; Meloni y col., 1995; Chan y col., 2002; Hassan y col., 1993).

Las limitaciones prácticas en usar Bu oral en terapia de acondicionamiento de pretrasplante en alta dosis están principalmente relacionadas con su biodisponibilidad impredecible y errática debido a absorción intestinal variable. Datos de ensayo clínico disponibles y preocupaciones relacionadas con la toxicidad de Bu oral formó la base para nuestra hipótesis de que una formulación de Bu IV podría causar menos estrés al hígado, puesto que la administración parenteral producirá garantía de dosis completa con 100 % de biodisponibilidad, así como evitará la extracción de primer paso hepático de fármaco oral que se absorbe del tracto intestinal a través del sistema venoso portal-hepático. Esta realización dio lugar al diseño de una formulación de Bu IV para conseguir la administración controlada (Bhagwatwar y col., 1996; Andersson y col., 2000). La formulación de Bu IV basada en DMA fue aprobada por la US FDA en 1999. Rápidamente ha reemplazado el Bu oral en la quimioterapia pre-TCMH, mayormente en el régimen de BuCy2 IV (Andersson y col., 2002).

Hasta ahora, se ha comparado BuCy2 IV con BuCy2 oral en 6 estudios retrospectivos, mostrando toda superioridad de BuCy2 IV con respecto al desarrollo de EVO y mortalidad temprana relacionada con el trasplante (Kashyap y col., 2002; Thall y col., 2004; Kim y col., 2005; Lee y col., 2005; Aggarwal y col., 2006; Dean y col., 2010). La introducción de Bu IV con Cy parecía mejorar la seguridad del(de los) régimen(regímenes) de Bu-Cy(2), sin embargo, la toxicidad relacionada con el régimen era/es aún de interés. Como se indicó anteriormente, había llegado a ser obvio por el trabajo de McDonald y colaboradores que Cy, cuando se usa en altas dosis en el marco del pretrasplante, contribuye a la hepatotoxicidad total (McDonald y col., 1993; McDonald y col., 2003; DeLeve y col., 2002). Los metabolitos citotóxicos activados de Cy (especialmente mostaza de o-carboxietilfosforamida y acroleína) probablemente contribuyen a EVO en el régimen de acondicionamiento con Bu-Cy2 por la necesidad de GSH en su detoxificación metabólica. Como parte de estas observaciones, el riesgo de EVO se podría disminuir posiblemente sustituyendo Cy con un agente inmunosupresor de una clase diferente de fármacos sin hepatotoxicidad, tal como Fludarabina (Flu), el cual no utiliza GSH en su metabolismo, y el cual es virtualmente no tóxico al hígado. Por tanto, Russell y colaboradores informaron de un régimen de acondicionamiento mieloablativo que usa Bu-Flu IV y globulina antitimocito (ATG) en un calendario de dosificación conveniente una vez al día (Russell y col., 2002). En posteriores estudios específicos a enfermedad realizados en el "M.D. Anderson Cancer Center" (MDACC), Flu y Bu IV también se administraban una vez al día (De Lima y col., 2004; Andersson y col., 2008). Noventa seis pacientes con LMA/SMD se trataron en este estudio en el que se añadió ATG solamente para pacientes de trasplante donantes no relacionados compatibles y donantes hermanos incompatibles a un antígeno y (De Lima y col., 2004). Se vio frecuentemente estomatitis, y aún se encontraron EVO y efectos secundarios neurológicos en una fracción de pacientes. La mayoría de los pacientes en el primer estudio y el 18 % en el segundo estudio tenían elevaciones transitorias de ALT, mientras que aproximadamente el 10 % experimentaron un incremento significativo en bilirrubina como señales adicionales de estrés sobre la función del hígado dentro de una a dos semanas después del trasplante (Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004). Tres de los primeros 166 (1,8 %) pacientes tratados en estos dos ensayos desarrollaron EVO clínicamente significativa y uno de ellos murió (0,6 %). La neurotoxicidad era no común; 4 % de los pacientes desarrollaron un síndrome "mano-pie" y dos pacientes tuvieron convulsiones (Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Andersson y col., 2008). Interesantemente, el patrón de toxicidad del hígado parece de algún modo diferente de lo que previamente se experimentó con Bu oral; frecuentemente hay un "hiperbilirrubinemia silenciosa" en aproximadamente un tercio de los pacientes, teniendo su inicio dentro de aproximadamente una semana de administración de Bu IV, y si se da EVO clínica, ahora, frecuentemente ocurre en un tiempo posterior de lo que previamente se encontró. Por tanto, EVO clínicamente diagnosticada, ahora, se da en

una fracción de pacientes tan tarde como dos meses después del TCMH (Andersson, datos no publicados).

La formulación de Bu parenteral se desarrolló para alcanzar el 100 % de biodisponibilidad con garantía de dosis completa, y para eliminar simultáneamente el efecto de primer paso hepático que puede contribuir al riesgo alto de insuficiencia de hígado mortal después de Bu en alta dosis oral (Bhagwatwar y col., 1996; Documento de Patente americana No. 5.430.057; Documento de Patente americana 5.559.148).

5

La formulación de Bu IV actualmente disponible tiene un vehículo disolvente compuesto basado en N,N-Dimetilacetamida (DMA) y Polietilenglicol 400 (PEG/PEG400) ("DMA-Bu") (Bhagwatwar y col., 1996; Documento de Patente americana n.º. 5.430.057; Documento de Patente americana 5.559.148). Aunque varios estudios clínicos confirmaron que esta formulación de DMA-Bu se tolera mejor y produce resultados clínicos mejorados de pacientes trasplantados para diversos tipos de leucemia y linfomas (Kashyap y col., 2002; Thall y col., 2004; Kim y col., 2005; Lee y col., 2005; Aggarwal y col., 2006; Dean y col., 2010; DeLeve y col., 2002; Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Andersson y col., 2008; Chae y col., 2007; Bredeson y col., 2008; Shimoni y col., 2006; Shimoni y col., 2010; Santarone y col., 2011), ya había a partir de los primeros ensayos humanos aprensión sobre la administración de una gran cantidad de DMA en humanos, puesto que DMA se reconoce como disolvente potencialmente bastante tóxico (Dwivedi, 2002; "VICH Steering Committee", 2010; "The Food and Drug Administration", 2010; "The Office of Environmental Health Hazard Assessment", 2010). Estas preocupaciones se aumentan justificablemente por la(s) posible(s) interacción(interacciones) aditiva(s) o incluso sinérgica(s) (adversa(s)) entre DMA y Bu, puesto que ambos agentes ejercen estrés metabólico significativo sobre el hígado. Aunque la incidencia total de la toxicidad hepática sería se disminuye cuando se comparan los regímenes de Bu-Cy2 oral y IV (Kashyap y col., 2002; Thall y col., 2004; Kim y col., 2005; Lee y col., 2005; Aggarwal y col., 2006; Dean y col., 2010), hay un (sub)grupo de pacientes que padecen toxicidad hepática seria, potencialmente mortal, o incluso letal, después de recibir los regímenes variantes de Bu-Cy2 IV y Bu-Flu IV (Kashyap y col., 2002; Thall y col., 2004; Kim y col., 2005; Lee y col., 2005; Aggarwal y col., 2006; Dean y col., 2010; Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Andersson y col., 2008; Chae y col., 2007; Bredeson y col., 2008; Shimoni y col., 2006; Shimoni y col., 2010; Santarone y col., 2011).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Puede ser importante recordar, que el perfil de la toxicidad hepática de DMA-Bu IV es cualitativamente de algún modo diferente del experimentado con Bu oral; la toxicidad de Bu oral se manifiesta como un incremento progresivo temprano en bilirrubina, ALT y AST, surgiendo generalmente dentro de los primeros 10 días después de la administración de Bu oral. Esto o bien progresa rápidamente a insuficiencia hepato-renal potencialmente mortal o letal, o alternativamente el paciente comienza a mejorar y está clínicamente significativamente mejor a aproximadamente 3 semanas después del trasplante; la probabilidad de recuperación completa es ahora excelente (McDonald y col., 1993; Bearman, 1995; McDonald y col., 2003; DeLeve y col., 2002). Por el contrario, cuando se utiliza el DMA-Bu IV, hay generalmente una alta incidencia (aproximadamente 30 a 40 %) de "hiperbilirrubinemia silenciosa" que aparece dentro de 10 a 14 días después de la administración de DMA-Bu IV. Esto es probablemente para resolver en los próximos varios días (hasta aproximadamente una semana a diez días), pero toxicidad hepática relacionada con el tratamiento seria, EVO, puede en su lugar manifestarse por sí misma tan tarde como 8 a 10 semanas pos-TCMH (Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Andersson y col., 2008). Los inventores plantean la hipótesis de que el patrón de toxicidad clínica cambiante puede resultar de una interacción adversa entre Bu y DMA. El último disolvente ha demostrado toxicidad hepática, renal y neurológica en humanos, además de causar retardo del crecimiento y ganancia de peso disminuida usando roedores y lagomorfos en marcos experimentales (Malley y col., 1995; Kennedy, 1986; Klimisch y Hellwig, 2000; Okuda y col., 2006; Valentine y col., 1997; Kennedy, 2001). Además, hay al menos un informe de hepatitis tóxica seria con una incidencia de aproximadamente 3 a 5 % en trabajadores de fábrica que se expusieron laboralmente a altas concentraciones de DMA vaporizada en una instalación de producción de plásticos comerciales (Choi y col., 2001). Por último, en un estudio clínico de DMA como agente anticanceroso, la toxicidad dosis limitante aguda de DMA era confusión mental/coma, y DMA también se ha descrito como un agente alucinógeno (Weiss y col., 1962a; Weiss y col., 1962b). La preocupación sobre una interacción(interacciones) adversa(s) seria(s) entre Bu y DMA condujo un grupo a investigar la(s) posible(s) interacción(interacciones) adversa(s) clínica(s) cuando la formulación de DMA-Bu IV se combina con Cy en terapia de acondicionamiento de pretrasplante (Hempel y col., 2007). Estos investigadores concluyeron que, aunque podría haber preocupaciones justificables sobre una interacción(interacciones) adversa(s) entre Bu y DMA y Cy, la formulación de DMA-Bu IV disponible es todavía más segura que Bu oral cuando se usa en terapia de acondicionamiento de pretrasplante (Hempel y col., 2007). Otros investigadores demostraron que bajo condiciones cuidadosamente controladas Bu y DMA tienen una interacción citotóxica significativa (sinérgica) (Sadeghi y col., 1999). Es concebible, que una interacción clínica adversa potencialmente seria entre los dos agentes se obscurece por la heterogeneidad interindividual que se da de forma natural en el metabolismo del fármaco en la situación clínica. Además, la única comparación que es posible cuando se trata de identificar una población de referencia adecuada para la evaluación de seguridad clínica de DMA-Bu IV es la comparación histórica con pacientes tratados con quimioterapia de alta dosis basada en Bu. Debido al riesgo excesivamente alto para las complicaciones serias relacionadas con el tratamiento después de Bu oral a alta dosis, tal comparación favorecerá indebidamente DMA-Bu, pero no conduce la contribución de DMA al perfil de toxicidad total de DMA-Bu IV. Actualmente no es posible realizar tal evaluación, puesto que la única formulación de Bu IV disponible tiene una gran cantidad de DMA en el vehículo disolvente.

Cuando se consideran todos los datos disponibles, es obvio que la inclusión de un disolvente(s) que impone(n) estrés metabólico sobre el hígado, tal como DMA, probablemente incrementará el riesgo de toxicidad de hígado y/o

multiórgano clínicamente significativa, incrementando de ese modo el riesgo total al paciente de morbilidad y mortalidad relacionada con el régimen de tratamiento. Este riesgo, sin embargo, se le restó importancia por el uso de un grupo comparador histórico que se sometió a una alternativa terapéutica significativamente peor.

- 5 El perfil de toxicidad bien documentado de DMA lo ha dejado una denominación como agente de Clase II a partir de la "International Cooperation on Harmonization of Technical requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products". Esta denominación significa que DMA es un agente cuya utilización en la fabricación de formulaciones farmacéuticas se deberían limitar estrictamente y, en todo lo posible, se debería evitar (Dwivedi, 2002; "VICH Steering Committee", 2010; "The Food and Drug Administration", 2010; "The Office of Environmental Health Hazard Assessment", 2010).
- 10 Por lo tanto, basándose en 1) la mayoría de los informes de bibliografía ocupacional de toxicidades serias de órgano normal (hígado) inducidas por DMA, y 2) los cambios agudos en el nivel de conciencia y/o alucinaciones cuando se administra en humanos, 3) los últimos casos ocasionales ocurridos de toxicidad de hígado seria, potencialmente mortal así como letal con el uso de la formulación DMA-Bu IV, y por último 4) las directrices de FDA existentes, hay una necesidad de diseñar una formulación de Bu parenteral alternativa que esté libre de DMA. La disponibilidad de tal formulación serviría para mejorar más el perfil de seguridad clínica de Bu parenteralmente administrado, de modo que su potencial terapéutico completo se puede experimentar sin preocupación añadida de toxicidad sería de órgano normal que se impone por un componente(s) del vehículo disolvente compuesto.

### **Sumario de la invención**

- 20 Ciertos aspectos de la presente invención proporcionan novedosas formulaciones farmacéuticamente estables y parenteralmente aceptables de agentes farmacéuticos lipófilos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, las formulaciones de la invención se pueden basar parcialmente en el principio de cosolvenencia. Particularmente la invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que un agente farmacéutico lipófilo podría ser estable y estar solubilizado a una concentración mayor en un disolvente no acuoso mediante un planteamiento de cosolvenencia específica. El planteamiento puede implicar el uso de un disolvente orgánico volátil para facilitar la solubilización del agente lipófilo en un disolvente no acuoso tal como PEG400, seguido de la separación del disolvente orgánico volátil para proporcionar una composición no acuosa del agente lipófilo con solubilidad y estabilidad mejorada. Opcionalmente, tal composición no acuosa se puede diluir más con un disolvente acuoso mientras que el agente lipófilo podría continuar estable y solubilizado. Ejemplos de las composiciones pueden ser farmacéuticamente aceptables, no tóxicos y estables durante muchas horas a temperatura ambiente, tal como la formulación de Busulfán.

- 30 La invención se refiere a formulaciones farmacéuticas, y más específicamente, a formulaciones parenterales de agentes lipófilos tales como Busulfán (Bu), un agente de azol como Posaconazol, Itraconazol o agentes antiinfecciosos relacionados. En ciertos aspectos de la invención, las formulaciones parenterales pueden ser útiles para el tratamiento de algunas afecciones o enfermedades que son sensibles o que responden a los agentes lipófilos, incluyendo, pero no limitándose a, el tratamiento y/o supresión de enfermedades malignas o autoinmunes, para su uso en terapia de acondicionamiento de pacientes que se someten a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH) o para el tratamiento y/o supresión de infecciones sistémicas con levadura, mohos y otros organismos que son sensibles a agentes antiinfecciosos.

- 40 Tales formulaciones parenterales podrían evitar la biodisponibilidad errática indeseable y la extracción de primer paso hepático impredecible de preparaciones orales y en vista de estar verdaderamente solubilizados los agentes ahora está libres de los defectos experimentados con la administración de sustancia particulada, tal como suspensiones coloidales, de nanoparticulares o microparticulares, o suspensiones microcristalinas de principios farmacéuticamente activos. En un aspecto particular, la formulación de Busulfán puede abrogar la preocupación de la toxicidad aguda, así como a largo plazo, o crónica relacionada con la inclusión del disolvente orgánico N,N-dimetilacetamida (DMA), ya que es el componente principal en la única formulación de Bu parenteral comercialmente disponible.

- 50 Por consiguiente, una realización de la invención está dirigida a una solución homogénea no acuosa que comprende un agente farmacéutico lipófilo solubilizado y un disolvente anfifílico no acuoso, tal como un disolvente polimérico líquido anfifílico. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se contempló que el agente se puede unir al disolvente anfifílico mediante interacciones electrostáticas para conseguir alta solubilidad acuosa y estabilidad. Las formulaciones de la presente invención son básicamente libres de disolventes orgánicos no poliméricos, agua y partículas no solubilizadas, en las que el agente farmacéutico lipófilo solubilizado tiene una concentración de al menos aproximadamente 0,5 mg/ml, y además en las que la solución continúa estable y básicamente libre de partículas no solubilizadas durante al menos 40 días y preferentemente al menos 60 días. Más adelante en el presente documento se describen estudios que demuestran formulaciones ilustrativas que mantienen tales propiedades cuando se almacenan durante el menos 40 e incluso hasta 60 días a temperatura ambiente cuando se ensaya en 5 mg de agente farmacéutico/ml de disolvente polimérico líquido anfifílico.

En ciertos aspectos, la solución de cualquier formulación descrita en el presente documento puede ser básicamente libre de DMA u otros disolventes orgánicos poliméricos o no poliméricos. En aspectos particulares, la formulación

- puede ser básicamente libre de agua u obviar la necesidad del uso de agua en la preparación de la formulación. Partículas no solubilizadas, tales como partículas coloidales, nanopartículas o micropartículas, o partículas microcristalinas, también pueden ser básicamente no existentes en la solución de cualquier formulación descrita en el presente documento. La composición de la solución opcionalmente además puede comprender un diluyente acuoso tal como un fluido de infusión acuosa, el cual se puede usar para facilitar la posterior administración sistémica a un mamífero, preferentemente un ser humano o un animal doméstico (grande). En un aspecto adicional, se puede preparar una formulación parenteral farmacéuticamente aceptable, acuosa y homogénea, mediante un procedimiento que comprende obtener una solución anteriormente descrita y diluir la solución con un diluyente acuoso deseado.
- En ciertos aspectos, la invención se puede dirigir a composiciones y procedimientos para la preparación de la formulación parenteral. Los vehículos disolventes novedosos de la invención se pueden usar para facilitar la administración parenteral de otros fármacos difíciles de solubilizar, también conocidos como "insolubles en agua". Por consiguiente, otra realización de la invención incluye una composición para uso parenteral que comprende: un principio farmacéuticamente activo insoluble en agua/lipófilo, y un primer disolvente, comprendiendo el primer disolvente un disolvente orgánico tal como acetona o cloroformo junto con un segundo disolvente anfífilico, tal como PEG. El principio farmacéuticamente activo se puede disolver en el primer disolvente, y después de la solubilización se puede mezclar con el segundo disolvente. El primer disolvente orgánico (volátil), a continuación, se puede separar (por ejemplo, evaporado bajo vacío) y el principio farmacéuticamente activo puede continuar electrostáticamente atraído y unido a, y establemente disuelto en, el segundo disolvente/PEG. La composición de uso clínico opcionalmente comprende además un diluyente secundario tal como un fluido de infusión acuoso, tal como solución salina normal o dextrosa en agua, o bien por sí misma o premezclada con una pequeña cantidad (10 a 25 %, v/v) de polímero anfífilico tal como PEG. Debido a la atracción electrostática entre el segundo disolvente anfífilico (PEG) y el principio farmacéuticamente activo este complejo de fármaco-PEG se puede diluir en el diluyente acuoso sin precipitación inmediata del principio farmacéuticamente activo.
- En un aspecto particular, la composición puede comprender Bu y un primer disolvente orgánico volátil tal como acetona. El Bu se puede disolver en el disolvente orgánico volátil tal como acetona y, a continuación, mezclar con un disolvente anfífilico tal como PEG400. Posteriormente, y tomando la ventaja del bajo punto de ebullición del disolvente orgánico volátil, el disolvente orgánico volátil se puede separar, por ejemplo, por evaporación bajo vacío a TA. Al final de esta fase, el Bu podría estar completamente y establemente disuelto en el disolvente anfífilico tal como PEG400. Antes de la administración clínica, la composición se puede diluir opcionalmente con un diluyente secundario tal como un fluido de infusión acuoso, por ejemplo, solución salina normal (SSN) o dextrosa en agua al 5 a 10 % (D5A, D10A), como diluyente(s) final(es).
- El agente farmacéutico lipófilo solubilizado en cualquier solución, composición o formulación descrita en el presente documento puede tener una concentración de al menos o hasta aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 mg/ml (o mol/l) o cualquier rango o número intermedio. En aspectos particulares, el agente farmacéutico lipófilo solubilizado puede tener una concentración de aproximadamente 1 a 10 mg/ml o aproximadamente 3 a 9 mg/ml.
- Por ejemplo, los agentes farmacéuticos lipófilos que se pueden usar en el presente documento incluyen compuestos lipófilos que tienen solubilidad en un disolvente acuoso de menos de aproximadamente 0,01, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/ml (o mol/l) o cualquier intervalo derivable de los mismos, preferentemente menos de 10 mg/ml, más preferentemente menos de aproximadamente 1 mg/ml e incluso menos de aproximadamente 0,1 mg/ml.
- En ciertos aspectos, las formulaciones descritas en el presente documento podrían conservar al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 99, 99,9, 100 % de la actividad (o cualquier valor o intervalo derivable de los mismos) de los agentes farmacéuticos durante o después de la preparación. Por ejemplo, la formulación de Bu novedosa conserva actividad citotóxica *in vitro* completa en cultivos de tejido utilizando líneas celulares de leucemia humana continuamente en desarrollo como dianas, demostrando que las novedosas formulaciones de Bu no pierden actividad citotóxica debido a degradación química o precipitación física cuando se solubilizan. Las formulaciones descritas en el presente documento se pueden usar intravascularmente, y se han usado con éxito para la administración intravenosa (IV) en un modelo murino. Farmacocinéticas preliminares obtenidas en un modelo de ratón con una formulación ilustrativa de la invención ha producido concentraciones de Bu citotóxicas detectables durante varias horas después de la administración.
- Agentes lipófilos adecuados pueden ser algunos agentes biológicamente activos escasamente solubles en agua o una sal, isómero, éster, éter u otro derivado de los mismos, los cuales incluyen, pero no se limitan a, agentes anticancerosos, agentes antifúngicos, agentes psiquiátricos tales como analgésicos, agentes que alteran el nivel de conciencia tales como agentes anestésicos o hipnóticos, agentes antiinflamatorios no esteroideos, antihelmínticos, agentes antiacné, agentes antianginales, agentes antiarrítmicos, agentes antiasma, agentes antibacterianos, agentes de antihipertrofia de próstata benigna, anticoagulantes, antidepressivos, antidiabéticos, antieméticos, antiepilépticos, agentes antigota, agentes antihipertensivos, agentes antiinflamatorios, antimalaria, agentes antimigraña, agentes antimuscarínicos, agentes antineoplásicos, agentes antiobesidad, agentes antiosteoporosis,

agentes antiparkinson, agentes antiproliferativos, agentes antiprotoso, agentes antitiroideos, agente antitusivo, agentes antiincontinencia urinaria, agentes antivirales, agentes ansiolíticos, supresores del apetito, beta-bloqueantes, agentes inotrópicos cardiacos, fármacos quimioterapéuticos, potenciadores del conocimiento, anticonceptivos, corticoesteroides, inhibidores de Cox-2, diuréticos, agentes de mejoramiento de la disfunción eréctil, expectorantes, agentes gastrointestinales, antagonistas del receptor de histamina, inmunosupresores, queratolíticos, agentes reguladores de lípido, inhibidores de leucotrieno, macrólidos, relajantes musculares, neurolépticos, agentes nutricionales, analgésicos opioides, inhibidores de la proteasa, o sedantes.

Ejemplos no limitantes de agentes lipófilos pueden incluir 7-Metoxipteridina, 7-Metilpteridina, abacavir, abafungina, abarelix, acebutolol, acenafteno, acetaminofeno, acetanilida, acetazolamida, acetohexamida, acitretina, acrivastina, adenina, adenosina, alatrofloxacina, albendazol, albuterol, alclofenac, aldesleucina, alemtuzumab, alfuzosina, alitretinoína, alobarbitol, alopurinol, todo-ácido transretinoico (ATRA), aloxiprin, alprazolam, alprenolol, altretamina, amifostina, amilorida, aminoglutetimida, aminopirina, amidarona HCl, amiodarona HCl, amitriptilina, amlodipina, amobarbital, amodiaquina, amoxapina, anfetamina, anfotericina, anfotericina B, ampicilina, amprenavir, amsacrina, amilnitrato, amilobarbitona, anastrozol, anrinona, antraceno, antraciclinas, aprobarbital, trióxido arsénico, asparaginasa, aspirina, astemizol, atenolol, atorvastatina, atovaquona, atrazina, atropina, atropina azatioprina, auranofina, azacitidina, azapropazona, azatioprina, azintamida, azitromicina, aztreonam, baclofeno, barbitona, BCG vivo, beclamida, beclometasona, bendroflumetiazida, benezepril, benidipina, benorilato, benperidol, bentazepam, benzamida, benzantraceno, benzatina penicilina, benzhexol HCl, benznidazol, benzodiacepinas, ácido benzoico, hidroxinaftoato de befenio, betametasona, bevacizumab (avastina), bexaroteno, bezafibrato, bicalutamida, bifenazol, biperidol, bisacodilo, bisantreno, bleomicina, bleomicina, bortezomib, brinzolamida, bromazepam, bromocriptina mesilato, bromperidol, brotizolam, budesonida, bumetanida, bupropión, busulfán, butalbital, butambén, butenafina HCl, butobarbitona, butobarbitona (butetal), butoconazol, butoconazol nitrato, butilparabeno, cafeína, calcifediol, calciprotieno, calcitriol, calusterona, cambendazol, camfor, camptotecina, análogos de camptotecina, candesartán, capecitabina, capsaicina, captopril, carbamazepina, carbimazol, carbofurán, carboplatino, carbomal, carimazol, carmustina, cefamandol, cefazolina, cefixima, ceftazidima, cefuroxima axetil, celecoxib, cefradina, cerivastatina, cetrizina, cetuximab, cloramfucilo, cloramfenicol, clordiazepóxido, clormetiazol, cloroquina, clortiazida, clorfeniramina, clorproguanilo HCl, clorpromazina, clorpropamida, clorprotixeno, clorpirifós, clortetraciclina, clortalidona, clorzoxazona, colecalciferol, crisenol, cilostazol, cimetidina, cinnarizina, cinoxacina, ciprofibrato, ciprofloxacina HCl, cisaprida, cisplatino, citalopram, cladribina, claritromicina, clemastina fumarato, clioquinol, clobazam, clofarabina, clofazimina, clofibrato, clomifeno citrato, clomipramina, clonazepam, clopidogrel, clotiazepam, clotrimazol, clotrimazol, cloxacilina, clozapina, cocaína, codeína, colchicina, colistina, estrógenos conjugados, corticosterona, cortisona, cortisona acetato, ciclizina, ciclobarbital, ciclobenzaprina, ciclobutano-espirobarbiturato, cicloetano-espirobarbiturato, cicloheptano-espirobarbiturato, ciclohexano-espirobarbiturato, cicloheptano-espirobarbiturato, ciclofosfamida, ciclopropano-espirobarbiturato, cicloserina, ciclosporina, ciproheptadina, ciproheptadina HCl, citarabina, citosina, dacarbazina, dactinomomicina, danazol, dantrón, dantroleno sodio, dapsona, darbepoetina alfa, darodipina, daunorrubicina, decoquinato, dehidroepiandrosterona, delavirdina, demeclociclina, denileucina, desoxicorticosterona, desoximetasona, dexametasona, dexanfetamina, dexclorfeniramina, dexfenfluramina, dexrazoxano, dextropropoxifeno, diamorfina, diatrizoicacid, diazepam, diazóxido, diclorofeno, diclorprop, diclofenac, dicumarol, didanosina, diflunisal, digitoxina, digoxina, dihidrocodeína, dihidroequilina, dihidroergotamina mesilato, diiodohidroxiquinolina, diltiazem HCl, diloxamida furoato, dimenhidrinato, dimorfolamina, dinitolmida, diosgenina, difenoxilato HCl, difenilo, dipiridamol, diritromicina, disopiramida, disulfiram, diurón, docetaxel, domperidona, donepezil, doxazosina, doxazosina HCl, doxorubicina (neutral), doxorubicina HCl, doxiciclina, dromostanolona propionato, droperidol, difilina, equinocandinas, econazol, econazol nitrato, efavirenz, elipticina, enalapril, enlimomab, enoximona, epinefrina, derivados de epipodofilotoxina, epirubicina, epoetina alfa, eposartán, equilenina, equilina, ergocalciferol, ergotamina tartrato, erlotinib, eritromicina, estradiol, estramustina, estriol, estrona, ácido etacrínico, etambutol, etinamato, etionamida, etopropazina HCl, etil-4-aminobenzoato (benzocaína), etilparabeno, etinilestradiol, etodolac, etomidato, etopósido, etretinato, exemestano, felbamato, felodipina, fenbendazol, fenbuconazol, fenbufeno, fenclorfos, fenclofenac, fenfluramina, fenofibrato, fenoldepano, fenoprofeno calcio, fenoxicarb, fempiclonilo, fentanilo, fenticonazol, fexofenadina, filgrastim, finasterido, flecamida acetato, floxuridina, fludarabina, fluconazol, fluconazol, flucitosina, fludioxonil, fludrocortisona, fludrocortisona acetato, ácido flufenámico, flunanisona, flunarizina HCl, flunisolida, flunitrazepam, fluocortolona, fluometurón, fluoreno, fluorouracilo, fluoxetina HCl, fluoximesterona, flupentixol decanoato, flufentixol decanoato, flurazepam, flurbiprofeno, fluticasona propionato, fluvastatina, ácido fólico, fosenopril, fosfenitoína sódica, frovatriptán, furosemida, fulvestrant, furazolidona, gabapentina, G-BHC (Lindano), gefitinib, gemcitabina, gemfibrozil, gemtuzumab, glafenina, glibenclamida, gliclazida, glimepirida, glipizida, glutetimida, gliburida, glicerilnitrato (nitroglicerina), acetato de goserelina, grepafloxacina, griseofulvina, guaifenesina, guanabenz acetato, guanina, halofantrina HCl, haloperidol, hidrocortizida, heptabarbital, heroína, hesperetina, hexaclorobenceno, hexetal, histrelina acetato, hidrocortisona, hidroflumetiazida, hidroxiaurea, hiosciamina, hipoxantina, ibritumomab, ibuprofeno, idarubicina, idobutal, ifosfamida, ihydroequilina, imatinib mesilato, imipenem, indapamida, indinavir, indometacina, indoprofeno, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, iodamida, ácido iopanoico, iprodiona, irbesartán, irinotecán, isavuconazol, isocarboxazida, isoconazol, isoguanina, isoniazida, isopropilbarbiturato, isoproturón, isosorbida dinitrato, isosorbida mononitrato, isradipina, itraconazol, itraconazol, itraconazol (Itra), ivermectina, ketoconazol, ketoprofeno, ketorolac, kelina, labetalol, lamivudina, lamotrigina, lanatósido C, lanosprazol, L-DOPA, leflunomida, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida acetato, levamisol, levofloxacina, lidocaína, linurón, lisinopril, lomefloxacina, lomustina, loperamida, loratadina, lorazepam, lorefloxacina, lormetazepam, losartán mesilato,

lovastatina, lisurido maleato, Maprotilina HCl, mazindol, mebendazol, Meclizina HCl, ácido meclofenámico, medazepam, medigoxina, medroxiprogesterona acetato, ácido mefenámico, Mefloquina HCl, megestrol acetato, melfalán, mepenzolato bromuro, meprobamato, meptazinol, mercaptopurina, mesalazina, mesna, mesoridazina, mestranol, metadona, metaqualona, metocarbamol, metoína, metotrexato, metoxsaleno, metsuximida, meticlotiazida, metilfenidato, metilfenobarbitona, metil-p-hidroxibenzoato, metilprednisolona, metiltestosterona, metiprilón, metisergida maleato, metoclopramida, metolazona, metoprolol, metronidazol, Mianserina HCl, miconazol, midazolam, mifepristona, miglitol, minociclina, minoxidil, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, mofetilmicofenolato, molindona, montelukast, morfina, Moxifloxacina HCl, nabumetona, nadolol, nalbufina, ácido nalidíxico, nandrolona, naftaceno, naftaleno, naproxeno, naratriptán HCl, natamicina, nelarabina, nelfinavir, nevirapina, nicardipina HCl, nicotin amida, ácido nicotínico, nicoumalona, nifedipina, nilutamida, nimodipina, nimorazol, nisoldipina, nitrazepam, nitrofurantoina, nitrofurazona, nizatidina, nofetumomab, noretisterona, norfloxacin, norgestrel, nortriptilina HCl, nistatina, oestradiol, ofloxacino, olanzapina, omeprazol, omoconazol, ondansetrón HCl, oprelvekina, ornidazol, oxaliplatino, oxamniquina, oxantelemonato, oxaprozina, oxatomida, oxazepam, oxcarbapentina, oxfendazol, oxiconazol, oxprenolol, oxifenbutazona, oxifenciclimina HCl, paclitaxel, palifermina, pamidronato, ácido p-aminosalicílico, pantoprazol, parametadiona, paroxetina HCl, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pemetrexedisodio, penicilamina, pentaeritritol tetranitrato, pentazocin, pentazocina, pentobarbital, pentobarbitona, pentostatina, pentoxifilina, perfenazina, perfenazina pimozida, perileno, fenacemida, fenacetina, fenantreno, fenindiona, fenobarbital, fenolbarbitona, fenoltaleína, fenoxibenzamina, fenoxibenzamina HCl, fenoximetil penicilina, fensuximida, fenilbutazona, fenitoína, pindolol, pioglitazona, pipobroman, piroxicam, pizotifeno maleato, compuestos de platino, plicamicina, polienos, polimixina B, porfímero sódico, posaconazol (Posa), pramipexol, prasterona, pravastatina, praziquantel, prazosina, prazosina HCl, prednisolona, prednisona, primidona, probarbital, probenecid, probucol, procarbazona, proclorperazina, progesterona, proguanilo HCl, prometazina, propofol, propoxur, propranolol, propilparabeno, propiltiouracilo, prostaglandina, pseudoefedrina, pteridina-2-metil-tiol, pteridina-2-tiol, pteridina-4-metil-tiol, pteridina-4-tiol, pteridina-7-metil-tiol, pteridina-7-tiol, pirantelemonato, pirazinamida, pireno, piridostigmina, pirimetamina, quetiapina, quinacrina, quinapril, quinidina, quinidina sulfato, quinina, quinina sulfato, rabeprazol sodio, ranitidina HCl, rasburicasa, ravuconazol, repaglinida, reposal, reserpina, retinoides, rifabutina, rifampicina, rifapentina, rimexolona, risperidona, ritonavir, rituximab, rizatriptán benzoato, rofecoxib, ropinirol HCl, rosiglitazona, sacarina, salbutamol, salicilamida, ácido salicílico, saquinavir, sargramostim, secbutabarbital, secobarbital, sertaconazol, sertindol, sertralina HCl, simvastatina, sirolimus, sorafenib, esparfloxacin, espiramicina, espironolactona, estanolona, estanozolol, estavudina, estilbestrol, estreptozocina, estriocina, sulconazol, sulconazol nitrato, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfanilamida, sulfatiazol, sulindac, sulfabenzamida, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfadoxina, sulfafurazol, sulfamerazina, sulfa-metoxazol, sulfapiridina, sulfasalazina, sulfipirazona, sulpirido, sultiame, sumatriptán succinato, sunitinib maleato, tacrina, tacrolimus, talbutal, tamoxifeno citrato, tamulosina, targretina, taxanos, tazaroteno, telmisartán, temazepam, temozolomida, tenipósido, tenoxicam, terazosina, terazosina HCl, terbinafina HCl, terbutalina sulfato, terconazol, terfenadina, testolactona, testosterona, tetraciclina, tetrahidrocannabinol, tetraoxoprim, talidomida, tebaína, teobromina, teofilina, tiabendazol, tiamfenicol, tioguanina, tioridazina, tiotepa, totoína, timina, tiagabina HCl, tibolona, ticlopidina, tinidazol, tioconazol, tirofibán, tizanidina HCl, tolazamida, tolbutamida, tolcapona, topiramato, topotecán, toremifeno, tositumomab, tramadol, trastuzumab, trazodona HCl, tretinoína, triamcinolona, triamtereno, triazolam, triazoles, triflupromazina, trimetoprim, trimipramina maleato, trifenileno, troglitazona, trometamina, tropicamida, trovafloxacina, tibamato, ubidecarenona (coenzima Q10), ácido undecenoico, uracilo, uracil mostaza, ácido úrico, ácido valproico, valubicina, valsartán, vancomicina, venlafaxina HCl, vigabatrina, vinbarbital, vinblastina, vincristina, vinorelbina, voriconazol, xantina, zafirlukast, zidovudina, zileutón, zoledronato, ácido zoledrónico, zolmitriptán, zolpidem y zopiclona.

En aspectos particulares, los agentes pueden ser Busulfán, taxano u otros agentes anticancerosos; o alternativamente, itraconazol (Itra) y posaconazol (Posa) u otros miembros de la clase general de compuestos de azol. Azoles antifúngicos ilustrativos incluyen a) imidazoles tales como miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol y tioconazol, b) triazoles tales como fluconazol, itraconozacol, isavuconazol, ravuconazol, Posaconazol, voriconazol, terconazol y c) tiazoles tales como abafungina. Otros fármacos que se pueden solubilizar con este planteamiento incluyen, pero no se limitan a, fármacos hipertiroideos tales como carimazol, agentes anticancerosos como agentes citotóxicos tales como derivados de epipodofilotoxina, taxanos, bleomicina, antraciclinas, así como compuestos de platino y análogos de camptotecina. También pueden incluir otros antibióticos antifúngicos, tales como equinocandinas escasamente solubles en agua, polienos (por ejemplo, Anfotericina B y Natamicina) así como agentes antibacterianos (por ejemplo, polimixina B y colistina), y fármacos antivirales. Los agentes también pueden incluir un agente psiquiátrico tal como un agente antipsicótico, agente antidepresivo, o agentes analgésicos y/o tranquilizantes tales como benzodicepinas. Los agentes también pueden incluir un agente que altera el nivel de conciencia o un agente anestésico, tal como propofol. En un más amplio aspecto, la presente invención puede proporcionar procedimientos para solubilizar y administrar de manera segura muchos principios farmacéuticamente activos escasamente solubles en agua.

Como ventaja adicional, cualquier composición descrita en el presente documento puede obviar la necesidad de un tensioactivo, por tanto, no se puede usar un tensioactivo de éster de ácido graso de polietilenglicol (PEG) (pero no el propio PEG) u otros tensioactivos en ciertos aspectos. En otros aspectos, se puede usar un tensioactivo conocido en la técnica.

Se puede usar un disolvente líquido anfífilo para promover/estimular un ambiente no polar/lipófilo. El disolvente polimérico líquido anfífilo puede ser de un tipo de polímero sencillo, o tiene al menos dos tipos de polímero en algunos aspectos. Por ejemplo, el disolvente polimérico líquido anfífilo puede ser un disolvente de PEG tal como PEG-100, -200, -300, -400, -800, -1000 y similares. Un ejemplo particular puede ser PEG-400. El PEG usado en el presente documento puede excluir cualquier PEG que está en un estado sólido a una temperatura seleccionada tal como temperatura ambiente, temperatura corporal o una temperatura de al menos, aproximadamente o como mucho 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 °C, o cualquier intervalo o valor derivable de las mismas, tal como PEG con un peso molecular alto (peso molecular promedio de al menos o más de 1.600, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 10.000 Da o cualquier intervalo intermedio). Por ejemplo, el disolvente líquido puede ser PEG-800 o PEG-1000 ya que son líquidos a temperatura corporal.

Para facilitar la solubilización de los agentes lipófilos, la composición que implica los agentes lipófilos puede comprender además un agente de protonación para facilitar la protonación de los grupos reactivos en agentes lipófilos. Por ejemplo, el agente de protonación es un ácido, alcohol o alcohol acidificado (tal como alcohol bencílico, y/o etanol acidificado). Ejemplos no limitantes de ácido incluyen HCl, ácido cítrico, ácido acético o ácido glutámico u otros ácidos inorgánicos conocidos en la técnica. La composición puede tener un pH ácido, tal como un valor de pH o intervalo derivado de un pH de desde aproximadamente 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6,5 y 6,9, preferentemente en un intervalo de desde aproximadamente 1 a aproximadamente 6.

La invención también incluye un procedimiento de preparación de una solución homogénea no acuosa anteriormente descrita que comprende las etapas de: obtener una primera solución homogénea no acuosa que comprende un agente farmacéutico lipófilo, un disolvente polimérico líquido anfífilo y un disolvente orgánico volátil, y separar el disolvente orgánico volátil de la primera solución para formar una segunda solución homogénea no acuosa como se describe en el presente documento ("solución madre (*stock*)" o se puede usar en el uso clínico final). El disolvente orgánico volátil se puede usar para facilitar la unión de los agentes lipófilos al disolvente polimérico por interacciones electrostáticas. Ejemplos no limitantes pueden incluir acetona, cloroformo, hidrocarburos alifáticos, acetato de etilo, glicol éteres, dietil éter o etanol. Un ejemplo particular puede ser acetona. El procedimiento se puede definir como un procedimiento para preparar una formulación parenteral farmacéuticamente aceptable homogénea no acuosa ya que puede comprender, además, la dilución de la segunda solución anteriormente descrita con un diluyente acuoso deseado para producir una formulación de uso clínico final.

En aspectos adicionales, la relación en volumen o peso del disolvente orgánico volátil y el disolvente polimérico líquido anfífilo puede ser de aproximadamente 100:1 a 1:100, o particularmente, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 o cualquier intervalo derivable de las mismas. Para facilitar la interacción entre los grupos reactivos en los agentes lipófilos y disolventes anfífilos, el disolvente orgánico volátil o el diluyente acuoso deseado puede estar acidificado. El procedimiento puede comprender además almacenamiento de la composición durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 semanas, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años o cualquier valor o intervalo derivable de los mismos.

Cualquiera de las etapas del procedimiento, tal como la separación de los disolventes orgánicos volátiles o almacenamiento de cualquier composición, se puede realizar a una temperatura de al menos, aproximadamente o como mucho 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 °C, o cualquier intervalo o valor derivable de las mismas. En un aspecto particular, la temperatura puede ser temperatura ambiente. El procedimiento de separación puede incluir cualquier procedimiento que se sabe que separa un disolvente orgánico volátil, tal como evaporación, más particularmente, evaporación asistida por vacío. La separación se puede ampliar para extraer el agente de protonación.

Después de la separación del disolvente orgánico volátil, la composición puede ser estable durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 semanas, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años o cualquier valor o intervalo derivable de los mismos. La composición se puede diluir además con un diluyente acuoso deseado para facilitar su administración clínica. Por ejemplo, el diluyente acuoso puede ser un fluido de infusión seleccionado del grupo que consiste en solución salina normal, dextrosa en agua, y un fluido de emulsión de infusión basado en lípido. En particular, el fluido de infusión acuoso puede ser cloruro de sodio (SSN) al 0,9 %, o dextrosa en agua al 5 % o 10 % (D5A y D10A, respectivamente), o una emulsión lipídica acuosa tal como Intralipid™, o Liposyn™. En un aspecto adicional, tal diluyente acuoso se puede modificar mediante la adición de un agente de protonación o con una cantidad pequeña de PEG como se describió anteriormente. Tal modificación del diluyente puede ser preferida si el agente de protonación se separa de la solución madre. La formulación de uso final estable resultante puede contener el agente farmacéutico disuelto que, disuelto a temperatura ambiente (TA), continúa estable durante un tiempo prolongado para permitir el manejo y administración conveniente a los pacientes.

En aspectos adicionales, la invención incluye un procedimiento de preparación de un principio farmacéuticamente activo insoluble en agua/lipófilo para uso parenteral que comprende las etapas de: solubilizar el principio farmacéuticamente activo en un disolvente orgánico (volátil), mezclándolo con un segundo agente hidrófobo no volátil. El segundo disolvente puede preferentemente tener propiedades anfífilas, tal como PEG. El procedimiento además puede comprender separar por evaporación el componente disolvente orgánico más volátil bajo vacío de modo que surge una atracción electrostática local que une el principio farmacéuticamente activo al disolvente

anfífilico secundario. De este modo la preparación física del principio farmacéuticamente activo se puede prevenir, produciendo así una formulación madre. En un aspecto adicional, el procedimiento puede comprender mezclar el complejo principio farmacéuticamente activo disuelto/disolvente anfífilico (por ejemplo, PEG) con un diluyente acuoso final para proporcionar una formulación de uso clínico que se puede administrar parenteralmente. Por ejemplo, el disolvente orgánico es acetona o cloroformo, o dietil éter, con o sin adición de una pequeña cantidad de un ácido para facilitar la protonación del principio farmacéuticamente activo para incrementar la atracción electrostática al disolvente secundario. Preferentemente el disolvente anfífilico secundario es un polímero tal como PEG. El principio farmacéuticamente activo puede ser un agente alquilante de ADN bifuncional tal como Busulfán (Bu) o, alternativamente, puede ser un agente antimicrobiano tal como un compuesto de azol usado para tratar infecciones fúngicas o parasíticas, o agente hipnótico o sedativo usado en marcos psiquiátricos o anestésicos, o alternativamente puede ser un agente usado para el control del síntoma tal como un agente anestésico o que altera el nivel de conciencia tal como un anestésico general. Además, para incrementar la atracción electrostática estable entre el principio farmacéuticamente activo y el disolvente anfífilico tal como PEG, la extracción bajo vacío se puede ampliar significativamente para eliminar el exceso de ácido (libre) del complejo fármaco/PEG. Por último, el procedimiento puede comprender la etapa de mezclar la formulación madre con un diluyente secundario, tal como un fluido de infusión acuoso, para permitir la administración del principio farmacéuticamente activo en un animal doméstico o más preferentemente, en un ser humano.

La invención también puede incluir un procedimiento para tratar un sujeto que tiene una enfermedad o afección sensible o que responde a un agente farmacéutico lipófilo, que comprende: administrar parenteralmente al sujeto una cantidad disuelta terapéuticamente eficaz de una composición que comprende una solución o una formulación anteriormente descrita, en el que la solución o formulación tiene el agente farmacéutico lipófilo al cual la enfermedad o afección es sensible o responde.

En un aspecto particular, la invención también incluye un procedimiento para tratar una enfermedad sensible o que responde a Bu que comprende: administrar parenteralmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de Bu al paciente. La composición de Bu se puede preparar disolviendo Bu en un primer disolvente que comprende un disolvente orgánico volátil, preferentemente acetona, mezclando a continuación la solución con un segundo disolvente anfífilico, preferentemente PEG, evaporando posteriormente el primer disolvente orgánico bajo vacío para crear una formulación madre de Bu en PEG, y diluyendo opcionalmente con un segundo diluyente acuoso, tal como un fluido de infusión acuoso.

Otra realización más de la invención está dirigida a un procedimiento para la administración parenteral de Bu a un paciente que comprende: proporcionar Bu en un disolvente hidrófobo volátil y orgánico, mezclado posteriormente con un segundo disolvente no volátil anfífilico; evaporar el primer disolvente hidrófobo para producir una formulación madre de Bu que se puede o bien administrar directamente al paciente, o mezclar la formulación madre con un diluyente acuoso secundario para formar un fluido de infusión; y administrar el fluido de infusión a un paciente. Por ejemplo, el primer disolvente orgánico volátil es acetona, y el disolvente anfífilico secundario es PEG-400.

Las vías de administración pueden incluir, pero no se limitan a, administración intravascularmente, intracavitariamente, intratecalmente, subcutáneamente, intramuscularmente o tópicamente. El sujeto puede ser un mamífero, particularmente un animal doméstico o un ser humano.

En ciertos aspectos, el sujeto tiene un cáncer o una necesidad de acondicionamiento del sujeto para realizar un trasplante de médula ósea o un trasplante de células madre hematopoyéticas y el agente farmacéutico lipófilo es Busulfán. En otros aspectos, el sujeto tiene una enfermedad fúngica, de levadura o moho y el agente farmacéutico lipófilo es un agente de azol. En aspectos adicionales, el sujeto tiene una enfermedad psiquiátrica o una necesidad de control sintomático y el agente farmacéutico lipófilo es un agente psiquiátrico, tal como un agente antipsicótico, antidepresivo o un agente analgésico. El sujeto tiene una necesidad de alterar el nivel de conciencia o inducir anestesia general o sedación de conciencia y el agente farmacéutico lipófilo es un agente que altera el nivel de conciencia o un anestésico como Propofol.

Otros objetos y ventajas de la invención se exponen en parte en la descripción que sigue y, en parte, serán obvios a partir de esta descripción, o se pueden aprender a partir de la práctica de la invención.

### **Breve descripción de los dibujos**

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria y están incluidas para demostrar más ciertos aspectos de la invención. La invención se puede entender mejor en referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

Figuras 1A-B. (A) Un gráfico que muestra la estabilidad de Busulfán a temperatura ambiente en la formulación de uso final de Bu/VE-acetona/PEG (es decir, vehículo de disolvente madre prototipo) que contiene Bu a una concentración aproximada de 5 mg/ml después de extracción bajo vacío de acetona. (B) La formulación madre se diluye con D5A a 1 mg/ml (parte superior) y a 0,5 mg/ml (inferior). El eje X representa el tiempo en horas, y el eje Y representa la concentración medida en mg/ml.

Figura 2. Curva patrón de la concentración de Busulfán frente al área bajo la curva (ABC; área bajo la curva,

término usado para indicar el área medido real de un pico en un cromatograma, y también para el área bajo la concentración en plasma frente a la curva de tiempo durante varias horas después de la administración de un fármaco a un animal o ser humano) para el ensayo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usado en los estudios de estabilidad *in vitro* y farmacología *in vivo*. El eje X muestra la concentración en  $\mu\text{g/ml}$ , y el eje Y muestra la ABC. Se preparó una curva patrón análogo para los estudios de farmacología.

Figura 3. Cromatogramas obtenidos a partir del ensayo de HPLC en los estudios de estabilidad. Los inventores usaron la columna Nova-Pak C18 de Waters (tamaño de perla de  $4\ \mu\text{m}$ ;  $150\ \text{mm} \times 3,9\ \text{mm}$ ). El volumen de muestra inyectado era de  $30\ \mu\text{l}$ . Las condiciones de la HPLC se describen en el Ejemplo 1.

Figura 4. Un gráfico que muestra el potencial hemolítico de la formulación de uso de Bu/VE-acetona/PEG/D5A, y la misma formulación ("disolvente") sin Busulfán. El eje x muestra el contenido de disolvente en porcentaje en volumen (v/v). El eje y muestra la fracción calculada de glóbulos rojos no hemolizados.

Figuras 5A-C. Gráfico que representa la actividad citotóxica de Busulfán en la formulación de uso clínico PEG/D5A frente a las líneas celulares humanas KBM-3 (A) (Andersson y col., 1992) y KBM-7 (B) (Andersson y col., 1987; Andersson y col., 1995), valoradas *in vitro* con el ensayo con MTT. El eje X muestra la concentración de Bu en  $\mu\text{g/ml}$ ; el eje Y muestra la fracción de supervivencia celular calculada. Como control positivo sirvieron células expuestas en paralelo a Busulfán en DMSO. (C) muestra la actividad citotóxica de DMA sola en el ensayo con MTT a la concentración más alta alcanzada cuando se usó DMA-Bu como control positivo en las líneas celulares KBM3, KBM7, B5/Bu250-6, y en la OCI-AML3 (Wang y col., 1991). Los últimos resultados corresponden a una concentración que se puede alcanzar cuando se usa DMA-Bu para terapia pre-TCMH con dosis repetidas durante 3 a 4 días.

Figura 6. Sensibilidad de tres de las líneas celulares a Bu en DMSO y en la nueva formulación en relación con los efectos citotóxicos alcanzados con la formulación de DMA-Bu. Digno de mención es la fracción de toxicidad significativamente mayor/supervivencia inferior en concentraciones de Bu crecientes con la formulación de DMA-Bu y, en particular, en la línea celular KBM-3 la contribución de DMA a la citotoxicidad total es significativa. A partir de los datos parece que los efectos de DMA y Bu son sinérgicos más que aditivos (Chou y Talalay, 1984). Por el contrario, la actual formulación novedosa y la formulación de referencia DMSO-Bu ejercen virtualmente efectos citotóxicos idénticos en todas las líneas celulares ensayadas y no hay efecto(s) tóxico(s) añadido(s) a partir del vehículo disolvente.

Figura 7A-C. Cromatogramas de muestras de plasma extraídas como se describe más adelante en el Ejemplo 3 y, a continuación, analizados con HPLC. (A) El panel superior muestra una muestra blanco de plasma, (B) el panel medio muestra una muestra de plasma humano enriquecido con Busulfán en la nueva formulación (vehículo disolvente de uso prototipo de Bu/VE-acetona/PEG/D5A) a  $10\ \mu\text{g/ml}$ , con un tiempo de retención de aproximadamente 2,8 minutos. (C) El panel inferior muestra un cromatograma del estudio de farmacología, en el que un ratón es inyectado con Busulfán a  $10\ \text{mg/kg}$ . El cromatograma era de una muestra sacada 20 minutos después de la inyección del fármaco.

Figura 8. Gráfico que muestra el cambio en la concentración en plasma durante 4 horas después de la inyección de  $10\ \text{mg/kg}$  de Busulfán en ratones. El eje X muestra el tiempo después de la dosificación en horas. El eje Y muestra la concentración de Busulfán en  $\mu\text{g/ml}$  de plasma. La semivida de Busulfán aparente está en el intervalo aproximado de 2,5 a 3,5 horas bajo las condiciones usadas con esta nueva formulación, similar a lo que previamente se ha informado para la DMA-Bu en ratas y en humanos (Bhagwatwar y col., 1996; Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Madden y col., 2007).

Figuras 9A-B. Estabilidad de (A) Itra y (B) Posa en una formulación variante durante un periodo de 3 semanas a TA.

Figuras 10A-B. Estabilidad de (A) Itra y (B) Posa en las formulaciones de uso final diluidas en D5A.

Figura 11. Fotografía del ensayo de sensibilidad *in vitro* de especies de *Aspergillus* a Itraconazol en la nueva formulación, para detalles véase el texto.

Figuras 12A-D. Cromatogramas de Itra y Posa de la HPLC como plasma solo, y plasma enriquecido con Itra y Posa en los estudios de estabilidad.

Figuras 13A-C. Cromatogramas de plasma blanco (panel superior), Posa después del enriquecimiento del plasma humano (panel medio), así como Posa en una muestra obtenida 2 horas después de inyección IV de  $5\ \text{mg/kg}$  de Posa en ratones (panel inferior) como se describe más adelante en el protocolo experimental en el texto.

Figuras 14A-B. Concentraciones en plasma después de la inyección de Itra (Fig. 14A; durante 2 horas) y Posa (Fig. 14B; durante 30 horas) inyectadas a una dosis de  $5\ \text{mg/kg}$  lentamente IV (durante 3 a 4 min) como se describe más adelante en los procedimientos en el texto. Las concentraciones en plasma están en un intervalo similar al previamente descrito en humanos tratados con los correspondientes fármacos orales en un marco

clínico. La figura muestra el resultado promedio de 2 experimentos diferentes, los momentos y las concentraciones individuales se detallan en la tabla adjunta.

### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas**

- 5 Ciertos aspectos de la presente invención se dirigen a formulaciones novedosas que contienen agentes lipófilos tales como Busulfán o agentes antiinfecciosos, perteneciendo preferentemente a la clase general de compuestos descritos como azoles, que se pueden administrar parenteralmente. Un aspecto de la invención proporciona un agente lipófilo solubilizado en complejo, vehículos farmacéuticamente aceptables de modo que el agente disuelto continúa físicamente y químicamente estable durante tiempo prologado. La invención permite la administración parenteral del fármaco en dosis necesarias para obtener efectos farmacéuticos significativos tales como efectos citotóxicos e inmunosupresores en sujetos como humanos y animales domésticos sin toxicidad indebida de cualquier componente del vehículo disolvente usado. Realizaciones ilustrativas de la invención permiten la administración parental, por ejemplo, intravascular o intratecal o intracavitaria de agentes solubilizados para incrementar la seguridad de la administración clínica del fármaco. Como resultado, se puede conseguir un control mejorado de enfermedades que son sensibles a este agente tal como enfermedades malignas y autoinmunes.
- 10
- 15 En ciertos aspectos, se puede proporcionar un procedimiento de preparación de (a) principio(s) farmacéuticamente activo(s) difícil(es) de solubilizar, "insoluble(s) en agua" o lipófilo(s) para uso parenteral. Principios farmacéuticamente activos lipófilos adecuados pueden incluir Busulfán, agentes de azol tales como Itra y Posa, o cualquier agente lipófilo conocido en la técnica, como se ilustra en el presente documento. Ciertos aspectos de la presente invención, que se pueden basar en el principio de cosolvenencia, pero sin desear quedar ligado a teoría alguna, usan una serie novedosa de vehículos diluyentes compuesto para solubilizar agentes lipófilos, tales como Busulfán, itraconazol (Itra) y posaconazol (Posa), sin afectar a su actividad farmacéutica mientras se mejora la solubilidad acuosa y estabilidad. Además, los disolventes preferidos son, en las concentraciones propuestas y dosis totales usadas, no tóxicos y seguros para humanos y mamíferos, lo más preferentemente en humanos y animales domésticos.
- 20
- 25 Los procedimientos pueden comprender primero disolver el principio farmacéuticamente activo en un disolvente hidrófobo volátil primario seguido de mezcla de un segundo disolvente anfífilico no volátil. Los procedimientos además pueden comprender separar (por ejemplo, por extracción bajo vacío) el disolvente volátil primario para proporcionar una formulación madre clínicamente aceptable que comprende el agente y el disolvente anfífilico. Los procedimientos pueden comprender opcionalmente diluir la formulación madre con un disolvente acuoso, tal como un fluido de infusión como D5A o D10A o SSN. Preferentemente, el disolvente volátil primario es acetona y el segundo disolvente anfífilico es PEG-400.
- 30
- 35 Además de acetona y PEG, se pueden usar otros disolventes orgánicos para formar el vehículo disolvente sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Un disolvente volátil puede ser un disolvente sencillo o una mezcla de disolventes que son volátiles, incluyendo agua y disolventes que son más volátiles que el agua. Ejemplos no limitantes de disolventes volátiles que se pueden usar en la presente invención incluyen acetona, cloroformo, hidrocarburos alifáticos, acetato de etilo, glicol éteres, dietil éter, acetato de isoamilo, alcohol desnaturalizado, metanol, etanol, alcohol isopropílico, propanol, hidrocarburos C4-C6, butano, isobuteno, pentano, hexano, acetona, clorobutanol, acetato de etilo, fluoro-cloro-hidrocarburos, turpentina, metil etil cetona, metil éter, hidrofluorocarburos, etil éter, 1,1,1,2-tetrafluoretano, 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano, 1,1,1,3,3,3 hexafluoropropano, y combinaciones
- 40
- 45 de los mismos. El disolvente volátil se puede separar básicamente por evaporación para formar una solución homogénea que comprende el agente y el disolvente líquido anfífilico básicamente libre del disolvente volátil. El uso del término "básicamente" cuando se refiere a la separación de los disolventes volátiles significa que una mayoría del(los) disolvente(s) que se incluye(n) en la formulación inicial se ha separado.
- Disolventes anfífilicos no volátiles pueden ser uno o más disolventes que son menos volátiles que el agua. Igualmente, un disolvente no volátil se define como un disolvente que es menos volátil que el agua. Preferentemente, el disolvente no volátil puede contener sustancias que son líquidas a temperatura ambiente. Después de la evaporación del disolvente volátil, la mayoría del sistema disolvente no volátil debería continuar en una solución homogénea que comprenda el agente lipófilo.
- 50
- 55 Para algunos agentes hidrófobos, en fármacos particulares que contienen grupos funcionales (amino) reactivos no cargados, la atracción electrostática entre el disolvente anfífilico tal como PEG y el principio farmacéuticamente activo se puede aumentar añadiendo un agente de protonación tal como un ácido orgánico o HCl, o un alcohol tal como alcohol bencílico, al primer disolvente orgánico antes de mezclar el fármaco solubilizado con PEG. Después de la separación del primer disolvente orgánico a la formulación de uso final se llega por la mezcla de un fluido de infusión acuoso clínicamente aceptable. Si la última etapa preferida de uso de un agente de protonación (ácido) para incrementar la atracción electrostática entre el principio farmacéuticamente activo y PEG, a continuación, se puede utilizar una extracción bajo vacío prolongada para asegurar la extracción no solamente del primer disolvente orgánico sino también del ácido libre restante. Dicha separación de ácido libre en exceso permitirá prolongar la semivida del principio farmacéuticamente activo cuando se une al agente anfífilico tal como PEG. Si se utiliza el último planteamiento entonces se prefiere que la reconstitución antes de la administración *in vivo* se haga usando
- 60 D5A o D10A acidificado como diluyente final para mantener la atracción electrostática óptima entre el principio

farmacéuticamente activo y PEG para prevenir la precipitación del agente antes de la administración parenteral.

Como se muestra en los Ejemplos, Busulfán (Bu) y dos agentes de azol antifúngicos prototipos se formularon con éxito para la administración parenteral, utilizando un planteamiento de sistema disolvente novedoso. Por ejemplo, los fármacos lipófilos se pueden solubilizar en un vehículo disolvente primario volátil mezclado con (a) disolvente(s) de polímero anfífilo(s) no tóxico(s) y no volátil(es). En una realización particular, el disolvente primario puede ser un disolvente orgánico volátil tal como acetona, o cloroformo. Posteriormente el primer disolvente volátil se puede separar, por ejemplo, por extracción bajo vacío, pero los fármacos pueden continuar solubilizados en una solución del disolvente polímero. Un diluyente opcional, por ejemplo, un fluido de infusión clínicamente aceptable tal como D5A, puede permitir la dilución de la solución extraída bajo vacío en formulaciones de uso clínico que son estables para muchas (más de 12) horas a TA. Como beneficio añadido de la(s) nueva(s) formulación(es) también se debería mencionar que cuando se diluye(n) en la formulación de uso final, la composición actual permite que fármacos lipófilos se administren con solubilidad y estabilidad mejorada en la formulación de uso final. Por ejemplo, Bu se podría administrar a una concentración mayor de al menos 1 mg/ml en comparación con DMA-Bu actualmente usado en solamente 0,5 mg/ml y tiene una estabilidad más prolongada en TA (al menos aproximadamente 15 horas frente a 6 horas para DMA-Bu), ambos contribuyen a mejorada seguridad de paciente y conveniencia en el manejo rutinario de fármaco de la farmacia.

En una realización particular de la invención, Bu se puede disolver usando un disolvente volátil tal como acetona y, a continuación, se combina con un disolvente anfífilo tal como PEG como el sistema de vehículo o disolvente compuesto. Si esta mezcla Bu/acetona/PEG solubilizada se mezcla con agua, el Bu continúa en solución sin precipitación durante varias horas. Sin embargo, debido a la toxicidad de la acetona a tejidos mamíferos (Dwivedi, 2002; "VICH Steering Committee", 2010; "The Food and Drug Administration", 2010; "The Office of Environmental Health Hazard Assessment", 2010), la acetona se puede separar preferentemente bajo vacío, de modo que el principio farmacéuticamente activo puede llegar a estar electrostáticamente atraído/unido a PEG en una solución no acuosa, un procedimiento que no se ha documentado previamente. Las formulaciones madre de Bu como ejemplo novedosas (es decir, antes de la adición del diluyente secundario/final) pueden ser estables durante muchas semanas a temperatura ambiente, son simples para manejar, y proporcionan administración de dosis uniforme, fiable y fácilmente controlada. Antes de la administración tal como la administración parenteral, la solución madre no acuosa, a continuación, se puede diluir (opcionalmente) en un diluyente secundario tal como un fluido de infusión fácilmente disponible, por ejemplo, dextrosa en agua al 5 a 10 % (D5A y D10A, respectivamente). La solución madre no acuosa (composiciones variantes de Bu-PEG) puede ser miscible en diluyentes acuosos secundarios/finales, o fluidos de infusión acuosos rutinariamente disponibles, por ejemplo, cloruro de sodio al 0,9 % (solución salina normal, SSN) y D5A, así como una solución madre (tal como D5A) con 10 a 25 % (v/v) de un polímero anfífilo (por ejemplo, PEG). Tales diluyentes/fluidos de infusión terminales son ejemplos típicos de vehículos usados para solubilizar principios farmacológicamente activos para la administración humana, solos o en combinación con otros fármacos. La mezcla de una pequeña cantidad de un polímero anfífilo al fluido de infusión acuoso estabilizará más el compuesto lipófilo cuando se prepara para la infusión parenteral.

El Busulfán como agente anticanceroso oralmente administrado se ha investigado previamente exhaustivamente en humanos y en la última década estos datos han sido complementados con resultados obtenidos con la formulación parenteral basada en DMA; Busulfán tiene propiedades citotóxicas, mielosupresoras, así como inmunosupresoras bien documentadas en marcos tanto clínicos como experimentales. Desafortunadamente, Bu es un agente alquilante de ADN escasamente soluble en agua con extremadamente baja solubilidad en disolventes acuosos fisiológicamente aceptables que serían compatibles con la administración parenteral humana. Antes de la presente invención, las únicas formas de administración disponibles han sido una preparación oral y la formulación parenteral basada en DMA. Una formulación parenteral de Bu que está libre del riesgo de sucesos adversos relacionados con el alto contenido de DMA no ha estado disponible. Tal formulación de Bu parenteral sería útil para evaluar Bu por sí mismo y en combinación con otros fármacos como parte de terapia individualizada para trastornos sistémicos malignos y autoinmunes, así como cuando es deseable profunda inmunosupresión a largo plazo, por ejemplo, como se requiere en la preparación para trasplante de células madre hematopoyéticas (alógenas) (TCMH) para tanto trastornos malignos como no malignos, por ejemplo, lo más frecuentemente congénitos/genéticos. Una formulación parenteral puede necesitar seguridad de dosis completa y biodisponibilidad al 100 % garantizada.

Como se discute en los Ejemplos de más adelante, se han descubierto vehículos novedosos que consiguen la solubilización farmacéuticamente aceptable estable de Bu, haciéndolo de ese modo seguro para administrar este fármaco intravascularmente sin la toxicidad indebida de DMA, algo previamente inalcanzable. Los datos en los Ejemplos demuestran que las formulaciones de Bu novedosas se pueden usar para el tratamiento parenteral de enfermedades autoinmunes avanzadas, así como en la terapia de acondicionamiento para TCMH.

Busulfán es muy hidrófobo/lipófilo, y con el fin práctico insoluble en agua y PEG. El uso de un disolvente hidrófobo volátil tal como acetona lo disuelve y a través de la adición de un disolvente líquido anfífilo tal como PEG con posterior evacuación del disolvente volátil se puede contemplar que el Bu está electrostáticamente estabilizado/unido al disolvente líquido anfífilo tal como PEG, de modo que tolera más la dilución en un diluyente acuoso o plasma sanguíneo sin precipitación física inminente o degradación química. La estabilidad de la nueva formulación puede permitir manejo combinado y tiempos de infusión por encima de 12 horas sin pérdida significativa de la actividad del fármaco.

Como se muestra en los Ejemplos, los vehículos basados en acetona-PEG descritos se usaron con éxito para disolver Bu a concentraciones que oscilan de 0,1 a al menos 10 mg/ml. Este intervalo es lo suficientemente amplio para cubrir la administración de dosis necesarias para producir concentraciones citotóxicas *in vivo* cuando se tratan cánceres sensibles a este fármaco. Igualmente, este intervalo permite la administración de la(s) dosis necesaria(s) para conseguir la inmunosupresión eficaz en pacientes con trastornos autoinmunes y aquellos que se someten a terapia de acondicionamiento pre-TCMH.

Los datos obtenidos en los Ejemplos demuestran además que la(s) formulación(formulaciones) de Bu estable(s) puede(n) permitir tratamiento parenteral de enfermedades malignas y autoinmunes sistémicas. Esta preparación puede proporcionar consecuentemente biodisponibilidad de fármaco al 100 %, y puede permitir la elusión de la extracción de primer paso hepático. Después de una breve inyección IV, las concentraciones de Bu en plasma claramente alcanzan, y durante tiempo prolongado continúan en, el intervalo citotóxico establecido por los estudios *in vitro* de su actividad citotóxica frente a líneas celulares malignas humanas, y estas concentraciones también se comparan favorablemente con varias investigaciones que utilizaron o bien Bu oral o formulación DMA-Bu (Slattery y col., 1997; Dix y col., 1996; Hassan y col., 2000; Hassan y col., 1989; Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Madden y col., 2007; Andersson y col., 2008).

En realizaciones adicionales, el compuesto de azol se puede usar en las formulaciones y procedimientos novedosos para mejorada solubilidad acuosa y estabilidad, tal como itraconazol (Itra) y posaconazol (Posa). Los agentes de azol antifúngicos itraconazol (Itra) y posaconazol (Posa), que pertenecen a la clase general de agentes frecuentemente referidos como compuestos de tri-azol, han ganado una reputación impresionante para su eficacia frente a tanto levadura como diversos mohos. La introducción de tales azoles en la medicina clínica ha mejorado mucho el control de las infecciones fúngicas sistémicas en tanto individuos inmunocomprometidos infectados con no VIH como con VIH. Estos compuestos son activos frente a una diversidad de infecciones fúngicas tales como aspergilosis, blastomicosis, histoplasmosis y candidiasis, así como infecciones fúngicas localizadas en las uñas de los pies y las manos (onicomicosis), y a infecciones de la piel y tracto reproductivo (principalmente referidas como "infecciones vaginales por levadura"). También se usan para tratar empíricamente o de manera preventiva pacientes inmunocomprometidos con fiebre y bajos recuentos de glóbulos blancos los cuales probablemente desarrollan una infección fúngica después de la radio- o quimioterapia para enfermedad maligna. La dosis recomendada normal varía entre los diferentes miembros de la familia azol en una dosis única o dosis diarias divididas en dos o tres. Las cápsulas deberían tomarse con una comida completa debido a que el alimento que contiene lípido mejora la absorción.

Itra, como ejemplo representativo de agente(s) antifúngicos/(tri)-azoles oralmente administrados, previamente se ha investigado exhaustivamente en humanos y animales domésticos (Baddley y col., 2009; Campo y col., 2010; Chen y col., 2010; Dutkiewicz y Hage, 2010; Evans, 2010; Glockner y Karthaus, 2010; Hicheri y col., 2010; Hsu y col., 2010; Ito y col., 2010; Jang y col., 2010; Kim y col., 2010; Lehrnbecher y col., 2010; Lewis y Kontoyiannis, 2009; Lortholary y col., 2010; Pappas y col., 2010; Person y col., 2010; Singh y col., 2006; Torres y col., 2005; Ullmann y col., 2007; Vehreschild y col., 2010; Walsh y col., 2010; Wingard y col., 2010; Winston y col., 2010; Greer, 2007; Carrillo-Munoz y col., 2005; Dodds-Ashley y Alexander, 2005; Groll y Walsh, 2006; Notheis y col., 2006; Courtney y col., 2003; Zhou y col., 1998; Boothe y col., 1997; Davis y col., 2005; Willems y col., 2001); este(estos) fármaco(s) ha(n) documentado bien las propiedades antiinfecciosas en tanto marcos clínicos como experimentales. Sin embargo, antes de la presente invención, una formulación(formulaciones) parenteral(es) aceptable(s) de Itra solubilizado, Posa y otros miembros de esta familia diversa de compuestos químicos o bien referidos como tri-azoles, o simplemente compuestos de azol, consecuentemente no han estado disponibles, pero la administración parenteral se ha logrado permitiendo el uso de suspensiones microcristalinas de estos azoles. La estabilidad variable y de algún modo poco fiable de tales formulaciones ha dado resultados impredecibles variantes. Por tanto, voriconazol está comercialmente disponible como una formulación, mientras que Itra se retiró voluntariamente del mercado americano por su fabricante, y Posa continúa no disponible a pesar de intentos repetidos de proporcionar una formulación parenteral clínicamente útil.

Formulaciones parenterales verdaderamente solubilizadas de Itra y Posa serían útiles como tratamiento de trastornos infecciosos sistémicos en pacientes inmunocomprometidos los cuales por una multitud de razones son incapaces de tomar oralmente preparaciones, tales como, por ejemplo, las frecuentemente experimentadas después de la quimioterapia convencional (intensa) para leucemia aguda y otras enfermedades malignas, y después de trasplante de células madre (allogénicas), en las que las náuseas, vómitos y diarreas relacionados con el fármaco en la fase temprana postrasplante así como la administración de medicamentos concomitantes pueden perjudicar la biodisponibilidad del fármaco oral aunque después la ocurrencia de enfermedad intestinal de injerto contra el huésped y su terapia puede dar como resultado una situación similar. En tales pacientes la administración de fármaco parental da control completo de administración/farmacocinéticas de fármaco sistémico del agente administrado con una precisión simplemente no alcanzable con una formulación oral (Benet y Sheiner, 1985). Desafortunadamente, Itra es un agente escasamente soluble en agua con excesivamente baja solubilidad en disolventes/fluidos de infusión acuosos fisiológicamente aceptables que serían compatibles con la administración humana. Antes de la invención, la única forma de administración actualmente disponible son las preparaciones orales (cápsulas y una suspensión oral), aunque una suspensión microcristalina previamente disponible para el uso IV fue retirada por su proveedor poco después de la aprobación de FDA debido a su comportamiento farmacéutico impredecible. Para el conocimiento de los inventores una forma verdaderamente solubilizada de Itra nunca ha

estado disponible, sino únicamente una suspensión coloidal o microcristalina en hidroxipropil-betaciclodextrina (Willems y col., 2001).

Como se muestra en los Ejemplos, cuando se inyectaron Itraconazol (Itra) y Posaconazol (Posa) a una dosis de 5 mg/kg de PC en ratones después de disolver y diluir de una manera análoga (datos de estabilidad para la formulación madre y de uso final mostrados en las Fig. 9 y 10, de diez minutos a al menos 2 horas después de la inyección de fármaco las concentraciones de Posa en plasma continuaron en el intervalo de 3 a 5 µg/ml, y también se detectó Itra a más de 0,5 µg/ml durante el mismo intervalo de tiempo). Estos intervalos de concentración son similares a los expuestos cuando se administra una dosis oral equivalente de cada fármaco en una situación clínica (Woestenborghs y col., 1987; Notheis y col., 2006; Courtney y col., 2003; Jang y col., 2010), y estas concentraciones excedieron claramente las concentraciones inhibitoras mínimas de cepas de moho prototipos que son patógenas a humanos inmunocomprometidos.

Se usaron una diversidad de procedimientos biológicos y químicos para demostrar que formulaciones de Bu y azol preferidas son estables a aproximadamente 5 mg/ml durante varias semanas a TA. Como se muestra en los Ejemplos, una de tales formulaciones (Bu/VE-acetona/PEG) es estable para más de 40 o incluso 60 días, y conserva la actividad citotóxica completa cuando se ensaya *in vitro* frente a líneas celulares leucémicas humanas. Se disolvió Bu comercialmente disponible en DMSO y se usó como sistema disolvente de referencia ("D" o "DMSO") para el ensayo de citotoxicidad *in vitro*. La formulación DMA-Bu se incluyó en algunos experimentos como control positivo en paralelo; debido a los efectos citotóxicos sinérgicos añadidos de DMA la última formulación era claramente más tóxica en las líneas celulares humanas ensayadas. El vehículo novedoso Bu/VE-acetona/PEG/dextrosa es en sí mismo virtualmente no tóxico analizado en el ensayo de hemólisis. Por último, se usó una de las formulaciones novedosas para mostrar que las concentraciones de Bu citocidas/concentraciones de azol antifúngicas se mantienen durante varias horas en un modelo murino después de inyección IV de 10 mg/kg de PC y 5 mg/kg de PC, respectivamente.

Aunque una realización preferida de la invención usa acetona y PEG, con D5A como diluyente secundario, se pueden usar otros vehículos disolventes/diluyentes que son no tóxicos y seguros para la administración humana. No se han experimentado efectos adversos clínicos serios a partir del uso de estos diluyentes. Como alternativas a solo acetona, uno podría también usar acetona acidificada para permitir la protonación de grupos reactivos en el principio farmacológicamente activo hidrófobo para aumentar más su solubilidad y formación de complejo con PEG, probablemente debido a la atracción electrostática mejorada entre el soluto y PEG. Alternativamente, es posible usar otros disolventes orgánicos volátiles, tales como cloroformo por sí mismo o cloroformo acidificado. Por ejemplo, la acetona comprende entre 1 y 100 % del primer disolvente y PEG es el segundo disolvente madre preferido; como alternativa, la acetona comprende entre 95 y 100 % del primer disolvente y un agente de protonación, tal como un ácido o un alcohol, comprende entre 0 y 5 % del primer disolvente.

Fluidos de infusión útiles incluyen, pero no se limitan a, solución salina normal y dextrosa en agua, o dextrosa en agua mezclada con un agente de protonación tal como un ácido (Martin y Matzke, 1982), o dextrosa en agua mezclada con una pequeña cantidad de un disolvente anfifílico tal como PEG para disminuir más el riesgo de precipitación cuando se añade el diluyente acuoso terminal a la formulación madre del fármaco. Alternativamente, el fluido de infusión puede ser un fluido de infusión emulsión basado en lípido tal como aquellos usados para la nutrición parenteral (Fortner y col., 1975). Antes de la dilución con el fluido de infusión, la composición puede comprender entre 1 y 20 mg/ml de un agente lipófilo tal como Bu y, más preferentemente, comprende entre 1 y 5 mg/ml de un agente lipófilo tal como Bu. Preferentemente, la composición madre no diluida es estable durante más de 30 días a TA. Se estableció el uso clínico de solución salina normal (SSN), dextrosa en agua (5 a 10 %) y emulsiones lipídicas acuosas, medios rutinarios para corregir el equilibrio de fluido y electrolito y suministrar nutrición parenteral. También se usan mucho solución salina normal y dextrosa en agua para diluir diversas medicaciones para su uso IV. La emulsión lipídica acuosa aún no se ha encontrado uso generalizado como diluyente farmacéutico, pero se ha sugerido este uso (Fortner y col., 1975). Igualmente, la administración intravenosa de ácido (clorhídrico) se ha usado para la corrección (rápida) de acidosis metabólica seria, pero no se ha descrito como medio para aumentar la protonación para mantener las fuerzas de atracción electrostática entre un principio farmacéuticamente activo y disolventes hidrófobos/anfifílico dispares antes de la administración en mamíferos (Martin y Matzke, 1982). En una realización particularmente preferida, el diluyente secundario es dextrosa en agua al 5 a 10 % y la composición comprende entre 0,5 y 2,0 mg/ml de Bu después de la dilución en el diluyente secundario. Esta composición diluida es estable durante al menos 12 a 15 horas a TA.

Las soluciones novedosas de la invención no se limitan a Bu, sino también se pueden usar para facilitar la administración parenteral de otros fármacos hidrófobos, y de difícil solubilización, también conocidos como insolubles en agua. Como se indica, tales agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes citotóxicos tales como derivados de epipodofilotoxina, taxanos, Bleomicina, antraciclina, así como compuestos de platino y camptotecina. También incluyen antibióticos, tales como polienos escasamente solubles en agua y azoles (por ejemplo, Anfotericina B y Natamicina, así como los azoles antifúngicos que incluyen, pero no se limitan a, itraconazol y posaconazol) así como agentes antibacterianos, (por ejemplo, polimixina B), agentes antivirales y fármacos tranquilizantes/anestésicos tales como benzodiacepinas, Propofol y agentes antipsicóticos.

Ejemplos adicionales de agentes lipófilos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención incluyen, pero

no se limitan a, compuestos activos lipófilos o una sal, éster, éter u otro derivado de los mismos seleccionados de:

- (i) inhibidores de acetilcolinesterasa seleccionados de donepezilo, tacrina, piridostigmina;
- (ii) analgésicos y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) seleccionados de aloxiprin, auranofin, azapropazona, benorilato, capsaicina, celecoxib, diclofenac, diflunisal, etodolac, fenbufeno, fenoprofeno calcio, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolac, leflunomida, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, rofecoxib, sulindac, tetrahidrocannabinol, tramadol y trometamina,
- (iii) antihelmínticos seleccionados de albendazol, hidroxinaftoato de befenio, cambendazol, diclorofeno, fenbendazol, ivermectina, mebendazol, oxamniquina, oxfendazol, oxantel embonato, praziquantel, pirantel embonato y tiabendazol;
- (iv) agentes antiacné tales como isotretinoína y tretinoína;
- (v) agentes antianginales seleccionados de nitrato de amilo, trinitrato de glicerilo (nitroglicerina), isosorbida dinitrato, isosorbida mononitrato, pentaeritritol tetranitrato y ubidecarenona (coenzima Q10);
- (vi) agentes antiarrítmicos seleccionados de amiodarona HCl, digoxina, disopiramida, flecamida acetato y quinidina sulfato;
- (vii) agentes antiasma seleccionados de zileutón, zafirlukast, terbutalina sulfato, montelukast y albuterol;
- (viii) agentes antibacterianos, que incluyen antibióticos, seleccionados de alatrofloxacina, azitromicina, aztreonam, baclofeno, benzatina penicilina, cefixima, cefuraxima axetil, cinoxacina, ciprofloxacina HCl, claritromicina, clofazimina, cloxacilina, demeclociclina, diritromicina, doxiciclina, eritromicina, etionamida, furazolidona, grepafloxacina, imipenem, levofloxacina, lorefloxacina, moxifloxacina HCl, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, norfloxacina, ofloxacino, fenoximetil penicilina, rifabutina, rifampicina, rifapentina, esparfloxacina, espiramicina, sulfabenzamida, sulfadoxina, sulfamerazina, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfafurazol, sulfametoxazol, sulfapiridina, tetraciclina, trimetoprim, trovafloxacina y vancomicina;
- (ix) agentes antihipertrofia de próstata benigna (HPB) seleccionados de alfuzosina, doxazosina, fenoxibenzamina, prazosina, terazosina y tamulosina;
- (x) agentes anticancerosos e inmunosupresores seleccionados de abarelix, aldesleukina, alemtuzumab, alitretinoína, todo-ácido transretinoico (ATRA), altretamina, amifostina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, trióxido arsénico, asparaginasa, azacitidina, azatioprina, BCG vivo, bevacizumab (avastina), bexaroteno, bicalutamida, bisantreno, bleomicina, bortezomib, busulfán, calusterona, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, darbeopetina alfa, daunorrubicina, denileucina, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina (neutral), doxorubicina HCl, dromostanolona propionato, elipticina, enlimomab, estramustina, epirubicina, epoetina alfa, erlotinib, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastim, floxuridina fludarabina, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab, goserelina acetato, histreline acetato, hidroxiurea, ibritumomab, idarubicina, ifosfamida, imatinib mesilato, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, irinotecán, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida acetato, levamisol, lomustina, megestrol acetato, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, mofetil micofenolato, nandrolona, nelarabina, nilutamida, nofetumomab, oprelvekina, oxaliplatino, paclitaxel, palifermina, pamidronato, pegademasa, peg-asparaginasa, peg-filgrastim, pemetrexed disodio, pentostatina, pipobromán, plicamicina, porfímero sódico, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargramostim, sirolimus, sorafenib, estreptozocina, sunitinib maleato, tacrolimus, tamoxifeno citrato, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, topotecán, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoína, uracil mostaza, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, zoledronato y ácido zoledrónico;
- (xi) anticoagulantes seleccionados del cilostazol, clopidogrel, dicumarol, dipiridamol, nicoumalona, oprelvekina, fenindiona, ticlopidina y tirofiban;
- (xii) antidepresivos seleccionados de amoxapina, bupropión, citalopram, clomiparamina, fluoxetina HCl, maprotilina HCl, mianserina HCl, nortriptilina HCl, paroxetina HCl, sertralina HCl, trazodona HCl, maleato de trimiparmina y venlafaxina HCl;
- (xiii) antidiabéticos seleccionados de acetohexamida, clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida, glibepirida, gliburida, miglitol, pioglitazona, repaglinida, rosiglitazona, tolazamida, tolbutamida y troglitazona;
- (xiv) antiepilépticos seleccionados de beclamida, carbamazepina, clonazepam, totoína, felbamato, fosfeniloína de sodio, lamotrigina, metoína, metsuximida, metilfenobarbitona, oxcarbazepina, parametadiona, fenacemida, fenol barbitona, feniloína, fensuximida, primidona, sultiame, tiagabina HCl, topiramato, ácido valproico y vigabatrina;
- (xv) agentes antifúngicos seleccionados de anfotericina, butenafina HCl, nitrato de butoconazol, clotrimazol,

nitrato de econazol, fluconazol, flucitosina, griseofulvina, Itraconazol, ketoconazol, miconazol, natamicina, nistatina, nitrato de sulconazol, oxiconazol, Posaconazol, terbinafina HCl, terconazol, tioconazol y ácido undecenoico;

(xvi) agentes antigota seleccionados de alopurinol, probenecid y sulfipirazona;

5 (xvii) agentes antihipertensivos seleccionados de amlodipina, benidipina, benezepril, candesartán, captopril, darodipina, dilitazem HCl, diazóxido, doxazosina HCl, enalapril, eposartán, losartán mesilato, felodipina, fenoldopam, fosenopril, guanabenz acetato, irbesartán, isradipina, lisinopril, minoxidil, nicardipina HCl, nifedipina, nimodipina, nisoldipina, fenoxibenzamina HCl, prazosina HCl, quinapril, reserpina, terazosina HCl, telmisartán y valsartán;

10 (xviii) agentes antimalaria seleccionados de amodiaquina, cloroquina, cloroproguanilo HCl, halofantrina HCl, mefloquina HCl, proguanilo HCl, pirimetamina y sulfato de quinina;

(xix) agentes antimigraña seleccionados de dihidroergotamina mesilato, ergotamina tartrato, frovatriptán, metisergida maleato, naratriptán HCl, pizotifeno maleato, rizatriptano benzoato, sumatriptán succinato y zolmitriptán;

15 (xx) agentes antimuscarínicos seleccionados de atropina, benzhexol HCl, biperideno, etopropazina HCl, hisociamina, mepenzolato bromuro, oxifenciclimina HCl y amida trópica;

(xxi) agentes antiparkinson seleccionados de mesilato de bromocriptina, lisurida maleato, pramipexol, ropinirol HCl y tolcapona;

20 (xxii) agentes antiprotoso seleccionados de atovaquona, benznidazol, clioquinol, docoquinato, diiodohidroxiquinolina, diloxamida furoato, dinitolmida, furazolidona, metronidazol, nimorazol, nitrofurazona, ornidazol y tinidazol;

(xxiii) agentes antitiroideos seleccionados de carbimazol y propiltiouracilo;

(xxiv) agente antitusivo tal como benzonatato;

25 (xxv) agentes antivirales seleccionados de abacavir, amprenavir, delavirdina, efavirenz, indinavir, lamivudina, nelfinavir, neviraparina, ritonavir, saquinavir y estavudina;

30 (xxvi) ansiolíticos, sedantes, hipnóticos y neurolépticos seleccionados de alprazolam, amilobarbitona, barbitona, bentazepam, bromazepam, bromperidol, brotizolam, butobarbitona, carbromal, clordiazepóxido, clormetiazol, clorpromazina, clorprotixeno, clonazepam, clobazam, clotiazepam, clozapina, diazepam, droperidol, etinamato, flunarisona, flunitrazepam, triflupromazina, flupentixol decanoato, flufentixol decanoato, flurazepam, gabapentina, haloperidol, lorazepam, lormetazepam, medazepam, meprobamato, mesoridazina, metaqualona, metilfenidato, midazolam, molindona, nitrazepam, olanzapina, oxazepam, pentobarbitona, perfenazina pimozida, proclorperazina, propofol, pseudoefedrina, quetiapina, risperidona, sertindol, sulpirida, temazepam, tioridazina, triazolam, zolpidem y zopiclona;

35 (xxvii) beta bloqueantes seleccionados de acebutolol, alprenolol, atenolol, labetalol, metoprolol, nadolol, oxprenolol, pindolol y propanolol;

(xxviii) agentes inotrópicos cardiacos seleccionados de anrionona, digitoxina, digoxina, enoximona, lanatósido C y medigoxina;

40 (xxix) corticoides seleccionados de beclometasona, betametasona, budesonida, cortisona acetato, desoximetasona, dexametasona, fludrocortisona acetato, flunisolida, fluocortolona, fluticasona propionato, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona;

(xxx) diuréticos seleccionados de acetazolamida, amirolida, bendroflumetiazida, bumetanida, clorotiazida, clortalidona, ácido etacrínico, frusemida, metolazona, espirolactona y triamtereno;

45 (xxxi) agentes gastrointestinales seleccionados de bisacodilo, cimetidina, cisaprida, difenoxilato HCl, domperidona, famotidina, lanosprazol, loperamida, mesalazina, nizatidina, omeprazol, ondansetrón HCl, pantoprazol, rabeprazol sodio, ranitidina HCl y sulfasalazina;

(xxxii) antagonistas del receptor de histamina H1 y H2 seleccionados de acrivastina, astemizol, clorfeniramina, cinnarizina, cetirizina, clemastina fumarato, ciclizina, ciproheptadina HCl, dexclorfeniramina, dimenhidrinato, fexofenadina, flunarizina HCl, loratadina, meclizina HCl, oxatomida y terfenadina;

50 (xxxiii) agentes queratolíticos seleccionados de acitretina, calciprotieno, calcifediol, calcitriol, colecalciferol, ergocalciferol, etretinato, retinoides, targretina y tazaroteno;

(xxxiv) agentes reguladores de lípido/hipolipidémicos seleccionados de atorvastatina, bezafibrato, cerivastatina, ciprofibrato, clofibrato, fenofibrato, fluvastatina, gemfibrozil, hesperetina, lovastatina, pravastatina, probucol y simvastatina;

(xxxv) relajantes musculares seleccionados de ciclobenzaprina, dantroleno sodio y tizanidina HCl;

5 (xxxvi) analgésicos opioides seleccionados de codeína, dextropropoxifeno, diamorfina, dihidrocodeína, fentanilo, meptazinol, metadona, morfina, nalbufina y pentazocina;

(xxxvii) hormonas sexuales seleccionadas de citrato de clomifeno, cortisona acetato, danazol, dehidroepiandrosterona, etinil estradiol, finasterida, fludrocortisona, fluoximesterona, medroxiprogesterona acetato, megestrol acetato, mestranol, metiltestosterona, mifepristona, noretisterona, norgestrel, oestradiol, estrógenos conjugados, progesterona, rimexolona, estanozolol, estilbestrol, testosterona y tibolona;

(xxxviii) estimulantes seleccionados de anfetamina, dexafentamina, dexfenfluramina, fenfluramina y mazindol;

15 (xxxix) agentes nutracéuticos seleccionados de calcitriol, carotenos, crisina, dihidrotaquisterol, flavonoides, hesperitina, jasmonatos, ácido lipoico, luteína, licopeno, ácidos grasos esenciales, ácidos grasos no esenciales, naringenina, fitonadiol, quercetina, vitaminas incluidas la vitamina A, vitamina B2, vitamina D y derivados, vitamina E y vitamina K, coenzima Q10 (ubiquinona), extractos vegetales y minerales.

Los analgésicos se pueden usar en ciertos aspectos de la invención. Un analgésico (también conocido como un calmante) es cualquier miembro del grupo de fármacos usados para mitigar el dolor (conseguir analgesia). La palabra analgésico deriva del griego an- ("sin") y algos ("dolor").

20 Los fármacos analgésicos actúan de diversas maneras sobre el sistema nervioso periférico y central; incluyen paracetamol (para-acetilaminofenol, también conocido en los EE.UU. como acetaminofeno), los fármacos antiinflamatorios no esteroides (FAINE) tales como los salicilatos, y fármacos opioides tales como morfina y opio. Son distintos de anestésicos, los cuales eliminan reversiblemente la sensación.

25 Los fármacos antiinflamatorios no esteroides, normalmente abreviados como FAINE o NAID, pero también referidos como agentes/analgésicos antiinflamatorios no esteroides (AINE) o medicinas antiinflamatorias no esteroides (MAINE), son fármacos con efectos analgésicos y antipiréticos (reductores de fiebre) y los cuales tienen, en dosis mayores, efectos antiinflamatorios. Los FAINE generalmente están indicados para el alivio sintomático de las siguientes afecciones: artritis reumatoide, osteoartritis, artropatías inflamatorias (por ejemplo, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter), gota aguda, dismenorrea (dolor menstrual), dolor de hueso metastásico, dolor de cabeza y migraña, dolor posoperativo, dolor suave a moderado debido a inflamación y lesión

30 de tejido, pirexia (fiebre), íleo, cólico renal o infantes neonatos cuyo conducto arterial no está cerrado dentro de las 24 horas del nacimiento.

El inhibidor selectivo de COX-2 es una forma de fármaco antiinflamatorio no esteroide (FAINE) que guía directamente COX-2, una enzima responsable de la inflamación y el dolor. La selectividad para COX-2 reduce el riesgo de ulceración péptica, y es la característica principal de celecoxib, rofecoxib y otros miembros de esta clase

35 de fármaco. COX-2 selectivamente no parece reducir otros efectos adversos de FAINE (muy en particular un riesgo incrementado de insuficiencia renal), y algunos resultados han mostrado un incremento en el riesgo de ataque cardiaco, trombosis y apoplejía por un incremento relativo en tromboxano. Rofecoxib es un ejemplo.

Flupirtina es un abridor del canal de K<sup>+</sup> que actúa centralmente con propiedades antagonistas de NMDA débiles. Se usa en Europa para dolor moderado a fuerte y las migrañas y sus propiedades relajantes musculares. No tiene propiedades anticolinérgicas y se cree que está desprovisto de cualquier actividad sobre los receptores de dopamina, serotonina o histamina. No es adictivo y no desarrolla tolerancia.

40 En pacientes con dolor crónico o neuropático, diversas otras sustancias pueden tener propiedades analgésicas. Se ha demostrado que antidepresivos tricíclicos, especialmente amitriptilina, mejoran el dolor en lo que parece ser una manera central. Nefopam se usa en Europa para aliviar el dolor con opioides concurrentes. El mecanismo exacto de carbamazepina, gabapentina y pregabalina está igualmente confuso, pero estos anticonvulsivos se usan para tratar dolor neuropático con diferentes grados de éxito. Los anticonvulsivos son lo más frecuentemente usados para dolor neuropático ya que su mecanismo de acción tiende a inhibir la sensación de dolor.

Los antidepresivos se pueden usar en ciertos aspectos de la invención. Los antidepresivos tricíclicos (ATC) son compuestos químicos heterocíclicos usados principalmente como antidepresivos. Los TAC se descubrieron primero

50 a principio de la década de 1950 y posteriormente se introdujeron a últimos de la década. Se llaman por su estructura química, la cual contiene tres anillos de átomos. Los antidepresivos tetracíclicos (TeCA), que contienen cuatro anillos de átomos, son un grupo muy relacionado de compuestos antidepresivos.

Los ATC incluyen siguientes agentes que en su mayoría son inhibidores de recaptación de serotonina y/o norepinefrina: Amitriptilina (Elavil, Triptizol, Laroxil), Amitriptilinoxido (Amioxid, Ambivalon, Equilibrin), Butriptilina (Evadyne), Clomipramina (Anafranil), Demexiptilina (Deparon, Tinoran), Desipramina (Norpramin, Pertofrane),

5 Dibenzepina (Noveril, Victoril), Dimetacrina (Istonil, Istonyl, Miroistonil), Dosulepina/Dotiepina (Prothiaden), Doxepina (Adapin, Sinequan), Imipramina (Tofranil, Janimine, Praminil), Imipraminóxido (Imiprex, Elepsin), Lofepramina (Lomont, Gamanil), Melitraceno (Deanxit, Dixeran, Melixeran, Trausabun), Metapramina (Timaxel), Nitroxazepina (Sintamil), Nortriptilina (Pamelor, Aventil), Noxiptilina (Agedal, Elronon, Nogedal), Pipofezina (Azafen/Azaphen), Propizepina (Depressin, Vagran), Protriptilina (Vivactil), Quinupramina (Kevopril, Kinupril, Adeprim, Quinuprina).

Así como los siguientes compuestos atípicos: Amineptina (Survector, Maneon, Directim) - inhibidor de recaptación de Norepinefrina-dopamina; Iprindol (Prondol, Galatur, Tetran) - antagonista del receptor de 5-HT<sub>2</sub>; Opipramol (Insidon, Pramolan, Ensidon, Oprimol) - antagonista del receptor  $\delta$ ; Tianeptina (Stablon, Coaxil, Tatinol) - potenciador de la recaptación de serotonina selectiva; Trimipramina (Surmontil) - receptor del antagonista de 5-HT<sub>2</sub>.

10 En los últimos tiempos, los ATC se han reemplazado en gran parte en el uso clínico en la mayor parte del mundo por novedosos antidepresivos tales como inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS) e inhibidores de recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN), que generalmente tienen perfiles de efectos secundarios más favorables, aunque todavía a veces se prescriben para ciertas indicaciones.

15 Los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina o inhibidor de recaptación específicos a serotonina (ISRS) son una clase de compuestos generalmente usados como antidepresivos en el tratamiento de depresión, trastornos de ansiedad y algunos trastornos de personalidad. También generalmente son eficaces y se usan en el tratamiento de algunos casos de insomnio. La indicación principal para ISRS es depresión clínica. Los ISRS frecuentemente se prescriben para trastornos de ansiedad, tales como ansiedad social, trastornos de pánico, trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), trastornos alimenticios, dolor crónico y ocasionalmente, para trastorno de estrés postraumático (TEPT). Aunque no específicamente indicado por los fabricantes, a veces están prescritos para tratar el síndrome del intestino irritable (SII), Liquen simplex crónico y eyaculación prematura. Todos los ISRS están aprobados en los EEUU para su uso con trastornos psiquiátricos como se resume en el "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders" (DSM IV).

25 Se cree que los ISRS incrementan el nivel extracelular de la serotonina neurotransmisora mediante la inhibición de su recaptación dentro de la célula presináptica, incrementando el nivel de serotonina en la hendidura sináptica disponible para unirse al receptor posináptico. Tienen grados variantes de selectividad para los otros transportadores de monoamina, con ISRS puros que tienen solamente afinidad débil para el transportador de noradrenalina y dopamina.

30 Los fármacos ISRS incluyen (nombres comerciales en paréntesis): citalopram (Celexa, Cipramil, Cipram, Dalsan, Recital, Emocal, Sepram, Seropram, Citox, Cital); dapoxetina (Priligy); escitalopram (Lexapro, Ciprallex, Seroplex, Esertia); fluoxetina (Prozac, Fontex, Seromex, Seronil, Sarafem, Ladose, Motivest, Flutop, Fluctin (EUR), Fluox (NZ), Depress (UZB), Lovan (AUS); fluvoxamina (Luvox, Fevarin, Faverin, Dumyrox, Favoxil, Movox); indalpina (Upstene) (discontinuo); paroxetina (Paxil, Seroxat, Sereupin, Aropax, Deroxat, Divarius, Rexetin, Xetanor, Paroxat, Loxamine, Deparoc); sertralina (Zoloft, Lustral, Serlain, Asentra); vilazodona (Viibyrd); zimelidina (Zelmid, Normud) (discontinuo).

Inhibidores de recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN) son una clase de fármacos antidepresivos en el tratamiento de depresión grave y otros trastornos de humor. A veces también se usan para tratar trastornos de ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), dolor neuropático crónico, síndrome de fibromialgia (SFM) y para el alivio de síntomas de la menopausia.

40 Los IRSN actúan sobre e incrementan los niveles de dos neurotransmisores en el cerebro que se sabe que juegan una parte importante en el humor, siendo estos serotonina y norepinefrina. Esto se puede contrastar con los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina más ampliamente usados (ISRS) que solamente actúan sobre serotonina.

Ejemplos de IRSN incluyen:

45 Venlafaxina (Effexor) - El primer IRSN y el más frecuentemente usado. Se introdujo por Wyeth en 1994. Los efectos de recaptación de venlafaxina son dosis dependiente. A dosis bajas (<150 mg/día) actúa solamente sobre la transmisión serotoninérgica. A dosis moderadas (>150 mg/día) actúa sobre sistemas serotoninérgicos y noradrenérgicos, mientras que a dosis alta (>300 mg/día) también afecta a la neurotransmisión dopaminérgica.

50 Desvenlafaxina (Pristiq) - El metabolito activo de venlafaxina. Se cree que funciona de una manera similar, aunque alguna evidencia sugiere índices de respuesta inferiores en comparación con venlafaxina y duloxetina. Fue introducida por Wyeth en Wyeth en mayo de 2008.

55 Duloxetina (Cymbalta, Yentreve) - Por Eli Lilly and Company, se ha aprobado para el tratamiento de depresión y dolor neuropático en agosto de 2004. Duloxetina está contraindicada en pacientes con abuso de alcohol o enfermedad de hígado crónica, ya que la duloxetina puede incrementar los niveles de ciertas enzimas del hígado que pueden conducir a hepatitis aguda u otras enfermedades en ciertos pacientes en riesgo. Actualmente, el riesgo de daño de hígado parece solamente ser para pacientes ya en riesgo, a diferencia de la nefazodona antidepresiva que, aunque poco frecuente, puede causar espontáneamente insuficiencia de hígado

en pacientes sanos. Duloxetine también está aprobada para Trastorno Depresivo Mayor (TDM), Trastorno de Ansiedad Generalizada (TAG), dolor musculoesquelético crónico, incluyendo dolor de osteoartritis crónica y dolor crónico lumbar (a partir de octubre, 2010), y es una de las únicas tres medicinas aprobadas por la FDA para Fibromialgia.

5 Milnaciprán (Dalcipran, Ixel, Savella) - Mostrado por ser significativamente eficaz en el tratamiento de depresión y fibromialgia. La "Food and Drug Administration" (FDA) aprobó milnaciprán para tratamiento de fibromialgia en los Estados Unidos de América en junio de 2009, sin embargo, actualmente no está aprobado para la depresión en ese país. Milnaciprán ha estado comercialmente disponible en Europa y Asia durante varios años.

10 Levomilnaciprán (F2695) - El *levo*-isómero de milnaciprán. Bajo desarrollo para el tratamiento de depresión en los Estados Unidos y Canadá.

Sibutramina (Meridia, Reductil) - Un IRSN, que, en lugar de ser desarrollado para el tratamiento de la depresión, se comercializó ampliamente como un supresor del apetito con fines de pérdida de peso.

15 Bicifadina (DOV-220.075) - Por DOV Pharmaceutical, presenta potencialmente la recaptación de serotonina y norepinefrina (y dopamina a menor alcance), pero más que ser desarrollado para el comercio de antidepresivos ya abarrotado, está siendo investigado como un analgésico no FAINE, no opioide.

SEP-227162 - Un IRSN bajo desarrollo por Sepracor para el tratamiento de la depresión.

LY 2216684 - Un IRSN bajo desarrollo por Eli Lilly para el tratamiento de la depresión.

20 Los antipsicóticos se pueden usar en ciertos aspectos de la invención. Un antipsicótico (o *neuroleptico*) es una medicación psiquiátrica tranquilizante usada para manejar la psicosis (incluyendo delirios o alucinaciones, así como pensamiento trastornado), particularmente en esquizofrenia y trastorno bipolar. Una primera generación de antipsicóticos, conocidos como antipsicóticos típicos se descubrió en la década de 1950. La mayoría de los fármacos en la segunda generación, conocidos como antipsicóticos atípicos, se han desarrollado más recientemente, aunque el primer antipsicótico atípico, clozapina, se descubrió en la década de 1950 y clínicamente se introdujo en la década de 1970. Ambas generaciones de medicación tienden a bloquear los receptores en las

25 rutas de la dopamina del cerebro, pero los fármacos antipsicóticos abarcan un amplio intervalo de dianas receptoras.

Condiciones comunes con las cuales los antipsicóticos se podrían usar incluyen esquizofrenia, trastorno bipolar y trastorno de delirios. Los antipsicóticos también se podrían usar para hacer frente a la psicosis asociada con un amplio intervalo de otros diagnósticos, tales como depresión psicótica. Sin embargo, no todos los síntomas requieren de medicación fuerte y las alucinaciones y delirios solamente se deberían tratar si angustian al paciente o producen comportamientos peligrosos.

30

Además, los antipsicóticos se usan cada vez más para tratar trastornos no psicóticos. Por ejemplo, a veces se usan fuera de lo aprobado para manejar aspectos del síndrome de Tourette o trastornos de espectro del autismo. Tienen múltiples usos fuera de lo aprobado como agente de aumento (es decir, además de otra medicación), por ejemplo, en depresión "resistente al tratamiento" o TOC. A pesar del nombre, el uso fuera de lo aprobado de "antipsicóticos" se dice que implica utilizarlos como antidepresivos, fármacos anti-ansiedad, estabilizadores del humor, potenciadores cognitivos, antiagresivos, antiimpulsivos, antisuicidio y medicamentos hipnóticos (dormir).

35

Los antipsicóticos también se han usado cada vez más fuera de lo aprobado en casos de demencia en personas mayores, y para diversos trastornos y dificultades en niños y adolescentes. Un sondeo de niños con trastorno generalizado del desarrollo encontró que el 16,5% estaban tomando un fármaco antipsicótico, lo más frecuentemente para aliviar las alteraciones del humor y comportamiento caracterizadas por irritabilidad, agresión y agitación. Recientemente, se aprobó risperidona por la US FDA para el tratamiento de la irritabilidad en niños y adolescentes con autismo.

40

Los antipsicóticos pueden incluir antipsicóticos de primera generación (antipsicóticos normales), Butirofenonas, Fenotiazinas, Tioxantenos, antipsicóticos de segunda generación (antipsicóticos atípicos), antipsicóticos de tercera generación, Cannabidiol (CBD), etc.

45

Los antipsicóticos a veces se usan como parte del tratamiento obligatorio por compromiso de la persona hospitalizada (hospital) o compromiso del paciente externo. Esto puede implicar diversos procedimientos para persuadir a una persona para tomar la medicación, o fuerza física real. La administración puede depender de una forma inyectable del fármaco más que de comprimidos. La inyección puede ser de un tipo de larga duración conocido como una inyección de liberación retardada (*depot*), normalmente aplicada en la parte superior de las nalgas. Aquellos que están disponibles en la forma inyectable son haloperidol, olanzapina y ziprasidona mientras que aquellos disponibles como de liberación retardada son haloperidol, flupentixol, clopentixol y risperidona.

50

Los antipsicóticos atípicos (AAP) (también conocidos como antipsicóticos de segunda generación) son un grupo de fármacos tranquilizantes antipsicóticos usados para tratar afecciones psiquiátricas. Algunos antipsicóticos atípicos son aprobados por FDA para su uso en el tratamiento de esquizofrenia. Algunos llevan indicaciones aprobadas por

55

FDA para manía aguda, depresión bipolar, agitación psicótica, mantenimiento bipolar y otras indicaciones. Los antipsicóticos atípicos pueden incluir: Amisulprida (Solian), Aripiprazol (Abilify), Asenapina (Saphris), Blonanserina (Lonasen), Clotiapina (Entumine), Clozapina (Clozaril), Iloperidona (Fanapt), Lurasidona (Latuda), Mosapramina (Cremin), Olanzapina (Zyprexa), Paliperidona (Invega), Perospirona (Lullan), Quepin (Specifar), Quetiapina (Seroquel), Remoxiprida (Roxiam), Risperidona (Risperdal), Sertindol (Serdolect), Sulpirida (Sulpirid, Eglonyl), Ziprasidona (Geodon, Zeldox), Zotepina (Nipolept), Bifeprunox (DU-127.090), Pimavanserina (ACP-103), Vabicaserina (SCA-136). Estos antipsicóticos de tercera generación pueden incluir Aripiprazol (Abilify) o agonistas parciales de dopamina.

Los anestésicos se pueden usar en ciertos aspectos de la invención. Un anestésico es un fármaco que causa anestesia - pérdida reversible de sensación. Contrastan con los analgésicos (calmantes), que alivian el dolor sin sensación de eliminación. Estos fármacos generalmente se administran para facilitar la cirugía. Una amplia diversidad de fármacos se usa en la práctica anestésica moderna. Muchos se usan rara vez fuera de la anestesia, aunque otros se usan frecuentemente por todas las disciplinas. Los anestésicos se caracterizan en dos clases: anestésicos generales, que causan una pérdida reversible de consciencia, y anestésicos locales, que causan una pérdida reversible de la sensación para una región limitada del cuerpo mientras se mantiene la conciencia. Combinaciones de anestésicos a veces se usan por sus efectos sinérgicos y terapéuticos aditivos, sin embargo, también se pueden incrementar los efectos adversos.

Los anestésicos locales son agentes que previenen la transmisión de impulsos nerviosos sin causar inconsciencia. Actúan uniéndose a canales de sodio rápidos desde dentro (en un estado abierto). Los anestésicos locales pueden ser o bien éster o basados en amida. Los anestésicos locales éster (por ejemplo, procaína, ametocaína, cocaína) generalmente son inestables en solución y de rápida actuación, y las reacciones alérgicas son comunes. Ejemplos no limitantes de anestésicos locales pueden incluir procaína, ametocaína, cocaína, lidocaína (también conocida como Lignocaína), prilocaína, bupivacaína, levobupivacaína, ropivacaína, mepivacaína y dibucaína. Los anestésicos locales de amida (por ejemplo, lidocaína, prilocaína, bupivacaína, levobupivacaína, ropivacaína, mepivacaína y dibucaína) generalmente son estables al calor, con una larga semivida (alrededor de 2 años). Tienen un inicio más lento y una semivida más larga que los anestésicos éster, y son normalmente mezclas racémicas, con la excepción de levobupivacaína (que es S(-)-bupivacaína) y ropivacaína (S(-)-ropivacaína). Estos agentes generalmente se usan dentro de las técnicas regionales y epidurales o espinales, debido a su mayor duración de acción, que proporcionan adecuada analgesia para la cirugía, parto y alivio sintomático. Solamente agentes anestésicos locales libres de conservantes se pueden inyectar intratecalmente.

Un anestésico general es un fármaco que trae aproximadamente una pérdida reversible de conciencia. Estos fármacos generalmente se administran por un anestesista para inducir o mantener anestesia general para facilitar la cirugía. El(los) mecanismo(s) biológico(s) de la acción de los anestésicos generales no están bien entendidos. Los anestésicos de inyección se usan para la inducción y mantenimiento de un estado de inconsciencia. Los anestesistas prefieren usar inyecciones intravenosas, ya que son más rápidas, generalmente menos dolorosas y más fiables que las inyecciones intramusculares o subcutáneas. Entre los fármacos más ampliamente usados están: Propofol, Etomidato, Barbituratos tales como metohexital y tiopentona/tiopental, derivados de Benzodiacepina tales como midazolam y Ketamina.

Las composiciones de la invención tienen un número de usos. La invención puede incluir un procedimiento para tratar una enfermedad que es sensible o responde a un tratamiento con fármaco lipófilo que comprende: administrar parenteralmente una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de fármaco parenteral como se describió anteriormente a un paciente.

Enfermedades o afecciones que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a, cáncer, leucemia aguda y crónica, linfoma de Hodgkin y de no Hodgkin, un trastorno mieloproliferativo, un trastorno autoinmune y ya que forma la base de la quimioterapia de combinación se pretende que prepare un paciente para el trasplante de células madre hematopoyéticas, enfermedades infecciosas, afecciones o enfermedad psicótica, o una necesidad de control de síntoma. Preferentemente, la composición se puede administrar intravascularmente, pero cuando se determina por circunstancias clínicas específicas también se puede dar intratecalmente, intracavitaria (tal como, por ejemplo, intraperitonealmente, o intrapleuramente) entre otras vías para tratar localmente enfermedad avanzada. Después de mezclar con o suspender en una base de pomada adecuada, la composición también se puede aplicar tópicamente, tal como en el tratamiento de un linfoma de linfocito T periférico o en el caso de usar la composición como un sistema disolvente base para una composición antiinfecciosa adecuada para la administración tópica para conseguir un remedio para una enfermedad infecciosa localizada o inflamatoria. El paciente puede ser cualquier animal. Más preferentemente, el animal es un mamífero, y lo más preferentemente, un ser humano.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en esta solicitud significa que una cantidad suficiente de la composición se añade para conseguir el efecto terapéutico deseado u otro efecto, por ejemplo, para transitoriamente conseguir el control del síntoma, o alterar el nivel de conciencia del paciente. La cantidad real usada variará en base de los factores tales como el tipo de la afección médica, la edad, sexo, salud, especie y peso del paciente, y el tipo de uso y duración de uso, así como otros factores conocidos por los expertos en la técnica.

Otra realización más de la invención está dirigida a un procedimiento para administrar parenteralmente un agente

lipófilo a un paciente que comprende: 1) proporcionar un vehículo disolvente primario en la forma de un disolvente orgánico; 2) mezclar el principio farmacéuticamente activo solubilizado, por ejemplo, Bu, con un agente hidrófobo/anfifílico secundario, tal como PEG; 3) extraer el primer disolvente, preferentemente bajo vacío para crear un microambiente que es conductivo a la unión electrostática del principio farmacéuticamente activo al polímero, PEG, quedándose así el principio farmacéuticamente activo unido a o "disuelto" en PEG después de la finalización de la extracción bajo vacío. Esto puede prevenir la precipitación y, de ese modo, producir una formulación madre; 4) mezclar la formulación madre con un diluyente secundario para formar un fluido de infusión; y 5) administrar el fluido de infusión que contiene el principio farmacéuticamente activo al paciente. Preferentemente, el disolvente orgánico primario es acetona. Sin embargo, además de acetona, se pueden usar muchos otros disolventes orgánicos, tales como cloroformo y dietil éter, para formar el diluyente primario sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

Como ejemplo, las formulaciones basadas en Bu pueden ser útiles en el tratamiento de cánceres y enfermedades autoinmunes en hombres y animales. Ciertos cánceres hematológicos, muy en particular los neoplasmas mieloides, tales como LMC, LMA, SMD, así como los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin, se pueden controlar con terapia basada en Bu durante periodos de tiempo prolongados, especialmente cuando se utiliza en terapia de acondicionamiento pretrasplante. Las formulaciones basadas en Bu no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, miscibles en agua y parenterales eliminan el riesgo de insuficiencia de tratamiento a partir de la absorción intestinal impredecible y errática y eliminación del primer paso de hígado/ metabolismo que para variar los grados caracterizan la administración de la preparación patrón oral, y evita la toxicidad impredecible y errática de DMA usada en la única formulación de Bu IV actualmente disponible. Los beneficios potenciales de la(s) nueva(s) formulación(formulaciones) parenteral(es) no solamente incluye(n) menos efectos secundarios que los experimentados con fármaco oral, puesto que la administración intravascular da control completo de la biodisponibilidad y farmacocinéticas del fármaco, sino que evita la(s) interacción(interacciones) sinérgica(s) adversa(s) impredecible(s) de Bu y DMA. También protege frente a posible(s) interacción(interacciones) adversa(s) impredecible(s) entre otros agentes quimioterapéuticos administrados simultáneamente y DMA en el caso de quimioterapia de combinación. Se debería indicar que DMA, en las concentraciones finales resultantes, contribuyó a la toxicidad sinérgica significativa en al menos cuatro líneas celulares humanas ensayadas, pero esto es posiblemente también el caso para la toxicidad de órgano normal en tanto marcos humanos como animales como se discutió anteriormente.

Formulaciones como ejemplos adicionales de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones fúngicas, de levadura y moho en mamíferos, particularmente infección de *Candida*, *Aspergillus* o Mucorales. Ciertas infecciones, muy en particular aquellas causadas por *Histoplasma spp.* y *Aspergillus spp.* se pueden controlar con éxito por Itra, y Posa además ha sido de particular valor en tratamiento de mucormicosis en pacientes inmunocomprometidos. Las formulaciones novedosas, tales como formulaciones de Itra o Posa no tóxicas, farmacéuticamente aceptables, miscibles en agua e intravasculares, eliminan el riesgo de insuficiencia de tratamiento a partir de la absorción intestinal impredecible y errática y eliminación del primer paso de hígado/ metabolismo que para variar los grados caracterizan la administración de la(s) preparación(es) patrón(patrones) oral(es). Los beneficios potenciales de uso de la formulación/vía de administración intravascular es lo más evidente en pacientes gravemente enfermos con una capacidad afectada para tragar y, por lo tanto, incapaces de beneficiarse de la nutrición oral tal como, por ejemplo, pacientes que padecen de mucositis oral y gastrointestinal después de radio- y/o quimioterapia para la enfermedad neoplásica y aquellos que padecen de enfermedad injerto contra el huésped gastrointestinal después de trasplante de células madre alogénicas en los que existe un problema clínico similar. Los beneficios también se esperan que incluyan menos efectos secundarios clínicos que los experimentados con la correspondiente formulación de fármaco oral, puesto que la administración intravascular da control completo de la biodisponibilidad con farmacocinéticas optimizadas de los fármacos y, por lo tanto, minimiza el riesgo de los efectos secundarios debidos a interacciones fármaco-fármaco indeseadas y fallo de tratamiento secundario a absorción intestinal incompleto así como sobredosis accidental en pacientes que tienen una absorción intestinal inesperadamente alta con un bajo aclaramiento de fármaco metabólico.

Las formulaciones novedosas también se pueden usar para investigar diferentes calendarios de administración (por ejemplo, infusiones IV prolongadas, y dosis IV repetidas) para optimizar el resultado del tratamiento para terapia basada en fármaco lipófilo, tal como terapia basada en Bu, debido ahora a que se obtienen concentraciones de Bu estables superiores (1 a 2 mg/ml) y estabilidad prolongada (con Bu al menos 15 horas a TA en la formulación de uso final, a 1 mg/ml). Además, la invención lo hace posible para investigar los beneficios de diferentes calendarios de dosis de los agentes lipófilos, tales como fármacos de Busulfán o azol frente a diversas enfermedades sistémicas, sin los efectos adversos de confusión a partir de la absorción de fármaco intestinal impredecible y efectos de primer paso hepático que de una manera arbitraria influye al metabolismo de los fármacos administrados oralmente.

La disponibilidad de una nueva preparación parental, especialmente una que está libre de DMA, es de particular interés cuando se contemplan los calendarios intensivos de dosis y, en particular, en la población de paciente pediátrico, en la que los efectos secundarios tales como los ilustrados por el crecimiento afectado y el retado de tanto el desarrollo físico como intelectual pueden ser más fuertes. En esta situación específica una carencia de toxicidad relacionada con el sistema de disolvente unida junto con la biodisponibilidad absoluta de Bu y farmacocinéticas precisas son de suma importancia para asegurar la óptima seguridad del paciente a través del control del perfil de efecto adverso clínico del fármaco, incluso maximizando el cambio de control de enfermedad a largo plazo.

- Para enfermedad infecciosa, las novedosas formulaciones y procedimientos pueden obviar la necesidad de enfrentarse a la absorción intestinal altamente variable que se ha informado entre los pacientes con diferentes enfermedades subyacentes así como diferentes categorías de edad (Willems y col., 2001), y si el paciente está alimentado o en ayuno (Dodds-Ashley, 2010; Willems y col., 2001; Van de Velde y col., 1996), y las novedosas formulaciones y procedimientos también alivian la necesidad de preocuparse por la absorción de fármaco intestinal “saturable” que se ha descrito después de la administración de Posa (Courtney y col., 2003). La disponibilidad de una novedosa preparación parenteral también puede ser importante cuando más calendarios intensivos de dosis son contemplados para controlar enfermedades o infecciones aplastantes en pacientes gravemente inmunocomprometidos, tales como Aspergilosis sinopulmonar y Mucormicosis justo después del trasplante de células madre hematopoyéticas. Particularmente, la biodisponibilidad absoluta de fármaco y las farmacocinéticas predecibles son de suma importancia para asegurar la seguridad del paciente a través del control de los efectos secundarios clínicos de un fármaco, mientras que se maximiza el cambio para control rápido de una complicación infecciosa rápidamente progresiva, claramente potencialmente mortal en una situación médica muy compleja, en la que es crucial establecer rápidamente control de la infección.
- Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Se debería apreciar por los expertos en la técnica que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan las técnicas descubiertas de por los inventores para funcionar bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, en vista de la presente descripción, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y todavía se obtiene un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

### **Ejemplos**

#### **Ejemplo 1 - Formulaciones parenterales de Busulfán y Azol**

- Este ejemplo demuestra el diseño con éxito de formulaciones estables de Busulfán (Bu), usando vehículos disolventes que son no tóxicos y adecuados para la administración parenteral. Se calculó la solubilidad/estabilidad necesaria, y las preparaciones se evaluaron con técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se definió la solubilidad y la estabilidad deseada de Bu en diversos disolventes relevantes para la administración parenteral (representada por intravascular o intratecal o intracavitaria) en humanos y animales domésticos, y se determinó la solubilidad de Bu en vehículos fisiológicamente aceptables.

- Preparación de vehículo disolvente prototipo y solución madre primaria

- Se preparó una acetona evaporada bajo vacío o extraída bajo vacío con Bu preferida (VE-acetona)/PEG/Bu (“solución madre primaria”) referida en estos Ejemplos como sigue: se solubilizó 10 mg/ml de Bu en acetona, se mezcló con PEG400 (1:2, v/v), a continuación, se sometió a extracción a TA bajo vacío durante al menos 5 horas. La estabilidad de Bu en VE-acetona/PEG a TA se representa en una gráfica en la Fig. 1a. La estabilidad de Bu en VE-acetona/PEG y diluida en D5A a 0,5 mg/ml y 1 mg/ml se representa en la Fig. 1b.

#### **Cálculo de solubilidad deseada.**

- Se calculó un intervalo de solubilidad relevante para Bu mediante la extrapolación a partir de dosis conocidas por tener eficacia antitumoral significativa en hombres. Tales estudios clínicos se han conducido usando Bu oral, así como la DMA-Bu IV, la única formulación de Bu parenteral aprobada por FDA. Los regímenes de Bu utilizados generalmente prescriben una dosis en el intervalo de 2 a 10 mg oralmente una vez al día hasta que se obtiene efecto antitumoral clínico, o dosis intermitentes de aproximadamente 20 a 10 mg/m<sup>2</sup> de área superficial corporal (ASC) determinada por recuentos de glóbulos blancos, en terapia paliativa para LMC o por administración repetida cada 6 a 24 horas durante 2 a 4 horas cuando se usa en terapia de acondicionamiento pre-TCMH. Se conocen la dosis y el calendario del Bu clínicamente más eficaz/óptimo, pero se ha informado que diferentes planteamientos son exitosos. La toxicidad dosis limitante con tanto los calendarios diarios de baja dosis como el calendario de dosis más intensa intermitente son supresión de médula ósea. La administración de baja dosis diaria durante tiempo prolongado se ha correlacionado con un inicio lento e insidioso de la supresión de la médula ósea que frecuentemente se considera segura y un planteamiento preferido en terapia paliativa.

- Los calendarios intermitentes de alta dosis de tanto Bu oral como IV que se usan ampliamente en terapia de acondicionamiento pretrasplante generalmente se consideran dependiente del soporte de células madre hematopoyéticas, puesto que tales calendarios son mieloablativos. En terapia de acondicionamiento pretrasplante el calendario de Bu oral más frecuentemente usado es de 1 mg/kg dado cada 6 horas para un total de 8 a 16 dosis durante 2 a 4 días. Por tanto, se recomienda la formulación DMA-Bu parenteral para la terapia de acondicionamiento pretrasplante a una dosis de 0,8 mg/kg dada durante 2 horas cada 6 horas durante 16 dosis (Busulfex, 2009). La toxicidad dosis limitante con los regímenes pretrasplante de alta dosis generalmente es mucositis, insuficiencia de hígado y aproximadamente riesgo al 7 a 10 % de convulsiones generalizadas (Santos y col., 1983; Tutschka y col., 1987; Ciurea y col., 2009; Blaise y col., 1992; Devergie y col., 1995; Hartman y col., 1998; Socie y col., 2001; Grochow y col., 1989; Grochow, 1993; Slattery y col., 1997; Dix y col., 1997; Marcus y Goldman, 1984; Santos, 1989;

Vassal y col., 1990; Vassal y col., 1989; Martell y col., 1987; Sureda y col., 1989; Kashyap y col., 2002; Thall y col., 2004; Kim y col., 2005; Lee y col., 2005; Aggarwal y col., 2006; Dean y col., 2010; DeLeve y col., 2002; Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Andersson y col., 2008). Los riesgos conectados con la actividad de convulsión generalizada como efecto secundario de la administración de Bu en alta dosis residen principalmente en trauma (de cabeza) y aspiración bronquial de contenido gástrico durante el episodio de convulsión. Las convulsiones conectadas con la administración de Busulfán se pueden evitar por el uso profiláctico de benzodiazepinas o difenilhidantoína (Grigg y col., 1989; Meloni y col., 1995; Chan y col., 2002; Hassan y col., 1993). El riesgo para las convulsiones también puede estar influenciado por el calendario de administración de Bu. Por tanto, un calendario de infusión prolongada proporciona exposición prolongada de fármaco a célula tumoral, mientras que a la vez se evita repentinas altas concentraciones pico en plasma que pueden estar implicadas en el desencadenamiento de más efectos secundarios neurológicos serios. A partir de estas observaciones los inventores dedujeron que una formulación de uso final estable con una concentración de Bu que permitiría infusión prolongada debería contener idealmente entre 1 y 2 mg/ml para limitar el volumen total administrado durante un corto tiempo en un calendario de administración una vez al día.

Busulfán tiene una corta semivida terminal en sangre, aproximadamente 2 a 4 horas, y una infusión prolongada prolongaría la exposición del fármaco a los tejidos malignos, disminuyendo incluso la concentración de fármaco pico en plasma que puede estar mucho más asociada con efectos secundarios neurológicos serios.

Se descubrió un sistema disolvente que proporciona una formulación de uso que es estable (>95 %) a temperatura ambiente (TA) durante largos periodos de tiempo. La Fig. 1a es un gráfico que muestra la estabilidad de Bu a temperatura ambiente (TA) en la formulación madre de VE-acetona/PEG (es decir, vehículo disolvente prototipo) que contiene Bu a aproximadamente 5 mg/ml. Busulfán disuelto en un vehículo disolvente de VE-acetona/PEG, y diluido más a concentraciones apropiadas con D5A o D10A con PEG al 10 a 20 % o solución salina normal (SSN) a 1 mg/ml es estable a TA durante al menos 15 horas. Los resultados mostrados en la Fig. 1a muestran que la formulación madre es estable sin material insoluble o precipitado formado cuando se mantiene a temperatura ambiente durante al menos hasta 60 días (durante los 60 días de duración de este estudio particular, la formulación continuó completamente estable y libre de precipitado). En la Fig. 1b se muestran estudios que demuestran que cuando la formulación madre se diluye con D5A, se mantiene básicamente el 100 % de la estabilidad durante el periodo de tiempo estudiado (hasta 15 horas a 1 mg/ml, y hasta 25 horas a 0,5 mg/ml). Agentes hidrófobos disueltos en nuestros novedosos vehículos disolventes son adecuados durante el tiempo de infusión prolongado (12± horas), incluso la estabilidad aún deja un margen de tiempo para el manejo conveniente en la farmacia y en la planta médica antes de la administración al paciente. Por ejemplo, si una dosis de tratamiento (Bu) clínico planeada prescribe 1 a 5 mg/kg de peso corporal, será deseable llegar a una concentración de 1 a 2 mg/ml. Una formulación madre de 5 a 10 mg/ml de fármaco (Bu) en VE-acetona/PEG se podría diluir fácilmente y convenientemente en D5A u otro fluido de infusión acuoso para alcanzar la concentración de uso final apropiada en un volumen de administración adecuado. A continuación, el médico podría elegir para infundir el fármaco durante periodos de tiempo o bien cortos o prolongados sin tener que cambiar las bolsas de infundido que podría ser necesario si las formulaciones fueran físicamente inestables o sujetas a rápida degradación química. Por último, el médico sería menos dependiente de si las horas de servicio de farmacia rutinarias permiten un cierto calendario de administración de fármaco.

#### Solubilidad aumentada en disolventes fisiológicamente aceptables

La solubilidad de Bu se determinó en varios vehículos individuales. Brevemente, una cantidad conocida de Bu, formulada como polvos (Sigma, St Louis, MO), se equilibró en el respectivo disolvente a TA durante 1 a 4 horas. Se separó una alícuota, se filtró y se diluyó más en la fase móvil de HPLC (o acetonitrilo) antes de HPLC para determinar la solubilidad a tiempo predeterminado. Puesto que Bu es virtualmente insoluble en, y también se hidroliza rápidamente en (la presencia de) agua, los inventores en su lugar examinaron disolvente(s) orgánico(s) no acuoso(s), y finalmente se seleccionó acetona como primer disolvente preferido. El Bu se disolvió a 10 mg/ml (solubilidad máxima de aproximadamente 16 mg/ml, véase Tabla 1), y esta composición Bu-acetona primaria posteriormente se mezcló con PEG (1:2 v/v). Esta composición secundaria se examinó más en relación con un estimado de cómo llegar a una formulación madre (estable) que sea útil en la situación clínica. Se realizó la suposición de que administración de "alta dosis" intermitente o una infusión prolongada serían los modos de administración preferidos, es decir, eligiendo un calendario de infusión que requiera el vehículo disolvente para disolver establemente una concentración de aproximadamente 5 a 10 mg/ml. Puesto que se reconoció fácilmente que un disolvente orgánico, tal como acetona o cloroformo, podría ser inseguro para administrarse de manera rutinaria sistémicamente en un ser humano o animal doméstico, los inventores investigaron la separación del disolvente orgánico (acetona) por extracción bajo vacío.

Tabla 1. Solubilidad de Busulfán en diversos disolventes a temperatura ambiente

| Disolvente     | Solubilidad (mg/ml) |
|----------------|---------------------|
| Ácido acético  | 3,8                 |
| HCl 6 N        | 0,7                 |
| Etanol         | 0,3                 |
| Propilenglicol | 0,2                 |
| DMA            | 49,2                |

(continuación)

| Disolvente   | Solubilidad (mg/ml)                       |
|--------------|---|
| DMSO         | 77,9                                      |
| Acetona      | 16,4 (en bibliografía aproximadamente 25) |
| PEG (-400)   | 0,2                                       |
| PEG:agua 1:1 | 0,25                                      |
| PEG:agua 1:2 | 0,19                                      |
| Agua         | Insignificante (El índice Merck)          |

Los inventores plantearon la hipótesis de que la extracción asistida por vacío del disolvente orgánico primario a TA podría crear un microambiente que facilitaría una estrecha atracción electrostática entre el fármaco hidrófobo, Bu y el polímero anfífilo PEG, de modo que la precipitación del principio farmacéuticamente activo no se daría durante la separación gradual del disolvente orgánico primario. Los inventores además plantearon la hipótesis de que esta unión electrostática sería lo suficientemente fuerte para permitir la adición de un diluyente acuoso secundario sin precipitación física inminente o degradación química del principio farmacéuticamente activo. Por lo tanto, la formulación de compuesto primaria (Bu en acetona y PEG) se sometió a extracción bajo vacío de la acetona a TA para crear la formulación madre clínica (es decir Bu/VE-acetona/PEG), que sería miscible con el diluyente acuoso secundario, tal como SSN, dextrosa en agua al 5 % o 10 % (D5A y D10A, respectivamente), o emulsión lipídica de soja (Liposyn™ o Intralipid™ Pharmacia, Peapack, NJ). A continuación, se diluyó la formulación madre clínica con el diluyente acuoso secundario para producir una formulación de uso clínico estable. El intervalo deseado de concentraciones de Bu en esta composición de uso final es de 0,5 a 2 mg/ml, o más preferentemente 1 a 2 mg/ml, puesto que Bu se podría, a continuación, infundir parenteralmente sin preocuparse de la sobrecarga de fluido u otros efectos secundarios relacionados con el volumen total infundido.

Finalmente, un vehículo disolvente compuesto de un disolvente orgánico solo (para Bu y Posaconazol) o un disolvente orgánico mezclado con una cantidad pequeña de un ácido o un alcohol, tal como alcohol bencílico, para facilitar la protonación de grupos funcionales en el principio farmacéuticamente activo (por ejemplo, itraconazol o posaconazol), para cambiar la polaridad del fármaco e incrementar temporalmente su solubilidad en el disolvente orgánico volátil y, de ese modo, incrementar la atracción electrostática entre el principio farmacéuticamente activo y el agente polimérico anfífilo secundario, PEG, cuando se añade este. La posterior extracción asistida por vacío del disolvente orgánico primario, por ejemplo, acetona, la cual se puede efectuar a temperatura ambiente, optimizará estéricamente las condiciones para la atracción electrostática y prevenir la precipitación del principio farmacéuticamente activo.

El vehículo disolvente orgánico primario, acetona permitió solubilización de Bu completa a concentraciones de al menos 15 mg/ml, y después la mezcla con PEG y la extracción de la acetona, Bu se une establemente en PEG solo a una concentración de aproximadamente 5 a 10 mg/ml. Posteriormente, los inventores documentaron que Bu continuó estable en solución en la formulación madre Bu/VE-acetona/PEG durante al menos 60 días a TA (Fig. 1). Una vez reconstituido con D5A la formulación de uso clínico final es estable durante al menos 15 horas a una concentración de 0,5 a 2 mg/ml a TA.

#### Análisis HPLC

##### Derivatización de Busulfán

El ensayo de HPLC proporciona un sistema de detección preciso y sensible para baja concentraciones de Bu en solución, tanto mezclas libres de proteínas como fluidos que contienen proteína (es decir, plasma sanguíneo), que utiliza detección de fluorescencia en el espectro del UV. Desafortunadamente, Bu es una molécula pequeña que no contiene un cromóforo. Por lo tanto, se sometió a derivatización con dietilditiocarbamato (DDTC), lo cual posteriormente permite la separación cromatográfica líquida y la detección en el espectro del UV (Bhagwatwar y col., 1996; Andersson y col., 2000; Madden y col., 2007; Chow y col., 1997). El procedimiento de HPLC se llevó a cabo como sigue: se mezcló solución que contenía Bu (500 µl) con una cantidad igual (500 µl) de solución madre de DDTC (1,17 M en agua). La mezcla se sometió a vórtex durante 30 segundos y se dio vueltas durante 5 min en un Rotador de Tubo (Barnstead International, Dubuque, Iowa). El Bu derivatizado se extrajo de la mezcla de reacción con 2 ml de acetato de etilo, seguido de centrifugación a 1.000 x g durante 10 min (Thermo Electron Corporation, Waltham, MA). Se retiró una alícuota de 500 µl de la capa de acetato de etilo y se evaporó hasta sequedad bajo un evaporador en vacío (Scimetrics Inc., Houston, TX). El residuo se reconstituyó mezclando sobre una máquina de vórtex durante 1 min con 250 µl de la fase móvil y se sometió a HPLC.

##### Compuestos químicos

Se obtuvieron Busulfán (Bu), dietilditiocarbamato (DDTC) sódico e Itraconazol de Sigma (St. Louis, MO). El polietilenglicol 400 (PEG 400), acetato de etilo, acetonitrilo y tetrahidrofurano se compraron de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Todos los compuestos químicos eran de grado HPLC a menos que se indique lo contrario. Posaconazol se extrajo y purificó de la formulación de uso clínico comercialmente disponible (Noxafil™ suspensión

para uso oral) en la instalación central de química medicinal del Departamento de Terapéuticos Experimentales en el "University of Texas MD Anderson Cancer Center".

Ensayo de HPLC

Busulfán

5 El sistema de HPLC incluía: una columna analítica (Nova-pak C18 con perlas de 4- $\mu$ m; 150 mm x 3,9 mm; Waters Corporation, Milford, MA), un automuestreador (automuestreador modelo 717 plus de Waters, una bomba (controlador de sistema modelo 600E de Waters) fijada para administrar 1,2 ml/min y un detector de UV (detector de absorbancia ajustable modelo Waters™ 486) fijado en 254 nm. La fase móvil isocrática era una mezcla de acetonitrilo, tetrahidrofurano y agua a una relación de 11:4:5. Un volumen de 30  $\mu$ l se inyectó en HPLC para la  
10 cuantificación de Bu. El ensayo de HPLC era lineal dentro de un intervalo de concentración de Bu de 0,1 a 20  $\mu$ g/ml. El caudal de la fase móvil era de 1,2 ml/min para Bu y 1,0 ml/min para Itra y Posa. El sistema analítico se basó en la extracción previamente establecida y la experiencia de HPLC con Busulfán (Bhagwatwar y col., 1996; Andersson y col., 2002; Madden y col., 2007; Martin y Matzke, 1982; Chow y col., 1997).

15 Ejemplos de cromatogramas de Bu auténticos se muestran en la Fig. 3, que muestra cromatogramas de los estudios de estabilidad.

Las condiciones de HPLC se describen en el Ejemplo 1. En estos paneles el fármaco analizado era del estudio de estabilidad, en el que Bu se disolvió en la formulación de VE-acetona/PEG prototipo y además se diluyó a 0,5 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente, usando D5A como disolvente final. El tiempo de retención de HPLC bajo las anteriores  
20 condiciones utilizando la columna Nova-Pak C18 era aproximadamente de 2,5 a 3 min. El ensayo era lineal desde al menos 0,1  $\mu$ g/ml a más de 20  $\mu$ g/ml en soluciones libres de proteínas, es decir, para el sistema disolvente utilizado en los estudios de viabilidad y estabilidad de la formulación (Fig. 2, Tabla 2). La Fig. 2 es la curva patrón de la concentración de Bu frente al área bajo la curva (ABC) obtenida en el ensayo de HPLC usado en los estudios de estabilidad. El eje x muestra la concentración en  $\mu$ g/ml, y el eje y muestra la ABC. Se prepararon curvas patrón análogas para los estudios farmacológicos en ratones cuando era apropiado.

25 Tabla 2. Curva patrón de Busulfán - HPLC

| Concentración    | TA    | ABC     | Promedio |
|------------------|-------|---------|----------|
| 20 $\mu$ g/ml    | 2,623 | 2086599 | 2047685  |
|                  | 2,621 | 2132448 |          |
|                  | 2,623 | 1924008 |          |
| 10 $\mu$ g/ml    | 2,623 | 1058978 | 1040774  |
|                  | 2,625 | 1089246 |          |
|                  | 2,625 | 974099  |          |
| 5 $\mu$ g/ml     | 2,621 | 521298  | 543635   |
|                  | 2,619 | 558881  |          |
|                  | 2,619 | 550726  |          |
| 2,5 $\mu$ g/ml   | 2,613 | 272710  | 283674   |
|                  | 2,584 | 303896  |          |
|                  | 2,584 | 274417  |          |
| 1,25 $\mu$ g/ml  | 2,584 | 157211  | 162242   |
|                  | 2,588 | 168973  |          |
|                  | 2,591 | 160542  |          |
| 0,625 $\mu$ g/ml | 92934 | 92649   | 92649    |
|                  | 92690 |         |          |
|                  | 92323 |         |          |

Este ensayo de HPLC produjo consecuentemente alta recuperación y precisión y un límite de sensibilidad inicialmente inferior de aproximadamente 1  $\mu$ g/ml, pero afinando la técnica así como incrementando el volumen inyectado en la HPLC más allá de los 30  $\mu$ l inicialmente usados, el límite de sensibilidad inferior se podría mejorar  
30 reproduciblemente a un límite cuantitativo inferior consistente de aproximadamente 25 ng/ml, y un límite más bajo de detección absoluta de aproximadamente 5 a 10 ng/ml (Bhagwatwar y col., 1966; Chow y col., 1997; Andersson y col., 2000; Madden y col., 2007). Esta técnica de HPLC se estandarizó y se usó para todos los estudios de estabilidad sin ninguna modificación adicional. Para el estudio de la farmacología de plasma, la aparición de picos derivados de proteína en plasma endógena en el cromatograma necesitó la adición de una etapa de  
35 extracción/purificación; esto se efectuó por la precipitación de las proteínas añadiendo dos volúmenes de acetonitrilo seguido de centrifugación y análisis como se describe.

Ensayo de HPLC

Compuestos de azol

El sistema de HPLC se modificó a partir de Woestenborghs y col. (1987), y además se modificó para Posa (Notheis y col., 2006; Courtney y col., 2003; Jang y col., 2010). Se usó la misma configuración del equipo básico anteriormente descrito para analizar Busulfán; así, la bomba se fijó a un caudal de 1,0 ml/min. La detección del respectivo azol se fijó a 261 nm para tanto Itra como Posa. La fase móvil isocrática era una mezcla de acetonitrilo al 60 % en H<sub>2</sub>O más dietilamina al 0,05 %. Se inyectó un volumen estandarizado de 10 µl en la columna de HPLC para la cuantificación de los respectivos azoles. Brevemente, esto resume los parámetros usados para el análisis por HPLC.

El tiempo de retención para Itra era de 4,7 a 5,5 min y 2,5 a 3,0 min para Posa. Como es de esperar varió algo respecto a lo cual se ensayó el compuesto de azol particular. El ensayo de HPLC proporciona un sistema de detección preciso y sensible para concentraciones bajas de Itra (compuestos de azol) en solución, tanto mezclas libres de proteína como fluidos que contienen proteína (tales como muestras clínicamente obtenidas, por ejemplo, plasma sanguíneo), utilizando detección de fluorescencia en el espectro del UV. Para la detección se eligió una longitud de onda de 261, basándose en la absorción inherente y la máxima emisión de las moléculas de azol. Esto se varió con respecto a lo cual se examinó el análogo de azol particular, ambos de los dos agentes prototipo usados en el presente documento, Itra y Posa se pueden detectar fiablemente a 261 nm.

Todos los compuestos químicos eran grado HPLC a menos que se indique lo contrario. Nuestro sistema analítico se basó en la metodología de HPLC previamente establecida para Itra (Woestenborghs y col., 1987).

Para evitar la interferencia analítica de proteínas en plasma endógenas en el cromatograma cuando se ensaya Itra y Posa en muestras de plasma, se realizó una etapa de extracción/purificación que utiliza precipitación de material proteico con acetonitrilo. Brevemente, las proteínas del plasma se precipitaron añadiendo acetonitrilo a una relación en volumen final de plasma:acetonitrilo de 1:2. La mezcla se sometió a vórtex durante 30 segundos y se centrifugó durante 5 min a 14.000 rpm en una microcentrifuga Eppendorf. El sobrenadante desproteinado, que contiene Itra, se inyectó en la HPLC para determinar la concentración del fármaco.

Ejemplos de cromatogramas de Itra auténticos del ensayo de HPLC se muestran en las Figs. 12 y 13. La Fig. 12 representa los cromatogramas obtenidos del ensayo de HPLC en los estudios de estabilidad (libre de proteínas). El volumen de muestra inyectado era de 10 µl. Las condiciones de HPLC eran como se describieron anteriormente. En estos paneles el fármaco analizado era del estudio de estabilidad, en el que Itra se disolvió en los vehículos disolventes prototipos (a), y además se diluyó usando D5A como diluyente final (b). El tiempo de retención de HPLC bajo las condiciones anteriores utilizando la columna C18 Nova-Pak era de 4,7 a 5,5 min. El ensayo era lineal desde 0,1 µg/ml a 100 µg/ml en soluciones libres de proteína, es decir, los diversos sistemas disolventes utilizados en los estudios de fiabilidad y estabilidad de la formulación.

La Fig. 14 representa cromatogramas del ensayo en plasma de Itra y Posa en el estudio de farmacología. Los datos están a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Aclaramiento de a) Itraconazol y b) Posaconazol después de la inyección de 5 mg/kg IV en ratones Swiss Webster

| a) Itraconazol |       |       |      |  |  |  |  |
|----------------|-------|-------|------|--|--|--|--|
| Tiempo, min    | µg/ml | media | SD   |  |  |  |  |
| 10             | 3,59  | 3,23  | 0,76 |  |  |  |  |
|                | 2,13  |       |      |  |  |  |  |
|                | 3,34  |       |      |  |  |  |  |
|                | 3,86  |       |      |  |  |  |  |
| 30             | 1,31  | 1,62  | 0,44 |  |  |  |  |
|                | 1,93  |       |      |  |  |  |  |
| 60             | 0,77  | 0,77  |      |  |  |  |  |
| 120            | 0,64  | 0,71  | 0,09 |  |  |  |  |
|                | 0,77  |       |      |  |  |  |  |
| b) Posaconazol |       |       |      |  |  |  |  |
| Tiempo, horas  | ug/ml | media | SD   |  |  |  |  |
| 0,2            | 3,43  | 3,68  | 1,34 |  |  |  |  |
|                | 1,88  |       |      |  |  |  |  |
|                | 4,59  |       |      |  |  |  |  |
|                | 4,82  |       |      |  |  |  |  |
| 2,0            | 4,99  | 4,77  | 0,38 |  |  |  |  |
|                | 4,85  |       |      |  |  |  |  |
|                | 5,03  |       |      |  |  |  |  |
| 7,0            | 4,21  | 3,23  | 0,88 |  |  |  |  |
|                | 2,61  |       |      |  |  |  |  |
|                | 3,86  |       |      |  |  |  |  |
| 24             | 0,03  | 0,35  | 0,28 |  |  |  |  |

(continuación)

|    |      |      |      |  |  |  |  |
|----|------|------|------|--|--|--|--|
|    | 0,56 |      |      |  |  |  |  |
|    | 0,47 |      |      |  |  |  |  |
| 30 | 0,14 | 0,16 | 0,13 |  |  |  |  |
|    | 0,29 |      |      |  |  |  |  |
|    | 0,04 |      |      |  |  |  |  |

Este ensayo de HPLC produjo consecuentemente alta recuperación y precisión y un límite de sensibilidad inferior de aproximadamente 10 a 20 ng/ml, suficiente para los experimentos planeados. La técnica de HPLC se estandarizó y se usó para todos los estudios de estabilidad sin modificaciones adicionales, excepto cuando se necesita para ensayar los diferentes análogos de azol.

Formulaciones parenterales de azoles - Los antibióticos de azol Itra y Posa también se formularon para la infusión parenteral con VE-acetona/PEG/D5A, y la estabilidad en VE-acetona/PEG a 4 mg/ml se representa en la Fig. 9. Cuando posteriormente se diluyó en D5A a una concentración final de 2 mg/ml se mantuvieron estables durante al menos 15 horas a TA (Fig. 10). Estas novedosas formulaciones de azol retuvieron la actividad antifúngica completa frente a cepas seleccionadas de *Aspergillus* y *Mucor ssp.* (Fig. 11 y Tabla 4).

Tabla 4. Dos patógenos de moho comunes bajo condiciones estándar de lectura a 48 horas

| <i>Aspergillus</i> - ATCC 90906 |                  | Cepa de laboratorio de <i>Rhizopus mucoral</i> |            |
|---------------------------------|------------------|--|------------|
| Fármaco                         | MIC <sup>1</sup> | Fármaco  | MIC        |
| Itra/S <sup>2</sup>             | 0,12 ug/ml       | Itra/S   | 0,3 ug/ml  |
| Itra/D <sup>3</sup>             | 0,12 ug/ml       | Itra/D   | 0,6 ug/ml  |
| Posa/S <sup>4</sup>             | 0,03 ug/ml       | Posa/S   | 0,06 ug/ml |
| Posa/D <sup>5</sup>             | 0,03 ug/ml       | Posa/D   | 0,12 ug/ml |

<sup>1</sup>CIM= concentración inhibidora mínima, <sup>2</sup>Itra/S = itraconazol en sistema disolvente S,

<sup>3</sup>Itra/D = itraconazol en control DMSO. <sup>4</sup>Posa/S = posaconazol en sistema disolvente S,

<sup>5</sup>Posa/D = posaconazol en DMSO como disolvente control positivo. Intervalo de concentraciones de fármaco ensayadas 32 ug/ml a 0,03 ug/ml.

Nota: El fármaco se prepara en cada sistema disolvente en la misma concentración inicial, a continuación, diluida con medios 1:50 para producir la concentración en el primer pocillo. Todos los fármacos, a continuación, se diluyen 2 veces en dilución serial en medios a través del pocillo 11. El pocillo doce se deja como control de crecimiento negativo libre de fármaco.

Se ensayaron especies de moho adicionales de manera similar que en la Tabla 4. La cepa de *Aspergillus* ensayada es *Aspergillus fumigatus* nueva [LAB-A del paciente AF 040 511]. El Zigomiceto ensayado es *Rhizomucor sp.* nuevo [Lab-Z está derivado del paciente RM 041511]. El intervalo de concentraciones de fármaco ensayadas era de 150, 25, 12, 6, 3, 1,5, 0,75, 0,38, 0,19, 0,09, 0,04, y 0 (control) µg/ml. El ensayo de susceptibilidad se configuró usando el procedimiento estándar para hongos filamentosos (CLSI, M38A estándar). Se usaron medios YeastOne, Trek Diagnostics y Lote 152274SA- caducidad 08 de 2011. Se realizó un inóculo de *Aspergillus fumigatus* LAB-A transmisión al 82 % en solución salina. Se realizó inóculo de Zigomiceto transmisión al 80 % en solución salina. Itra se suministró a 1,5 mg/ml en vehículo. Posa se suministró a 2,0 mg/ml en vehículo. El Zigomiceto se incubó a 33 °C durante las primeras 24 horas para conseguir el crecimiento establecido. Los resultados de CIM a 48 horas eran: *Aspergillus* LAB-A a 48 horas mostró un CIM de 0,09 µg/ml para Itra en disolvente novedoso; *Aspergillus* LAB-A a 48 horas mostró un CIM de 0,04 µg/ml para Posa en disolvente novedoso; Zigomiceto LAB-Z a 48 horas mostró un CIM de 0,2 µg/ml para Itra en disolvente novedoso; Zigomiceto LAB-Z a 48 horas mostró un CIM de 0,04 µg/ml para Posa en disolvente novedoso. Los resultados mostraron que a 48 horas todos los controles de crecimiento eran positivos e iguales a los esperados. No había pocillos discrepantes entre las 4 réplicas a cada concentración de fármaco.

### Ejemplo 2 - Demostración de solubilidad, estabilidad y otras propiedades *in vitro* de una de las formulaciones novedosas

En este ejemplo, se evaluaron formulaciones de Bu y azol (Posaconazol, Posa) estables que serían adecuadas para la administración humana. Se establecieron la estabilidad química y física de Bu y Posa en (a) vehículo(s) disolvente(s) de compuesto. Además, se estableció la solubilidad de Bu y Posa en estos vehículos disolventes de compuesto, usando SSN o D5A ±20 % PEG como diluyente final. Este ejemplo también investigó las propiedades citotóxicas y antifúngicas *in vitro* de las respectivas formulaciones, incluyendo su actividad citotóxica/antifúngica potencial hemolítica frente a líneas celulares malignas humanas y aislados de moho, para establecer que el sistema disolvente es apropiado para la administración parenteral como terapia para enfermedades malignas o autoinmunes, así como frente a infecciones fúngicas/de moho en humanos y otros mamíferos sin pérdida de las propiedades terapéuticas de la respectiva clase de agentes.

Estudios de solubilidad

Se disolvieron Bu y Posa en diversos disolventes a temperatura ambiente (TA) durante 60 minutos, y se centrifugaron a >14.000 rpm durante 1 min. A continuación, el sobrenadante se analizó usando HPLC para determinar la máxima solubilidad de Bu/Posaconazol. La solubilidad de Bu difirió comercialmente entre los diferentes disolventes primarios (Tabla 1). Se alcanzó una alta solubilidad de equilibrio (más de 15 mg/ml) usando DMA, DMSO y acetona. En DMSO, Bu comenzó rápidamente a degradarse, conforme a nuestra preocupación de que el grupo sulfuro de DMSO estaría reaccionando con Bu tras exposición prolongada. Un disolvente orgánico (por ejemplo, acetona o cloroformo o DMA) se identificó en su lugar como un vehículo disolvente primario preferido. Debido a las preocupaciones de toxicidad sobre el uso de cloroformo y/o DMA como disolvente primario (Dwivedi, 2002; "VICH Steering Committee", 2010; "The Food and Drug Administration", 2010; "The Office of Environmental Health Hazard Assessment", 2010), los inventores continuaron las investigaciones con acetona como el disolvente primario preferido. Busulfán se pudo disolver establemente (durante al menos 7 días a TA) en acetona y DMA, pero una vez disuelto, la mezcla de Bu-acetona no se pudo diluir con un fluido de infusión acuoso para permitir la administración parenteral sin precipitación inmediata. En una segunda etapa los inventores, por lo tanto, utilizaron un planteamiento de cosolventes modificados (Spiegel y Noseworthy, 1963; Yalkowsky y col., 1981).

Los inventores plantearon la hipótesis de que puesto que Bu es muy lipófilo/hidrófobo, la combinación de acetona como disolvente orgánico primario combinado con un vehículo hidrófobo/anfifílico secundario sometería a Bu a atracción electrostática a partir del compuesto vehículo polimérico secundario (por ejemplo, PEG). Los inventores además argumentaron que separando suavemente el disolvente orgánico (volátil) primario los inventores crearían un microambiente que permite estéricamente incrementar gradualmente la atracción/unión electrostática de Bu solubilizado en un complejo con el vehículo-molécula (por ejemplo, PEG) y, además, que este complejo sería lo suficientemente estable para permitir que el complejo de fármaco se diluya en un fluido de infusión acuoso sin degradación química inmediata o precipitación física del principio farmacéuticamente activo (en este ejemplo: Bu o Posa). La separación de acetona se facilitará añadiendo una etapa de extracción bajo vacío que se facilita mediante la alta volatilidad/bajo punto de ebullición de la acetona. Además, los inventores plantearon la hipótesis de que, puesto que PEG es fácilmente soluble en agua, sus propiedades anfifílicas lo volverían una "sustancia vehículo" adecuada. El complejo fármaco/VE-acetona/PEG resultante, entonces, se podría diluir en agua o en un fluido de infusión acuoso tal como D5A o D10A o solución salina normal (SSN) sin precipitación, permitiendo su aplicación en el uso médico por la administración parenteral. El beneficio añadido del planteamiento de VE-acetona sería que los inventores podrían minimizar la exposición última del receptor al(a los) vehículo(s) disolvente(s) orgánico(s) primario(s).

#### Estudios de estabilidad

Inicialmente era importante describir la estabilidad a corto plazo de la mezcla de Bu/acetona/PEG. Esto era necesario para determinar si la etapa de extracción bajo vacío se podría utilizar sin degradación química indebida de Bu. El Bu (5 mg/ml) en acetona/PEG400 (1:2, v/v) se incubó a temperatura ambiente y se cuantificó por HPLC después de 0, 1, 2, 4, 8 y 24 horas. Segundo, los inventores confirmaron que Bu sería estable en el complejo VE-acetona/PEG/Bu. Por lo tanto, para determinar la estabilidad a largo plazo se disolvió Bu en acetona (10 mg/ml), a continuación, se mezcló con PEG 400 (relación 1:2 v/v). La acetona se extrajo de la mezcla bajo vacío a temperatura ambiente (TA). El VE-acetona/PEG400/Bu se almacenó o bien a temperatura ambiente o a 37 °C durante 2 meses en tubos sellados. Por último, Bu (1 mg/ml) en la formulación de uso final de VE-acetona/PEG400/D5A (0:40:60, v/v/v) se incubó a temperatura ambiente y se analizó por HPLC a 0, 1, 2, 4, 8 y 15 horas para determinar la estabilidad a corto plazo. Las muestras por triplicado se analizaron cuantitativamente con HPLC en todos los momentos después de la dilución apropiada de las muestras en los estudios de estabilidad.

PEG-400, PG, SSN, D5A y emulsión lipídica de soja al 20 % (Itralipid™) no produjeron ninguna concentración significativa de fármaco solubilizado (<0,2 mg/ml después de 60 min a TA). Por lo tanto, estos no se consideraron para el estudio adicional como disolventes primarios.

#### Estabilidad de las diversas formulaciones de Bu

La estabilidad física y química de las diversas formulaciones parenterales previstas se estudiaron como sigue, usando la formulación de Bu/VE-acetona/PEG como ejemplo, y usando D5A como el diluyente final prototipo.

Bu se disolvió a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml en acetona solamente o en VE-acetona/PEG (vehículo disolvente madre prototipo) y se incubó a TA (22 °C) y a 37 °C. La concentración de Bu resultante se midió por HPLC en muestras tomadas inmediatamente después de la solubilización, a continuación, cada pocas horas durante 8 horas y, a continuación, a intervalos de tiempo gradualmente crecientes durante hasta 60 días.

En resumen, la estabilidad de Bu en el sistema disolvente prototipo favorecido (Bu/VE-acetona/vehículo PEG) era excelente: a 60 días ≥95 % de Bu estaba aún intacto a TA, ensayado por HPLC. A partir de los datos disponibles se dedujo, que Bu y Posa en el(los) vehículo(s) disolvente(s) final(es) descrito(s) son lo suficientemente estables para uso clínico rutinario.

#### Estudios de Hemólisis *in vitro*

El potencial hemolítico de la formulación de uso final también debería ser mínimo, puesto que la

formulación/infundido de uso terminal contiene Bu y PEG como los únicos solutos significativos a infundir, es decir, esto es básicamente D5A con una cantidad moderada de PEG (40 %, v/v) como su aditivo principal. El procedimiento de Parthasarathy y col. se usó para examinar el potencial hemolítico de unas pocas formulaciones seleccionadas, y los valores de LD<sub>50</sub> de la formulación más óptima se construyó como se describió previamente (Parthasarathy y col., 1994). Brevemente, se mezcló sangre heparinizada con un volumen igual de solución de Alsever (Alsever y Ainslie, 1941). Esta mezcla se lavó dos veces en PBS, y una solución de eritrocito/PBS al 10 % (volumen por volumen, v/v), a continuación, se preparó y se mezcló con cantidades crecientes de PEG (básicamente el vehículo VE-acetona/PEG prototipo) con o sin adición de D5A y con o sin Bu. Las mezclas resultantes se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Al final de la incubación, las células se precipitaron a 10.000 x g en una microcentrífuga Eppendorf, y después de lavar dos veces en SSN, el sedimento se resuspendió y se sometió a lisis usando agua destilada. La liberación de hemoglobina en el sobrenadante (es decir, hemólisis) se determinó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 550 nm. La lisis máxima se midió frente a solución de eritrocito de referencia que se había sometido a lisis por choque hipotónico. El potencial hemolítico del vehículo y la formulación de uso final completa (Bu/VE-acetona/PEG/D5A) se evaluó como se describe (Parthasarathy y col., 1984). Los resultados se trazaron como la fracción de eritrocitos intactos como función de la concentración (porcentaje de volumen total) del vehículo disolvente. El porcentaje de volumen total se definió como el porcentaje en volumen del sistema disolvente en la mezcla después de la adición de la suspensión de eritrocito. Esto se hizo para estimular la dilución de la formulación de fármaco en la corriente sanguínea después de la administración parenteral. Se definieron eritrocitos sanos e intactos como aquellos capaces de conservar su hemoglobina intracelularmente después de la mezcla con el vehículo disolvente con o sin Bu.

La formulación de uso final mostró una capacidad insignificante para inducir la hemólisis cuando se usó el vehículo de uso completo con o sin Bu. La lisis Bu dependiente apenas excedió los niveles basales, también para concentraciones de fármaco de 100 µg/ml o más, que es muchas veces mayor que la concentración más alta esperada en una situación clínica con administración de Bu una vez al día como una infusión de tres horas (concentraciones picos esperadas de menos de 5 µg/ml) (Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Madden y col., 2007). La hemólisis específica a Bu era altamente reproducible entre diferentes ensayos. Los datos derivados de los experimentos repetidos con el vehículo disolvente de uso final completo ±Bu se resumen en la Fig. 4, la cual ilustra gráficamente el (carencia de) potencial hemolítico de la formulación de uso de VE-acetona/PEG/D5A con Bu, y la misma formulación ("disolvente" solo) sin Bu, como se indica en la figura. La curva de disolvente solo también demuestra el potencial hemolítico extremadamente bajo cuando el disolvente se mezcla con los agentes alternativos que incluyen, pero no se limitan a, compuestos de azol. El eje x muestra la concentración en µg/ml. El eje y muestra la hemólisis en porcentaje. Por último, no hubo señal de hemólisis después de la inyección de 10 mg/kg *in vivo*, cuando las muestras de orina se evaluaron hasta 4 horas en paralelo con obtención de muestras de sangre para ensayos de concentración en plasma en los experimentos de ratón.

En conclusión, el fluido de infusión completa Bu/VE-acetona/PEG/D5A tenía muy poco potencial hemolítico y debería ser completamente seguro para la administración parental (intravascular así como intratecal, o intracavitaria) humana.

#### Citotoxicidad de Busulfán *in vitro*.

El potencial citotóxico de los sistemas disolventes preferidos seleccionados con y sin Bu se determinó frente a las líneas celulares de leucemia mieloide humana KBM-3 y KBM-7/B5, así como la OCI-AML3 (Andersson y col., 1993; Andersson y col., 1987; Andersson y col., 1995; Wang y col., 1991). Brevemente, las células continuamente en desarrollo se expusieron a fármaco y, a continuación, se precipitaron, después de lo cual se resuspendieron en medio de cultivo celular completo a  $2 \times 10^5$ /ml y se pusieron en alícuotas (20.000/pocillo) en placas de 96 pocillos, incubadas a 37 °C durante 4 días, y se analizaron por el ensayo con MTT (Mosmann, 1983). Los análisis gráficos que incluyen cálculos de IC<sub>50</sub> y gráficas de supervivencia se hicieron usando Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Las células expuestas en paralelo a sistema disolvente y medio solo sirvieron como controles negativos, y las células expuestas a DMA (concentración final al 0,08 % v/v) sirvieron como control positivo para una comparación de acción citotóxica con la formulación DMA-Bu.

El sistema disolvente examinado VE-acetona/PEG no presentó ninguna toxicidad detectable en las concentraciones alcanzadas en las concentraciones de Bu ensayadas más altas frente a cualquiera de las líneas celulares en estos experimentos (control negativo, datos no mostrados). Cuando la formulación de Bu de uso final se añadió en concentraciones crecientes a las células, era obvia la citotoxicidad dependiente de la concentración (Fig. 5). Busulfán retuvo la actividad citotóxica completa en la formulación de uso cuando se comparó con las células expuestas en paralelo a Bu disuelto en DMSO (control positivo). Interesantemente, en estos experimentos la formulación DMA-Bu ejerció actividad citotóxica significativamente superior (Fig. 6); esta actividad era mayor de la que se podría considerar por citotoxicidad aditiva e indica fuerte sinergia entre Bu y DMA en todas las líneas celulares examinadas (Chou y Talalay, 1984). Esta observación desencadenó nuestro posterior examen de si el DMA por sí mismo ejerció actividad citotóxica significativa y medible. El DMA-disolvente era altamente tóxico frente a ambas líneas celulares de LMA KBM-3 y OCI-AML3, y también tenía actividad citotóxica significativa frente a la línea de LMC KBM-7 y su sublínea resistente a Bu B5/Bu250-6, FIG. 5 (c). Es concebible, que tal toxicidad relacionada con DMA (impredecible) podía contribuir de una manera significativa al riesgo clínico de recibir la formulación DMA-Bu, puesto que los efectos de órgano normal de DMA son probablemente paralelos a lo que se ve en las líneas

5 celulares. Esta suposición además se soporta por tanto la bibliografía de peligros ocupacionales como por los datos de toxicidad disponibles a partir de la evaluación de DMA como compuesto anticanceroso (Choi y col., 2001; Weiss y col., 1962a; Weiss y col., 1962b), así como por la investigación de la toxicidad fetal relacionada con DMA en roedores y lagomorfos (Malley y col., 1995; Kennedy, 1986; Klimisch y Hellwig, 2000; Okuda y col., 2006; Valentine y col., 1997; Kennedy, 2001). Por último, una investigación previa de DMA-Bu *in vitro* indicaron citotoxicidad sinérgica entre DMA y Bu en células de leucemia humanas (Sadeghi y col., 1999).

Actividad antifúngica *in vitro* de Itraconazol y Posaconazol.

10 El potencial antimicrobiano/antifúngico de sistemas disolventes seleccionados con y sin Itra se determinó frente a diversos aislados de tanto levadura como diferentes especies de moho. Los resultados confirman que el Itra y Posa conservan actividad antifúngica (Tabla 4). Los sistemas disolventes variantes son en sí mismo sin ningún efecto sobre la proliferación de moho y levadura (Fig. 11).

Levaduras

Intervalo de dilución de fármaco ensayado 38 µg/ml a 0,03 µg/ml

| <i>Candida cruzei</i> (cepa ATCC 6258) |      | <i>Candida parapsilosis</i> |      |
|--|------|-----------------------------|------|
| Fármaco                                | MIC  | Fármaco                     | MIC  |
| Itra-s                                 | 0,07 | Itra-s                      | 0,03 |
| Itra*                                  | 0,15 | Itra*                       | 0,07 |

Itra\* es un lote control de Itra disuelto en DMSO como control positivo.

Itra-s es el Itra disuelto en el nuevo sistema de formulación.

15 Controles de crecimiento (controles negativos, hongos crecidos en solamente medio) mostraron excelente crecimiento. El crecimiento de *Candida* en medio con vehículo disolvente sin fármaco también mostró excelente crecimiento.

B. Mohos

Dos mohos hialinos se ensayaron con una lectura estándar a 48 horas:

Intervalo de fármaco ensayado: 75 µg/ml a 0,07 µg/ml

| <i>Aspergillus fumigatus</i> (cepa ATCC 90906) |     | <i>Aspergillus fumigatus</i> (aislado de laboratorio clínico) |     |
|--|-----|---|-----|
| Fármaco  | MIC | Fármaco   | MIC |
| Itra   | 1,2 | Itra  | 0,6 |
| Itra*  | 0,6 | Itra*   | 0,3 |

20

Para la descripción de Itra-s e Itra\*, véase lo anterior.

Ensayo de moho extendido

25 Para determinar más la actividad antifúngica de los compuestos en los nuevos sistemas de formulación los inventores investigaron la eficacia de los diversos agentes frente a cepas adicionales de mucor y *Aspergillus* (El *Rhizomucor* era un aislado clínico a partir de un aislado de paciente) y el *Aspergillus fumigatus* (cepa ATCC 90906) usado era como se describió previamente. De nuevo, los ensayos de susceptibilidad se configuraron usando el procedimiento de ensayo estandarizado (CLSI M38A). Los fármacos usados se proporcionaron en la formulación de uso final descrita VE-acetona/PEG/D5A. Todos los fármacos se diluyeron en medio RPMI-Mops: YeastOne, Sensititer (Lote 151416SA, fecha de caducidad en 2011).

30 Como antes, se ensayaron dos mohos diferentes con una lectura estándar a 48 horas:

*Aspergillus fumigatus* (cepa ATCC 90906) Zigomiceto (aislado de laboratorio clínico, MDACC)

Intervalo de dilución de fármaco 75 µg/ml a 0,07 µg/ml.

| Fármaco | MIC | Fármaco | MIC |
|---------|-----|---------|-----|
| Itra    | 1,2 | Itra    | 2,5 |
| Itra*   | 0,3 | Itra*   | 2,5 |

35 Todos los controles de crecimiento de moho, incluyendo los controles con vehículo(s) disolvente(s) sin fármaco de azol añadido, crecieron sin inhibición como se describió anteriormente.

Para la descripción de Itra\*, véase lo anterior.

Brevemente, los ensayos de susceptibilidad se configuraron usando una metodología estandarizada (CLSI M38A). Los fármacos se diluyeron en medio RPMI-Mops (caldo YeastOne (Sensititer, producto Y3462, Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH) Sensititer Lote número 151416SA - fecha de caducidad 2011). Se ensayaron dos cepas diferentes de levadura, la evaluación/lectura estandarizada se realizó 24 horas después del inicio de cada cultivo.

5 Los ensayos se repitieron dos veces y todos los valores CIM (concentración inhibidora mínima) se determinaron como promedio de los dos experimentos.

### Ejemplo 3 - Análisis de Busulfán cuantitativo en plasma y farmacología de Bu IV.

Este ejemplo demuestra que antibióticos antifúngicos de Bu y azol en (a) vehículo(s) disolvente(s) preferido(s) y mezclado(s) con plasma sanguíneo se puede recuperar como fármaco nativo/intacto usando tecnología de extracción cuantitativa y ensayo de HPLC, y que los fármacos continúan estables en un intervalo de concentración citotóxica/fungistática durante varias horas después de la administración. Además, muestra que las farmacocinéticas de plasma preliminares después de la administración parenteral de una formulación de Bu preferida en ratones se adaptan a las que se pueden esperar, basándose en la farmacología publicada de Bu oral y IV (Slattery y col., 1997; Dix y col., 1996; Hassan y col., 2000; Hassan y col., 1989; Bhagwatwar y col., 1996; Andersson y col., 2000; Andersson y col., 2002; Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Madden y col., 2007; Busulfex, 2009).

#### Extracción cuantitativa de Busulfán en plasma

Un ml de plasma humano se mezcló con diversas cantidades del Bu reformulado (<3 % del volumen final) para producir un intervalo de concentración de fármaco desde 1 a 10 µg/ml (la formulación de uso Bu/VE-acetona/PEG/D5A se realizó del vehículo disolvente prototipo y D5A, teniendo una concentración de Bu de 1,0 mg/ml). A continuación, el fármaco se extrajo de las muestras de plasma y se analizó por HPLC como se describe en el Ejemplo 1. Brevemente, se mezcló 1 volumen de plasma sanguíneo con 1 volumen de acetonitrilo y después de mezclar en vórtex las muestras se centrifugaron para precipitar las proteínas de plasma que de otra manera producirían picos interferentes en los cromatogramas. A continuación, se derivatizó el sobrenadante con DDTC y se sometió a extracción con acetato de etilo. Después de la reconstitución por evaporación el Bu se ensayó por HPLC usando detección de fluorescencia a 254 nm como se describió anteriormente. El tiempo de retención de Bu en este sistema era de 2,5 a 3,0 min cuando se usaba la columna Nova-Pak (véase el Ejemplo 1). La recuperación de Bu del plasma enriquecido a 10 µg/ml se calculó para ser aproximadamente 90 a 100 % (datos de archivo). El ensayo era lineal en el intervalo desde aproximadamente 25 ng/ml a al menos 20 µg/ml, con un límite de detección de aproximadamente 5 a 10 ng/ml cuando 100 µl se inyectaron en el cromatograma. Se preparó de manera rutinaria una curva patrón en el intervalo desde 0,10 µg/ml a 10 µg/ml para el experimento de farmacología (no mostrado), y se obtuvo una buena correlación lineal ( $r = ,99$ ) entre las concentraciones de Bu en plasma reales y los valores de ABC medidos.

#### Busulfán parenteral: Protocolo experimental en ratones

Se usaron ratones Swiss Webster con un peso corporal de 25 a 30 g para los experimentos de farmacología *in vivo* (Harlan-Sprague-Dawley, Houston, TX). Los animales se dejaron un mínimo de 3 a 4 días después de la llegada para aclimatarse al nuevo ambiente y se dejó libre acceso a comida comercial y agua purificada por osmosis inversa hiperclorada antes y durante el período de experimentación. Las instalaciones de alojamiento animal cumplían los requerimientos del USDA, NIH y DHHS.

40 Busulfán a una dosis de 10 mg/kg de PC se usó como dosis única apropiada y representativa que se podía administrar como una inyección bolo IV lenta durante 3 a 4 min.

El Bu se formuló en el vehículo VE-acetona/PEG prototipo a una concentración madre de aproximadamente 10 mg/ml y, a continuación, diluido con D5A a 1 mg/ml y 2 mg/ml (en experimentos repetidos) así la dosis total de 10 mg/kg se podía inyectar en un volumen de aproximadamente 250 µl y 125 µl, respectivamente, en una vena del rabo. Las concentraciones de Bu de la formulación de uso final se confirmaron por HPLC antes de la administración.

45 Se usó premedicación no anticonvulsiva en los animales en estos experimentos para evitar la posible inducción de enzimas de hígado microsómicas que podrían modificar el metabolismo de Bu. Por la misma razón los animales no estaban anestesiados durante la inyección del fármaco, solamente impedidos físicamente.

50 Se procuraron muestras sanguíneas (0,5 a 1,0 ml) por punción cardíaca bajo anestesia general inducida por isoflurano. Estas muestras se sacaron en tubos preheparinizados en momentos seleccionados antes de la infusión del fármaco ("blanco"), y desde 5 min a 4 horas después de la inyección del fármaco para la determinación de concentraciones de Bu. La sangre se centrifugó a 1.000 x g durante 10 min, y el plasma se separó y almacenó a -80 °C hasta que se extrajo y se ensayó por HPLC.

#### Resultados de Busulfán en plasma y farmacología del fármaco IV

55 Los cromatogramas auténticos de (a), plasma enriquecido con Bu y (b) una muestra de plasma obtenida del estudio de farmacocinética actual se muestra en la Fig. 7. La Fig. 7 muestra una muestra de plasma enriquecido con Bu en la nueva formulación prototipo a 10 µg/ml, y la figura también muestra un cromatograma del estudio de farmacología,

en el que los ratones se inyectaron con Bu a 10 mg/kg. El último cromatograma era de una muestra sacada 20 minutos después de la inyección de fármaco.

Los datos resultantes ilustran que el(los) novedoso(s) vehículo(s) disolvente(s) da(n) concentraciones en plasma de Bu citotóxicas detectables después de la inyección de 10 mg/kg de PC. La Fig. 8 es un gráfico que muestra el cambio en la concentración en plasma con el tiempo después de una inyección de Bu de 10 mg/kg inyectados IV durante aproximadamente 3 a 4 min. El eje x muestra el tiempo después de la inyección en minutos. El eje y muestra la concentración de Bu en µg/ml en plasma, con una semivida de Bu terminal aparente en el intervalo de 2,5 a 3,5 horas. Todas las inyecciones eran bien toleradas, y no se encontraron efectos adversos visibles durante el intenso periodo de observación de 4 horas.

10 En resumen, los datos demuestran que las novedosas formulaciones de Bu estables y farmacéuticamente aceptables en la invención se pueden utilizar de forma segura para la administración parenteral. Un vehículo disolvente preferido es fisiológicamente compatible con la administración intravascular y se usó para demostrar que la inyección de Bu en este vehículo disolvente era bien aceptada y tenía insignificante toxicidad de sistema disolvente intensa en un modelo de ratón. La inyección IV de esta formulación en ratones a 10 mg/kg de PC produjo concentraciones en plasma de Bu que durante varias horas continuaron en el intervalo citotóxico, basado en comparaciones con nuestros experimentos de citotoxicidad *in vitro* y en comparación con datos obtenidos de los varios primeros estudios usando o bien Bu oral (Slattery y col., 1997; Dix y col., 1996; Hassan y col., 2000; Hassan y col., 1989; Vassal, 1994; Hassan y col., 1994), o DMA-Bu (Andersson y col., 2000; Andersson y col., 2002; Russell y col., 2002; De Lima y col., 2004; Madden y col., 2007).

20 Los datos obtenidos con la formulación de uso final de VE-acetona/PEG/D5A concluyentemente prueban que ahora es fiable introducir Bu para la administración parenteral en terapia clínica de enfermedades malignas y autoinmunes sin la toxicidad añadida de DMA usada como componente excipiente del vehículo disolvente. Esto se puede esperar que dé como resultado seguridad muy mejorada del programa de tratamiento citotóxico basado en Bu. Estos resultados ahora finalmente también dan una expectación razonable de insignificante toxicidad de órgano normal a partir del vehículo disolvente. En particular, es posible que la toxicidad seria del sistema nervioso central y hepato-renal que aún se encuentra ocasionalmente con la formulación DMA-Bu actualmente disponible se pueda evitar con esto(s) nuevo(s) vehículo(s) disolvente(s).

30 Los novedosos sistemas disolventes mejorarán significativamente la seguridad clínica de terapia basada en Bu, y lo hace posible para optimizar el uso de este fármaco importante en el tratamiento de cáncer y trastornos autoinmunes. En particular, las realizaciones de la invención se pueden utilizar en acondicionamiento de los pacientes que se someten a quimioterapia de combinación precedente a TCMH.

35 Todas las composiciones y/o los procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento se pueden fabricar y ejecutar sin una experimentación injustificada a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los procedimientos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, resultará evidente para aquellos expertos en la materia que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o los procedimientos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los procedimientos descritos en el presente documento sin alejarse del concepto, espíritu y ámbito de la invención. Más específicamente, resultará evidente que determinados agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados se pueden sustituir por los agentes descritos en el presente documento, aunque se lograrían los mismos resultados o unos similares. Se considera que todos esos sustitutos y modificaciones similares evidentes para aquellos expertos en la materia se encuentran dentro del espíritu, ámbito y concepto de la invención.

#### ABREVIACIONES USADAS EN LA PRESENTE SOLICITUD

AAALAC - "Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International".

ALT - Alanina-Amino-Transferasa.

45 Solución de Alserver - Solución estandarizada de ácido cítrico en cloruro de sodio (Alserver y Ainslie, 1941).

LMA - Leucemia mieloide aguda

AST - Aspartato-Amino-Transferasa

ATCC - "American Tissue Culture Collection", Rockville, MD.

ATG -Globulina Antitimocito

50 ABC - Área bajo la curva, el término usado para indicar el área medida real de un pico en un cromatograma, y también para el área bajo la concentración en plasma frente a curva de tiempo durante varias horas después de la administración de un fármaco a un animal o ser humano.

ASC - Área superficial corporal.

- Bu - 1,4-butanodiol dimetanosulfonato, butano-1,4-diil dimetanosulfonato;  $C_6H_{14}O_6S_2$ , Busulfán.
- PC - Peso corporal.
- Clo - Clofarabina.
- 5 CLSI M38A estándar - "Clinical Laboratory Standards Institute" M38A (ensayo de susceptibilidad estandarizada para mohos filamentosas).
- LMC - Leucemia mielógena crónica.
- Cy - Ciclofosfamida.
- D5A - Dextrosa, 5 % en agua.
- D10A - Dextrosa, 10 % en agua.
- 10 DMA - N,N-dimetilacetamida.
- DMF - Dimetilformamida.
- DMSO - Dimetilsulfóxido.
- DNA - Ácido desoxirribonucleico.
- DHHS - "Department of Health and Human Services".
- 15 EtOH - Etanol.
- SBF - Suero bovino fetal.
- FDA - "United States Food and Drug Administration".
- Flu - Fludarabina.
- GSH - Glutación
- 20 GST - Glutación-S-Transferasa.
- HPLC - Cromatografía líquida de alta resolución.
- TCMH - Trasplante de células madre hematopoyéticas.
- IMDM - Medio de Dulbecco modificado de Iscove (GIBCO, Grand Island, Nueva York, NY).
- 25 Intralipid™ - Marca comercial de una emulsión lipídica acuosa realizada principalmente de aceite de soja y comercializado para la nutrición parenteral disponible de Baxter Healthcare, Inc. USA.
- IV - Intravenosa.
- KBM-3 - línea celular de leucemia mielóide humana denominada KBM-3.
- KBM-3/Bu2506 - sublínea de la línea KBM-3 resistente a Busulfán.
- 30 KBM-7 y KBM-7/B5 - Línea celular mielóide humana denominada KBM-7, y una sublínea clonada de la misma denominada KBM-7/B5.
- LD<sub>50</sub> - La concentración o dosis que da como resultado letalidad o destrucción al 50 % de una población.
- Liposyn™ - Marca comercial de una emulsión lipídica acuosa realizada principalmente de aceite de soja y comercializada para la nutrición parenteral disponible de Abbott (Abbott Park, IL).
- MDACC - "University of Texas MD Anderson Cancer Center", Houston, Texas.
- 35 SMD - Síndrome mielodisplásico.
- MeOH - Metanol.
- CIM - Término que indica la concentración inhibidora mínima de crecimiento bacteriano y fúngico para un antibiótico cuando se ensaya en un sistema estandarizado *in vitro* para la valoración de la sensibilidad a dicho antibiótico.

- MTT - 3, [4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5-difeniltetrazolio-bromuro.
- NCI - "National Cancer Institute".
- NH<sub>4</sub>-acetato - Acetato de amonio.
- NIH - "National Institute of Health".
- 5 SSN- Solución salina normal (NaCl 150 mM).
- OCI-AML3 - Línea celular de leucemia mieloide humana.
- PBS - Solución salina tamponada con fosfato (formulación de Dulbecco, pH 7,4).
- PEG y PEG400 - Polietilenglicol (-400).
- PG - Propilenglicol.
- 10 PTFE - Politetrafluoroetileno (filtros), Teflón™
- TA - Temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C).
- SDS - Dodecilsulfato de sodio.
- ICT - Irradiación de cuerpo total.
- TRM - Mortalidad relacionada con el tratamiento.
- 15 USDA - "US Department of Agriculture".
- UV - Ultravioleta.
- VE-acetona - véase más adelante.
- VE-acetona/PEG -PEG que después de mezclar con acetona posteriormente ha tenido la acetona (volátil) extraída/evaporada bajo vacío, es decir, "Extraída bajo vacío o Evaporada bajo vacío".
- 20 EVO - Enfermedad veno oclusiva.

#### REFERENCIAS

- Documento de Patente 5.430.057
- Documento de Patente 5.559.148
- 25 Aggarwal y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 12:770-777, 2006.
- Alsever y Ainslie, *State Med. J.*, 41:126-135, 1941.
- Andersson y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 14:672-684, 2008.
- Andersson y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 8:145-154, 2002.
- Andersson y col., *Bone Marrow Transplant.*, 6:548-554, 2000.
- Andersson y col., *Cancer Genetics Cytogenet.*, 24:335-343, 1987.
- 30 Andersson y col., *Exp. Hematol.*, 20:361-367, 1992.
- Andersson y col., *Leukemia*, 9:2.100-2.108, 1995.
- Baddley y col., *J. Clin. Microbiol.*, 47(10):3.271-3.275, 2009.
- Bearman, *Blood*, 85:3.005-3.020, 1995.
- Benet y Sheiner, En: "Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", Goodman y col. (Eds.),
- 35 7ª Ed., MacMillan Publishing Co. NY, P. 8, 1985.
- Bhagwatwar y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 37:401-408, 1996.
- Blaise y col., *Blood*, 79:2.578-2.582, 1992.
- Boothe y col., *Am. J. Vet. Res.*, 58(8):872-77, 1997.
- Bredeson y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 14:993-1.003, 2008.
- 40 Busulfex, (Busulfán IV) para inyección, prospecto, Otsuka America Pharmaceuticals, Inc., 2009.
- Campo y col., *J. Infect. Dis.*, 60(5):331-337, 2010.
- Carrillo-Munoz y col., *J. Antimicrob. Chemoth.*, 55(3):317-9, 2005.
- Chae y col., *Bone Marrow Transplant.*, 40:541-547, 2007.
- Chan y col., *Bone Marrow Transplant.*, 29:963-965, 2002.
- 45 Chen y col., *Curr. Opin. Pharmacol.*, 10(5):522-530, 2010.
- Choi y col., *Korean J. Occup. Environ. Med.*, 13:164-170, 2001.
- Chou y col., *Adv. Enzyme Regul.*, 22:27-55, 1984.
- Chow y col., *J. Chromatogr. B*, 704:277-288, 1997.
- Ciurea y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 15(5):523-536, 2009.
- 50 Courtney y col., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47:2.788-2.795, 2003.

- Courtney y col., *Antimicrobial. Agents Chemo.*, 47(9):2.788-2.795, 2003.
- Davis y col., *Am. J. Vet. Res.*, 66(10):1.694-1.701, 2005.
- De Lima y col., *Blood*, 104:857-864, 2004.
- Dean y col., *Br. J. Haematol.*, 148:226-234, 2010.
- 5 Deeg y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 5:316-321, 1999.
- DeLeve y col., *Semin. Liver Dis.*, 22:27-42, 2002.
- Devergie y col., *Blood*, 85:2.263-2.268, 1995.
- Dix y col., *Bone Marrow Transplant.*, 17:225-230, 1996.
- Dodds-Ashley y col., *Drugs of Today*, 41(6):393-400, 2005.
- 10 Dodds-Ashley, *Pharmacotherapy*, 30(8):842-854, 2010.
- Dutkiewicz y Hage, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 7(3):204-209, 2010.
- Dwivedi, *Pharmaceutical Technol. Europe*, 42-46, 2002.
- Evans, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 7(3):197-203, 2010.
- 15 Evensen, y col., *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 19:570-577, 1968.
- Fortner y col., *Am. J. Hosp. Pharm.*, 32:582-84, 1975.
- Glockner y Karthaus, *Mycoses*. 2010 (publicación electrónica)
- Greer, *Baylor Univ. Med. Center Proc.*, 20:188-196, 2007.
- Grigg y col., *Ann. Intern. Med.*, 111:1.049-1.050, 1989.
- 20 Grochow y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 25:55-61, 1989.
- Grochow, *Semin. Oncol.*, 3:20 (Supl 4):18-25, 1993.
- Groll y Walsh, *Mycoses*, 49 (Supl 1):7-16, 2006.
- Haddow y Timmis, *Lancet.*, 31:207-208, 1953.
- Hartman y col., *Bone Marrow Transplant.*, 22:439-443, 1998.
- Hassan y col., *Blood*, 84:2.144-2.150, 1994.
- 25 Hassan y col., *Bone Marrow Transplant.*, 25:915-924, 2000.
- Hassan y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 33:181-186, 1993.
- Hassan y col., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 36:525-530, 1989.
- Hempel y col., *J. Clin. Oncol.*, 25:1.772-1.778, 2007.
- Hicheri y col., *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 8(9):1.049-1.060, 2010.
- 30 Hoffman y col., En: "Hematology. Basic principles and practice", Churchill Livingstone Inc., NY, Filadelfia, 1991.
- Hsu y col., *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 24(3):557-577, 2010.
- Ito y col., *Leuk. Lymphoma*, 51(9):1.623-1.631, 2010.
- Jang y col., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 88(1):115-119, 2010.
- Jones y col., *Transplantation*, 44:778-783, 1987.
- 35 Kashyap y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 8:493-500, 2002.
- Kennedy, *Crit. Rev. Toxicol.*, 31:139-222, 2001.
- Kennedy, *Drug Chem. Toxicol.*, 9:147-170, 1986.
- Kim y col., *Haematologica.*, 90:285-286, 2005.
- Kim y col., *Mycoses.*, 54:e301-312, 2011.
- 40 Klimisch y Hellwig, *Human Experim. Toxicol.*, 19:676-683, 2000.
- Kobayashi y col., *Bone Marrow Transplant.*, 21:217-220, 1998.
- Lee y col., *Ann. Hematol.*, 84:321-330, 2005.
- Lehrmbecher y col., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 29:1.043-1.045, 2010.
- Lewis y Kontoyiannis, *Med. Mycol.*, 47(Supl 1):S271-281, 2009.
- 45 Lortholary y col., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(10):4.446-4.450, 2010.
- Madden y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 13:56-64, 2007.
- Malley y col., *Fundam. Appl. Toxicol.*, 28:80-93, 1995.
- Marcus y Goldman, *Lancet.*, 2:1.463, 1984.
- Martell y col., *Ann. Intern. Med.*, 106:173, 1987.
- 50 Martin y Matzke, *J. Clin. Pharm.*, 1:42-48, 1982.
- McDonald y col., *Ann. Intern. Med.*, 118:255-267, 1993.
- McDonald y col., *Blood*, 101:2.043-2.048, 2003.
- Meloni y col., *Ann. Oncol.*, 3:145-148, 1992.
- Meloni y col., *Haematologica.*, 80:532-534, 1995.
- 55 Mosmann, *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983.
- Notheis y col., *Mycoses*, 49(Supl 1):37-41, 2006.
- Okuda y col., *J. Occup. Health*, 3:154-160, 2006.
- Pappas y col., *Clin. Infect. Dis.*, 15;50(8):1.101-1.111, 2010.
- Parthasarathy y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 34:527-34, 1994.
- 60 Person y col., *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 24(2):439-459, 2010.
- Peters y col., *Cancer Res.*, 47:6.402-6.406, 1987.
- Russell y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 8:468-477, 2002.
- Sadeghi y col., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, (Abstr), 1999.
- Santarone y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2011 (Electrónicamente publicado previo a impresión).
- 65 Santos y Tutschka, *J. Natl. Cancer Inst.*, 53:1.781-1.785, 1974.
- Santos y col., *N. Engl. J. Med.*, 309:1.347-1.353, 1983.

- Santos, *Bone Marrow Transplant.*, 4(Supl 1):236-239, 1989.
- Shimoni y col., *Leukemia*, 20:322-328, 2006.
- Shimoni y col., *Leukemia*, 24:1.050-1.052, 2010.
- Singh y col., *Transplantation*, 81(3):320-326, 2006.
- 5 Slattery y col., *Blood*, 89:3.055-3.060, 1997.
- Socie y col., *Blood*, 98:3.569-3.574, 2001.
- Spiegel y Noseworthy, *J. Pharm. Sci.*, 52:917-927, 1963.
- Sureda y col., *Ann. Intern. Med.*, 111:543-544, 1989.
- Thall y col., *Bone Marrow Transplant.*, 33:1.191-1.199, 2004.
- 10 "The Food and Drug Administration", "The Federal Register", 18 de agosto de 2010.
- "The Merck Index". Busulfan. p. 253, 2001.
- "The Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHA)" dentro de la "California Environmental Protection Agency", "Chemical Listed Effective" 21 de mayo de 2010.
- Torres y col., *Lancet Infect. Dis.*, 5(12):775-785, 2005.
- 15 Tutschka y col., *Blood*, 70:1.382-1.388, 1987.
- Ullmann y col., *N. Engl. J. Med.*, 356(4):335-347, 2007.
- Valentine y col., *Inhalation Toxicol.*, 9:141-158, 1997.
- Van de Velde y col., *Pharmacotherapy*, 16(3):424-428, 1996.
- Vassal y col., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 24:386-390, 1989.
- 20 Vassal y col., *Cancer Res.*, 50:6.203-6.207, 1990.
- Vassal, *Anticancer Res.*, 14:2.363-2.370, 1994.
- Vehreschild y col., *J. Antimicrob. Chemother.*, 65(7):1.466-1.471, 2010.
- VICH Steering Committee, VICH GL 18 (R) - "Intl. Coop. Harmonisation of Tech. Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products". (Rev. 9), 2010.
- 25 Walsh y col., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(10):4.116-4.123, 2010.
- Wang y col., *Leukemia*, 5:493-499, 1991.
- Weiss y col., *Cancer Chemother. Rep.*, 16:477-485, 1962a.
- Weiss y col., *Science*, 136:151-152, 1962b.
- Willems y col., *J. Clin. Pharm. Ther.*, 26(3):159-169, 2001.
- 30 Wingard y col., *Blood*, 116(24):5111-5118, 2010.
- Winston y col., *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2010 (publicado electrónicamente).
- Woestenborghs y col., *J. Chromatogr.*, 413:332-337, 1987.
- Yalkowsky y Roseman, En: "Techniques of solubilization of drugs", Yalkowsky (Ed.), Marcel Dekker Inc., NY, 91-134, 1981.
- 35 Zhou y col., *Clin. Pharmacol.*, 38(7):593-602, 1998.

## REIVINDICACIONES

1. Una solución homogénea no acuosa que comprende un agente farmacéutico lipófilo solubilizado y un disolvente polimérico líquido anfífilico, que es polietilenglicol (PEG) líquido, siendo la formulación básicamente libre de disolventes orgánicos no poliméricos, agua y partículas no solubilizadas, en la que el agente farmacéutico lipófilo es un azol antifúngico o es el agente anticanceroso Busulfán (1,4-butanodiol dimetanosulfonato) y en la que el agente farmacéutico lipófilo solubilizado tiene una concentración de al menos 2 mg/ml, siendo la solución homogénea no acuosa para su uso en un procedimiento para el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o afección sensible a un agente farmacéutico lipófilo seleccionado, que comprende administrar por vía parenteral al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende la solución, en la que el agente farmacéutico lipófilo es el agente farmacéutico lipófilo seleccionado, en la que el sujeto es preferentemente un mamífero, en particular, en la que el sujeto es preferentemente un ser humano, en la que la solución homogénea no acuosa es preferentemente para administración intravascular, intracavitaria, intratecal, subcutánea, intramuscular o tópica.
2. La solución homogénea no acuosa de la reivindicación 1, en la que la solución continúa estable y básicamente libre de partículas no solubilizadas durante al menos 60 días cuando se almacena a temperatura ambiente, en la que el agente farmacéutico lipófilo solubilizado preferentemente tiene una concentración de 2 a 10 mg/ml, más preferido de aproximadamente 3 a 9 mg/ml.
3. La solución homogénea no acuosa según la reivindicación 1, en la que el agente farmacéutico lipófilo solubilizado tiene una concentración de al menos 4 mg/ml.
4. La solución homogénea no acuosa según la reivindicación 1, en la que el agente farmacéutico lipófilo solubilizado tiene una concentración de al menos 5 mg/ml.
5. La solución de la reivindicación 1, en la que el agente farmacéutico lipófilo es el agente anticanceroso Busulfán (1,4-butanodiol dimetanosulfonato), o en la que el agente farmacéutico lipófilo es el agente de azol itraconazol (Itra) o posaconazol (Posa).
6. La solución de la reivindicación 1, en la que dicho disolvente polimérico líquido anfífilico está comprendido de un tipo de polímero sencillo, en la que dicho disolvente polimérico líquido anfífilico preferentemente se selecciona del grupo que consiste en PEG-100, PEG-200, PEG-300, PEG-400, PEG-600 y PEG-800.
7. La solución de la reivindicación 1, en la que la solución comprende, además, un agente de protonación, en la que el agente de protonación preferentemente es un ácido, alcohol o alcohol acidificado, en particular, en la que el ácido preferentemente es HCl, ácido cítrico, ácido acético o ácido glutámico, en la que la solución preferentemente tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 6.
8. La solución de la reivindicación 1, en la que dicha solución se diluye con un diluyente acuoso.
9. La solución de la reivindicación 8, en la que el diluyente es un fluido de infusión acuoso.
10. La solución de la reivindicación 9, en la que el fluido de infusión acuoso es solución salina normal, dextrosa en agua o fluido en emulsión de infusión a base de lípidos.
11. La solución homogénea no acuosa para su uso según la reivindicación 1, en la que el sujeto tiene una cualquiera de las siguientes enfermedades o necesidades seleccionadas de lo siguiente: el sujeto tiene un cáncer o una necesidad de acondicionamiento del sujeto para realizar un trasplante de médula ósea o un trasplante de células madre hematopoyéticas y el agente farmacéutico lipófilo es Busulfán; el sujeto tiene una enfermedad infecciosa y el agente farmacéutico lipófilo es un agente antiinfeccioso; el sujeto tiene una enfermedad fúngica, de levadura o moho y el agente farmacéutico lipófilo es un agente de azol.
12. La solución homogénea no acuosa de la reivindicación 1, en la que el agente farmacéutico es Busulfán.
13. La solución homogénea no acuosa de la reivindicación 1, en la que el agente farmacéutico es Itra.
14. La solución homogénea no acuosa de la reivindicación 1, en la que el agente farmacéutico es Posa.
15. La solución homogénea no acuosa de la reivindicación 1, en la que la solución continúa estable y básicamente libre de partículas no solubilizadas durante al menos 40 días cuando se almacena a temperatura ambiente.

Estabilidad de Bu diluido en D5A a temperatura ambiente

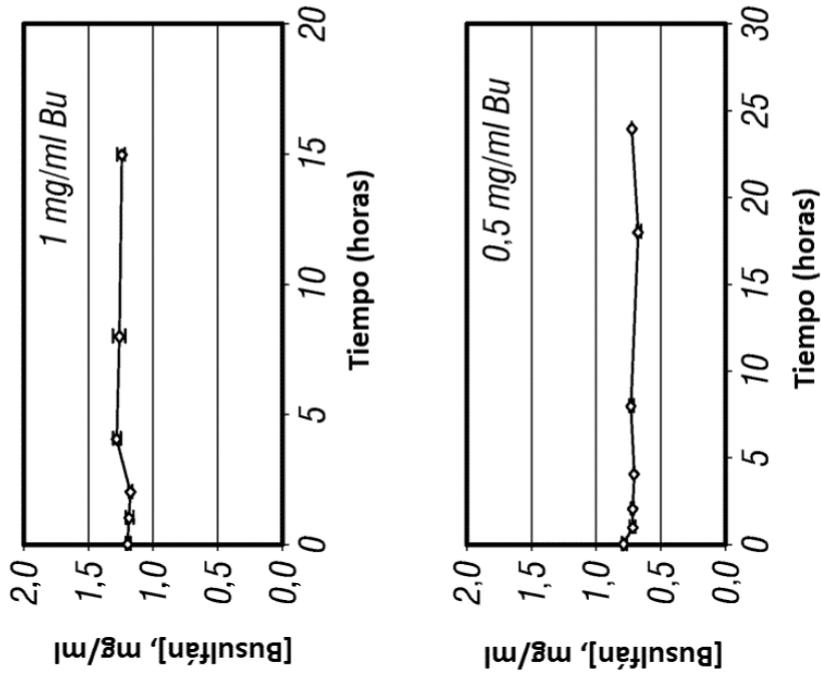


FIG. 1B

Estabilidad de Bu en PEG400 a temp. ambiente  
Promedio de 3 réplicas

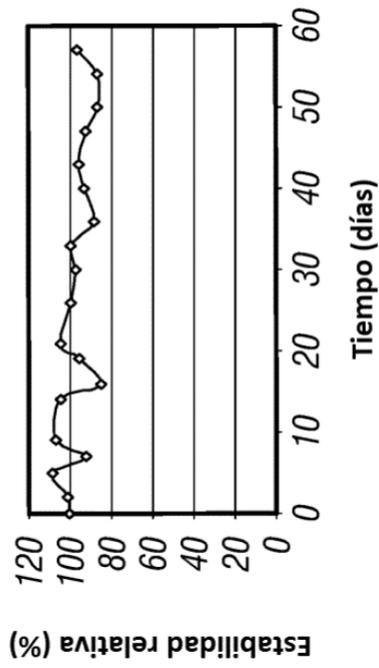


FIG. 1A

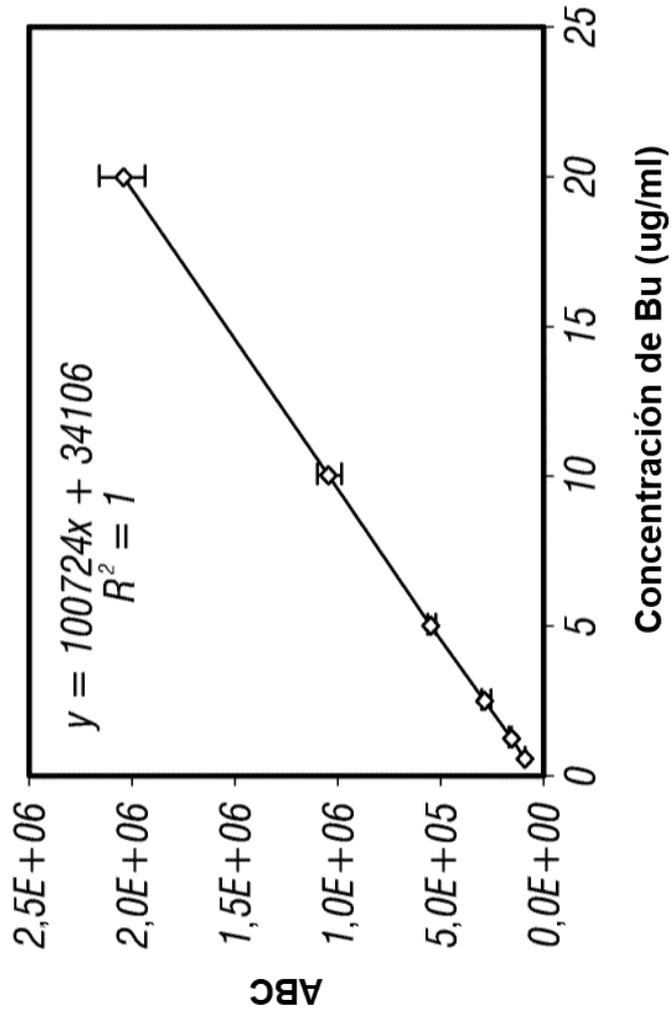


FIG. 2

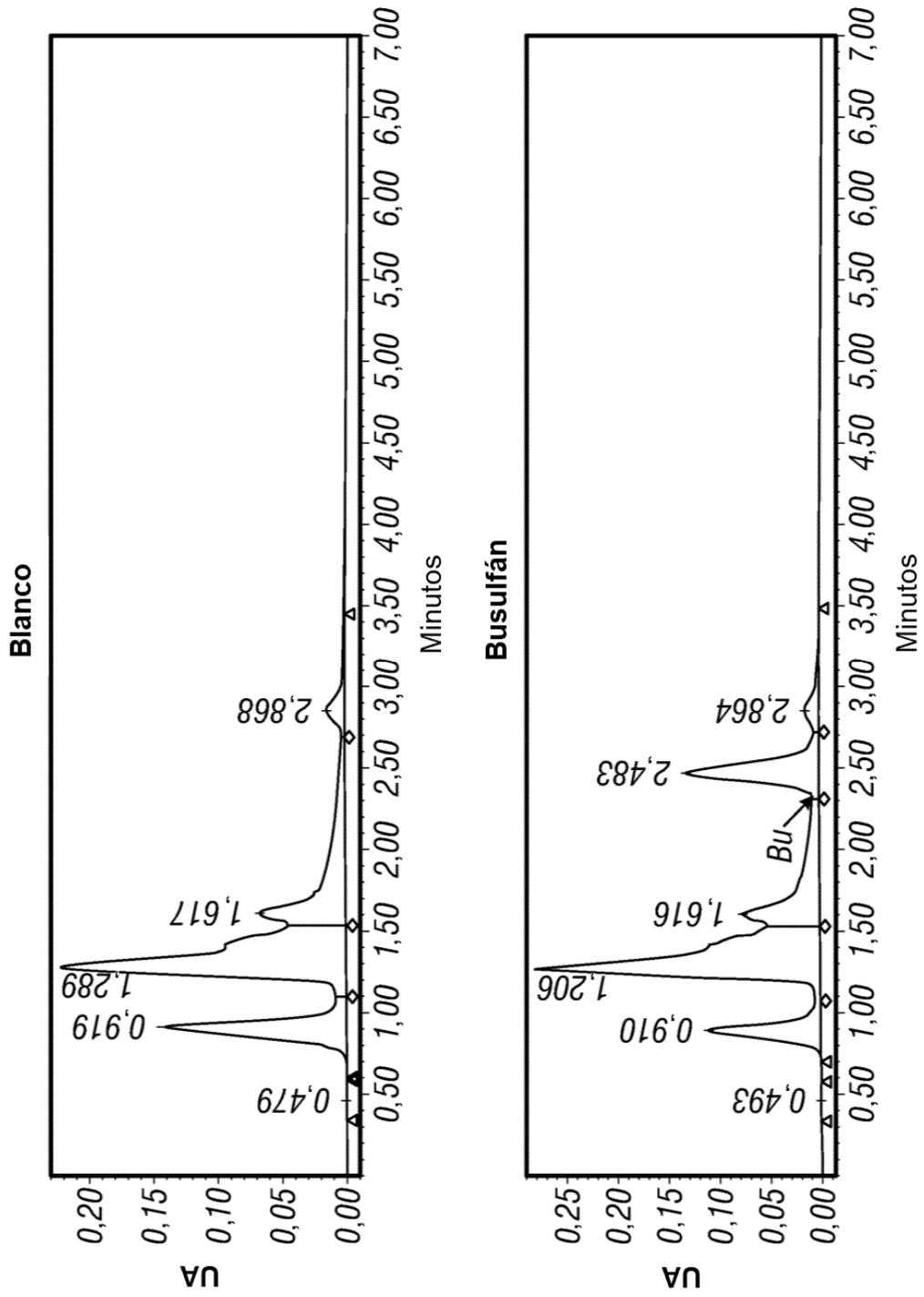


FIG. 3

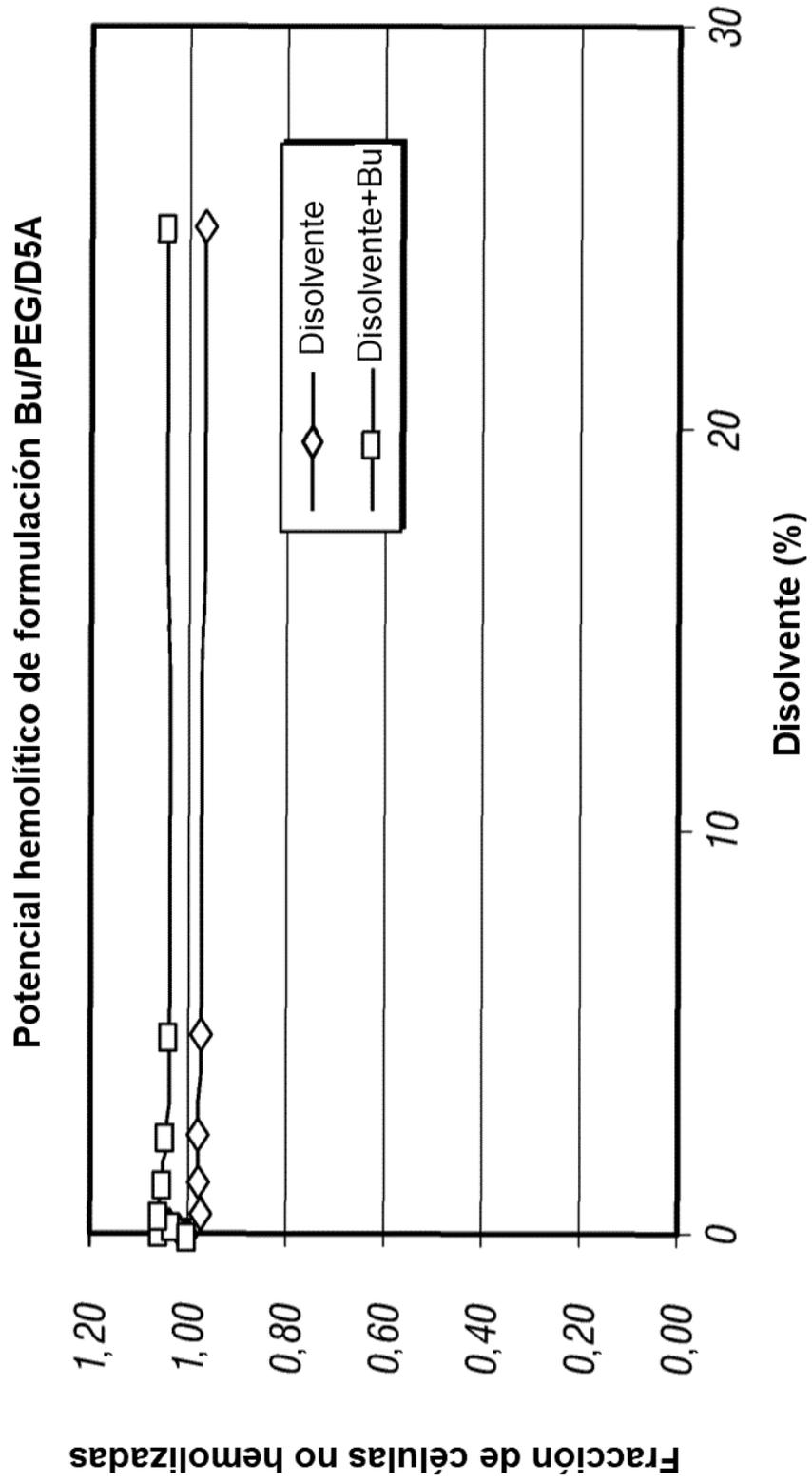
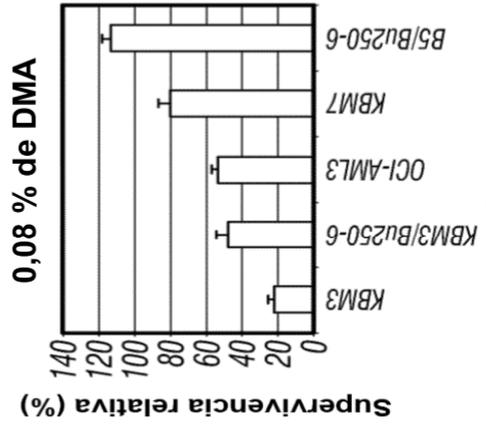
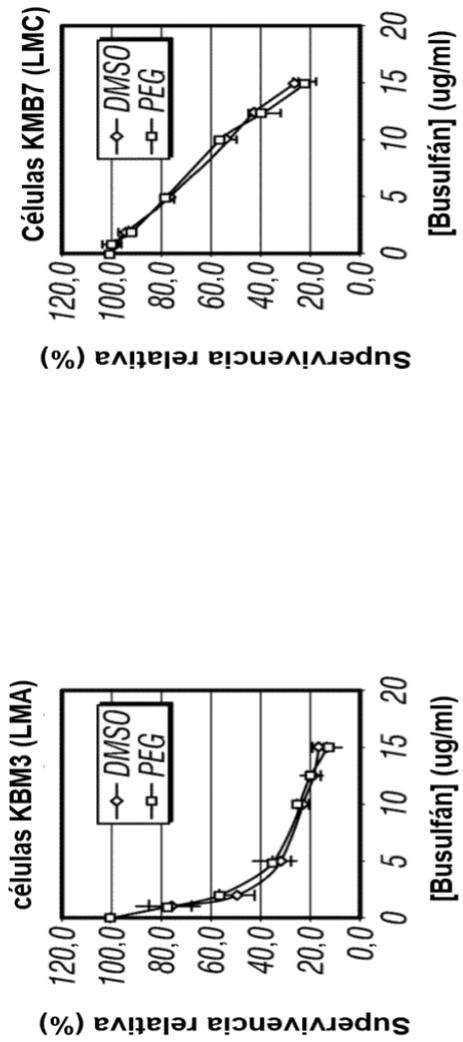


FIG. 4



Tres Formulaciones de Busulfán: Citotoxicidad *in vitro* - ensayo MTT

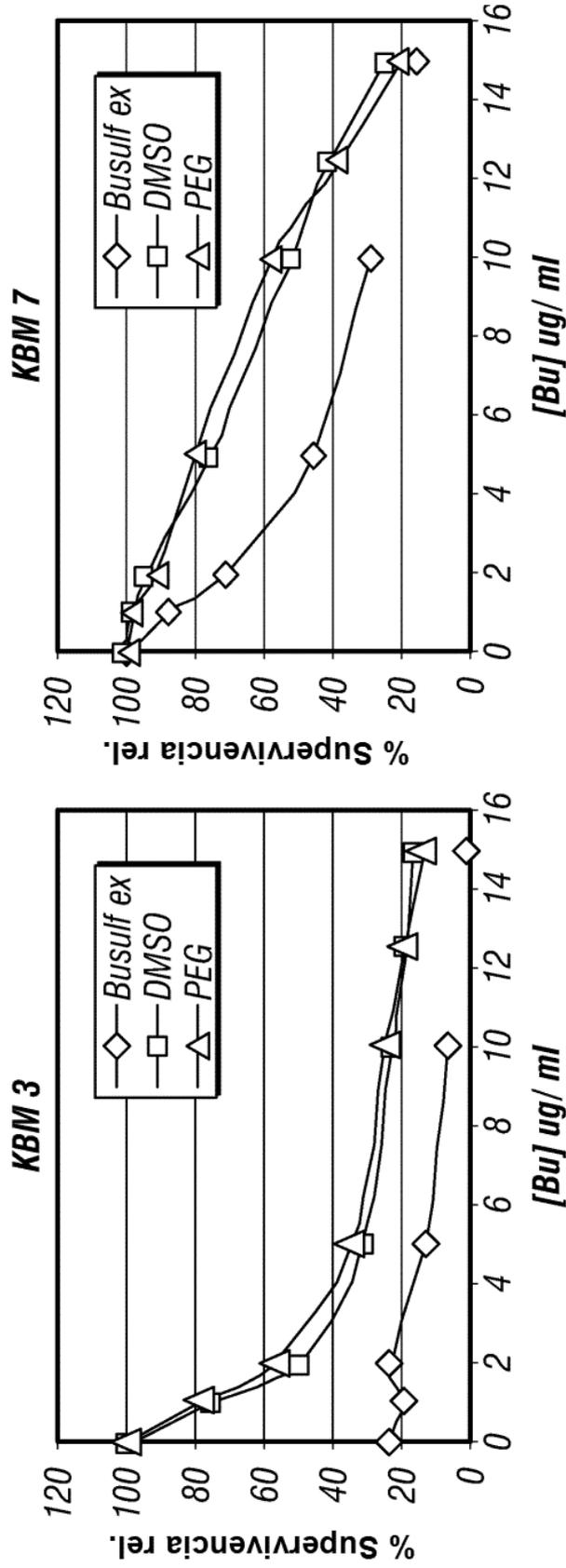


FIG. 6

Tres formulaciones de Busulfán: Citotoxicidad *in vitro* - ensayo MTT

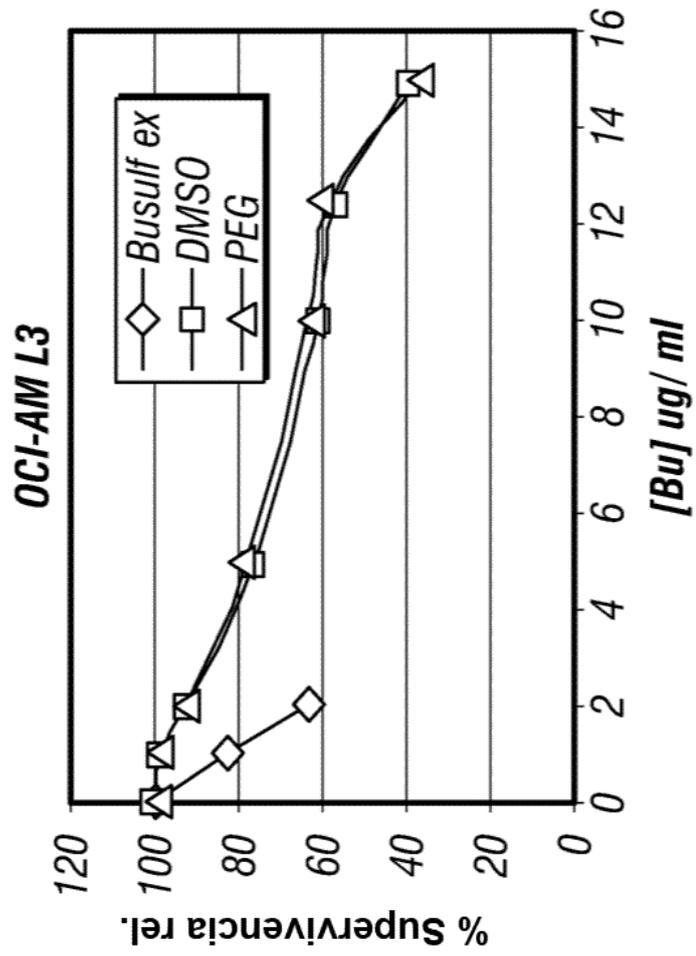


FIG. 6 (continuación)

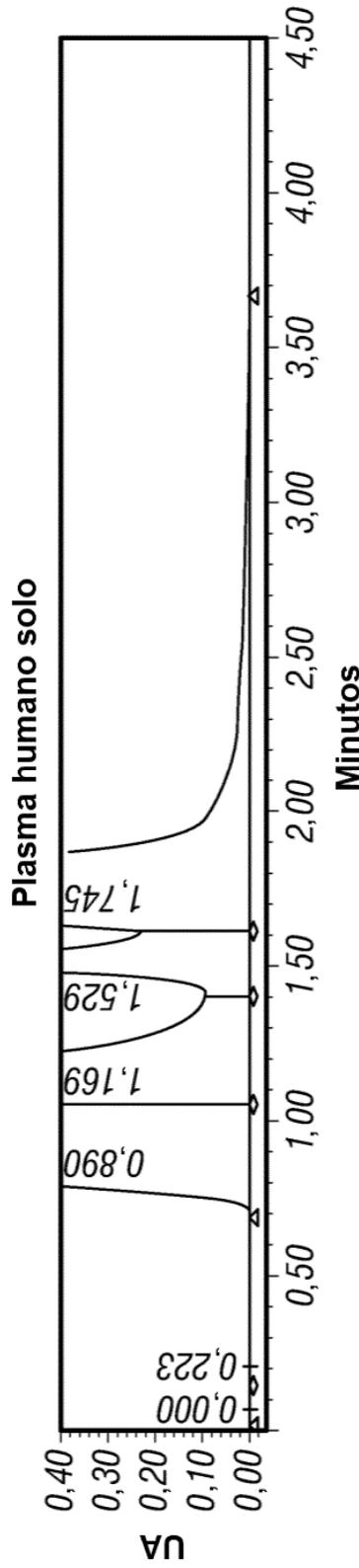


FIG. 7A

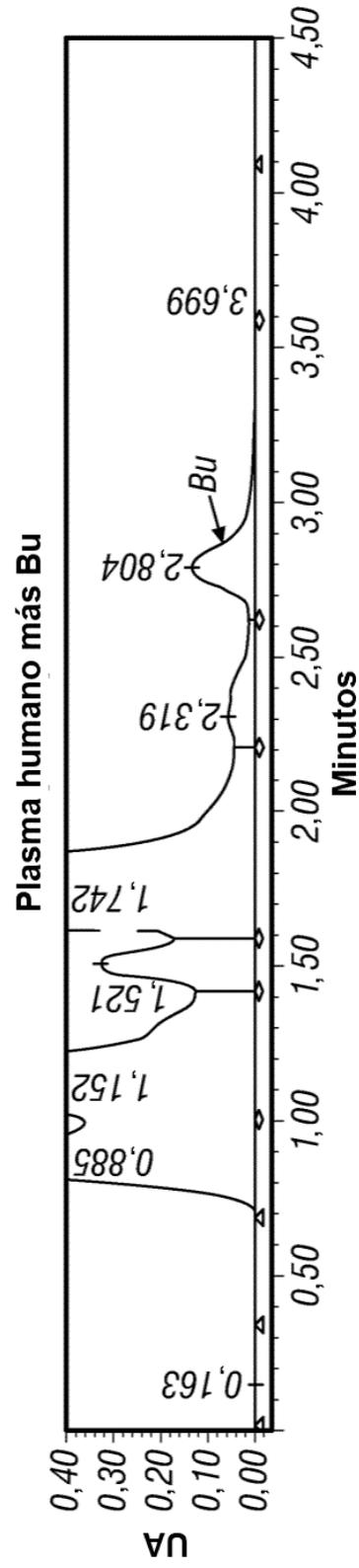
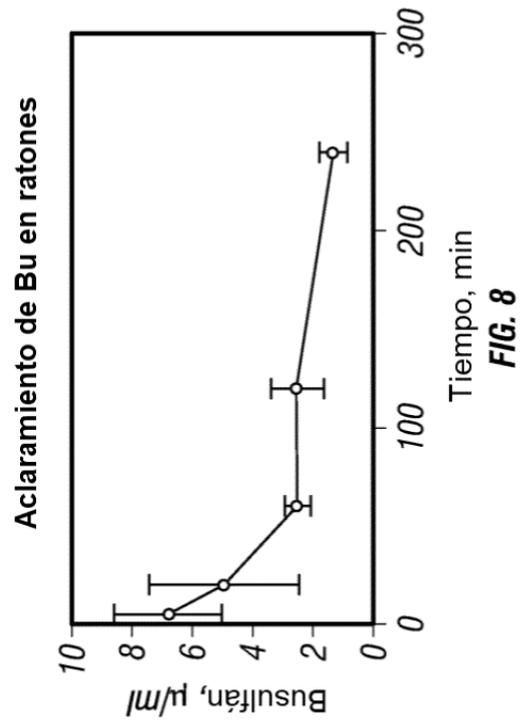
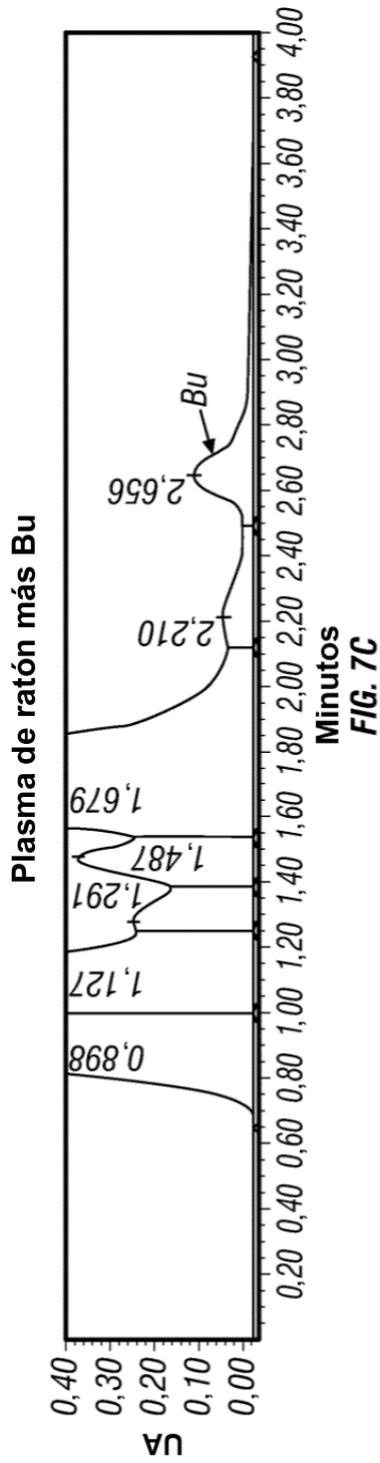
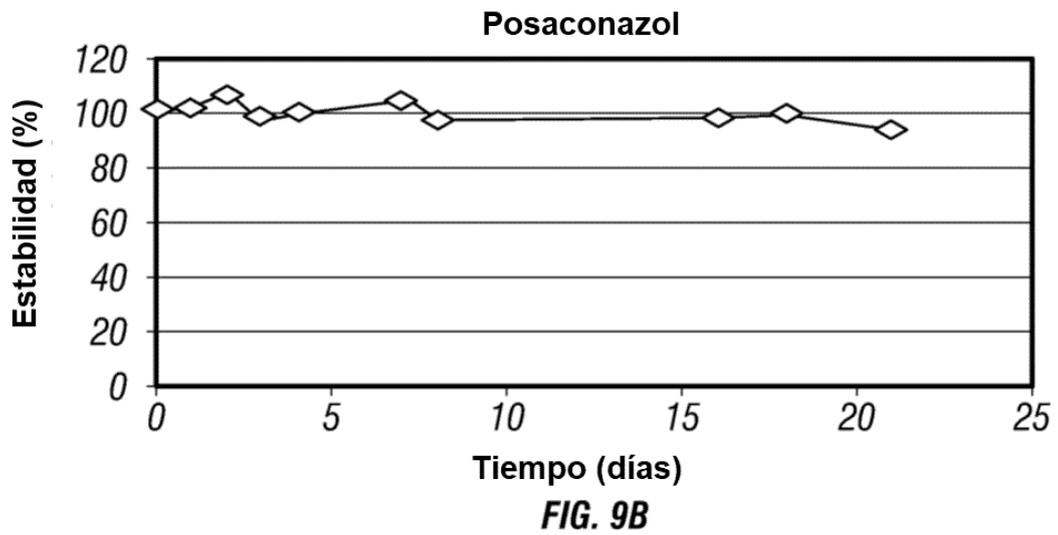
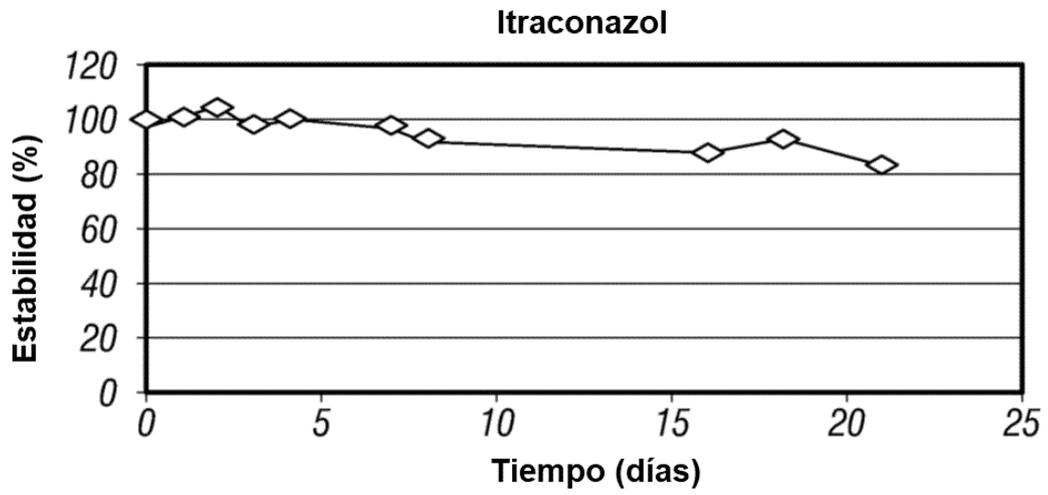
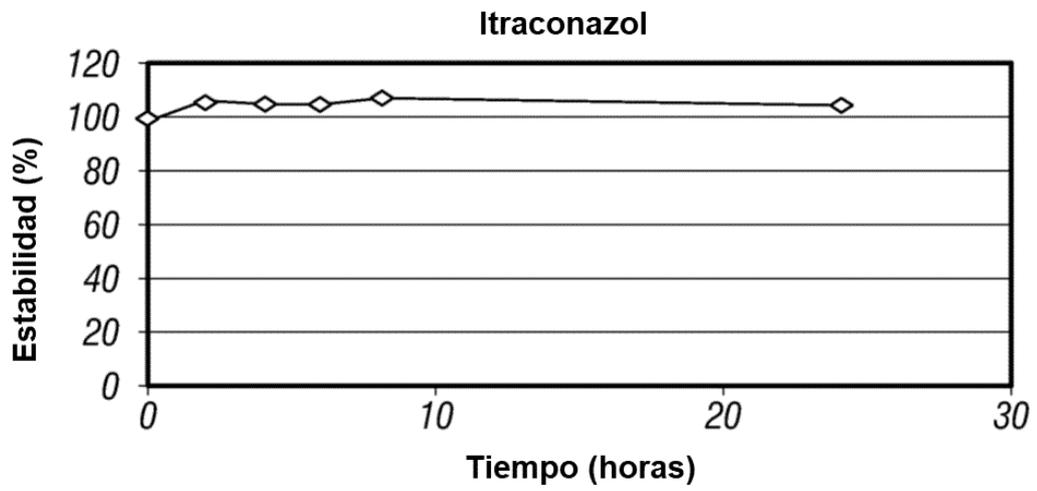


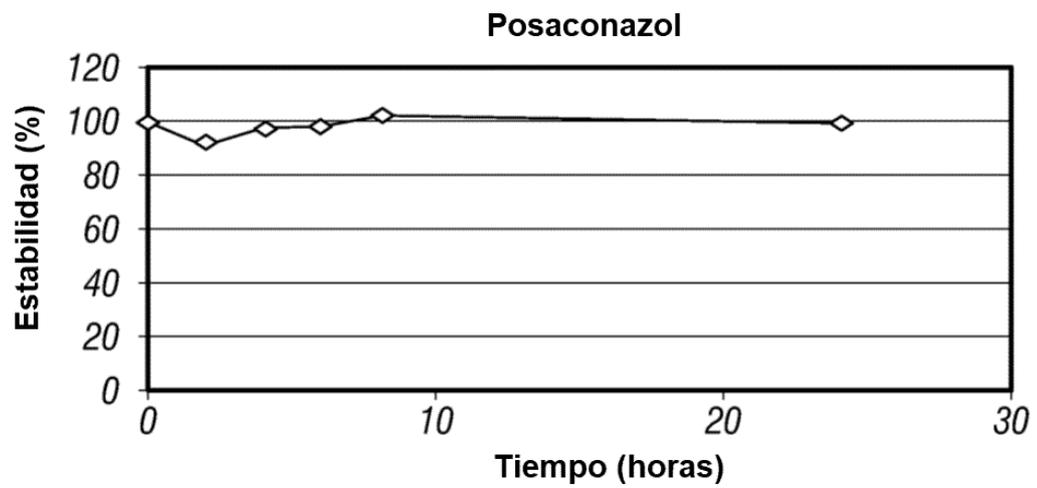
FIG. 7B





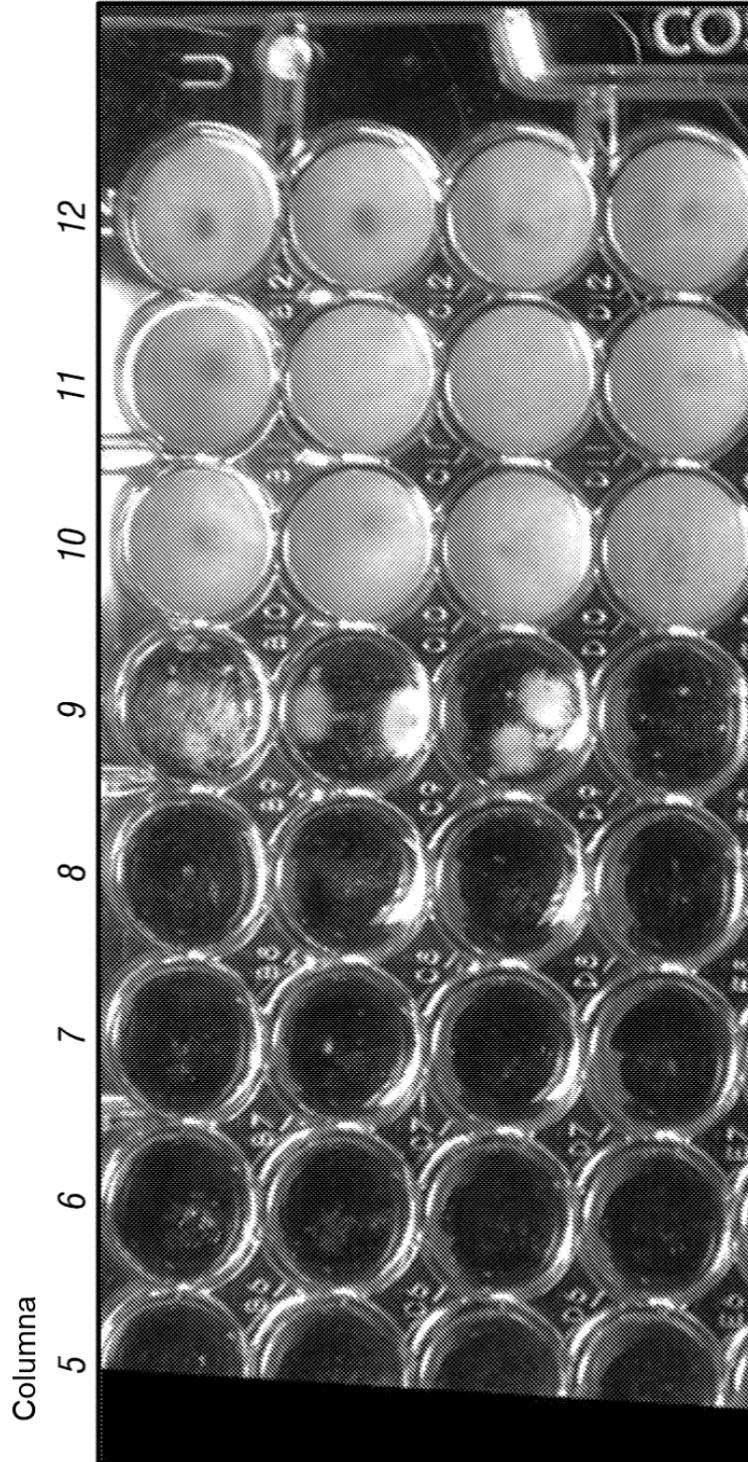


**FIG. 10A**

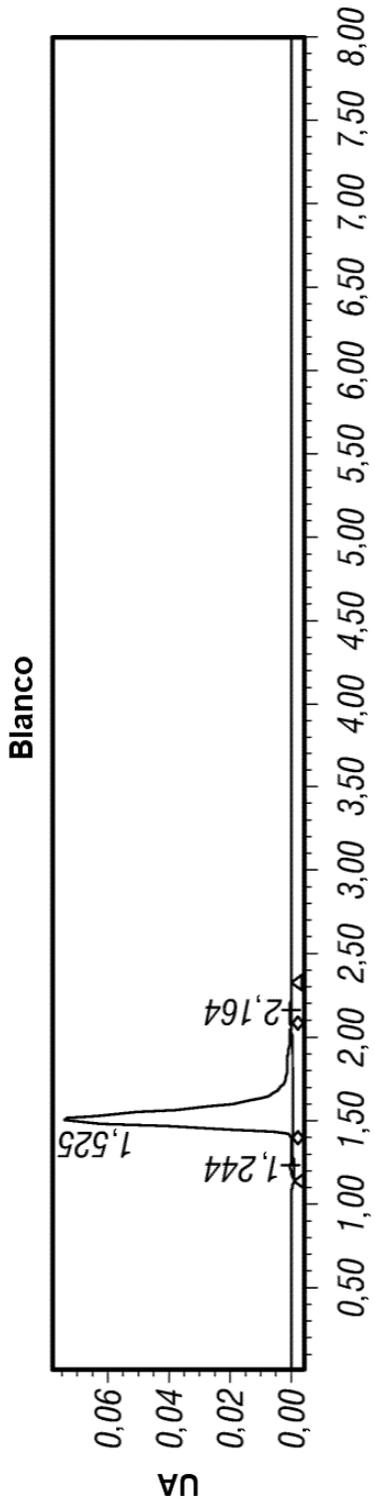


**FIG. 10B**

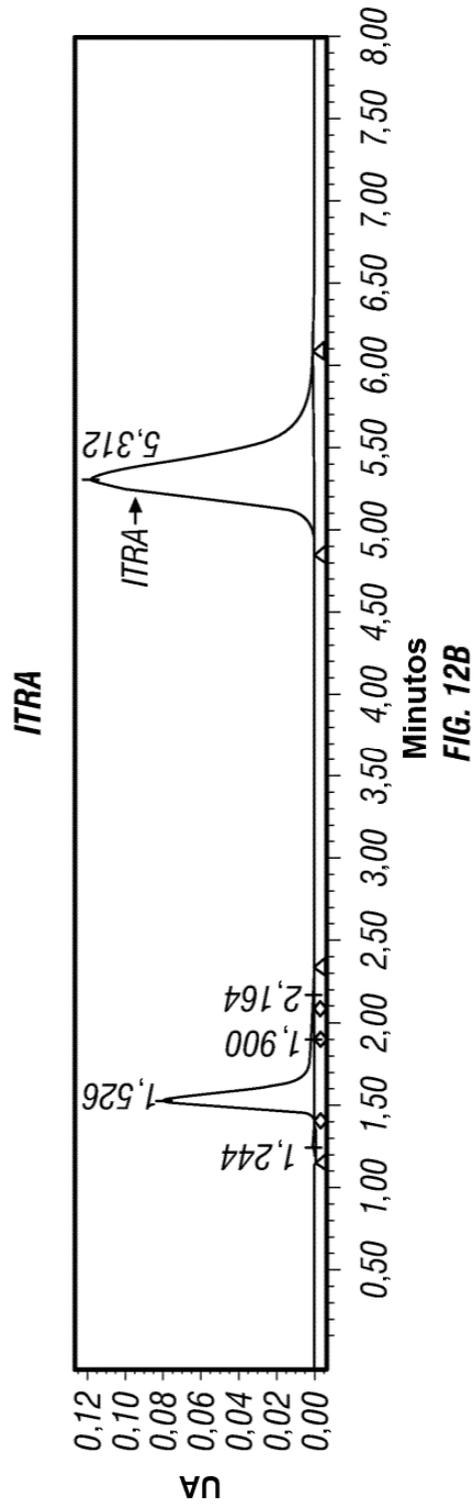
*Aspergillus* 90906 frente a Itraconazol en disolvente novedoso



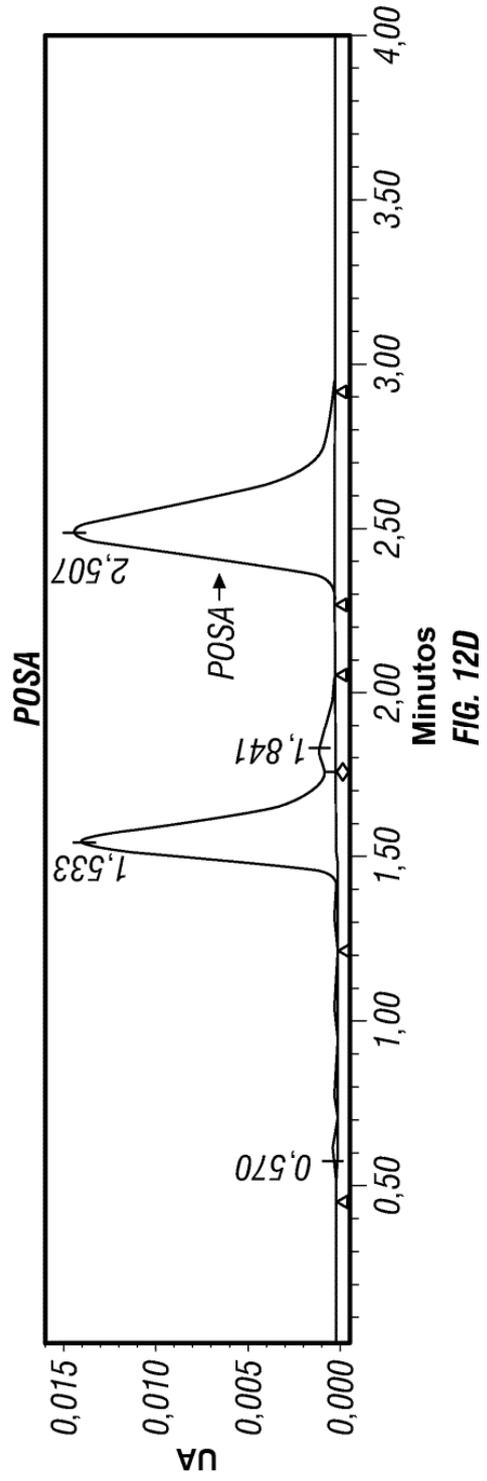
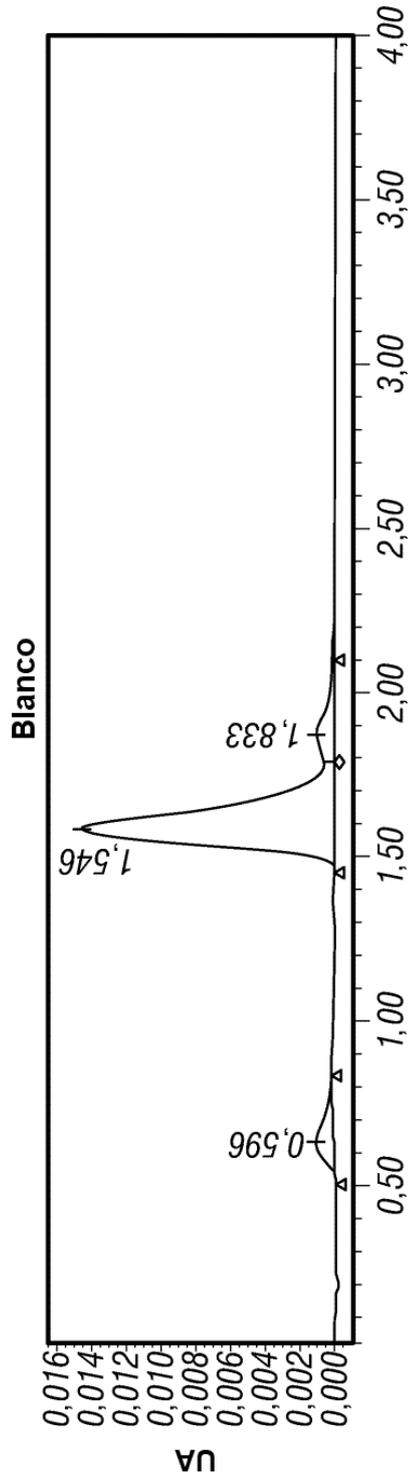
**FIG. 11**

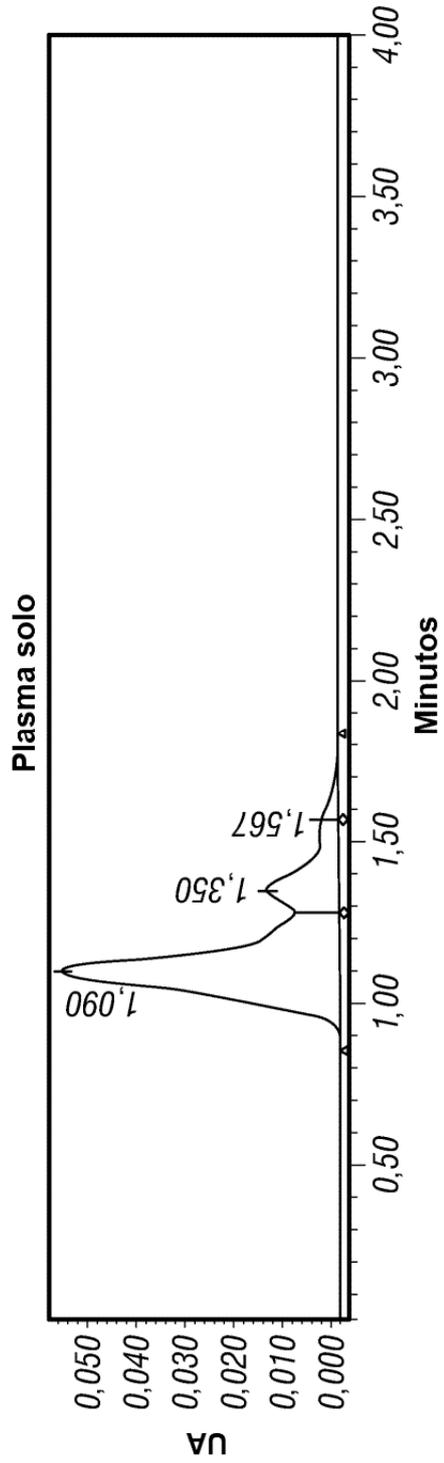


**FIG. 12A**

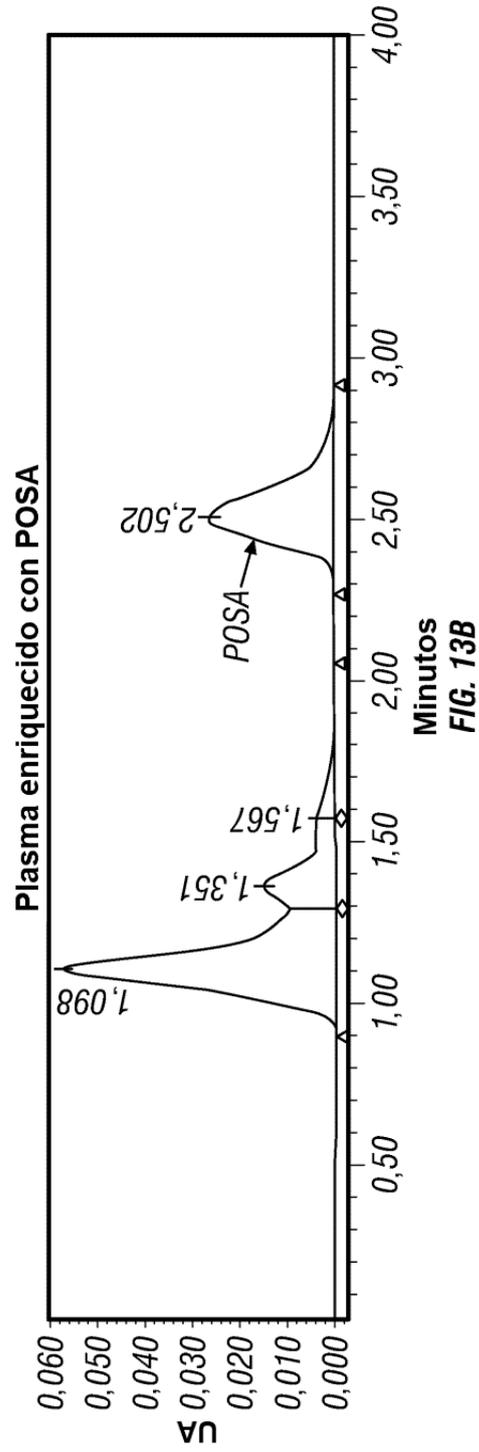


**FIG. 12B**

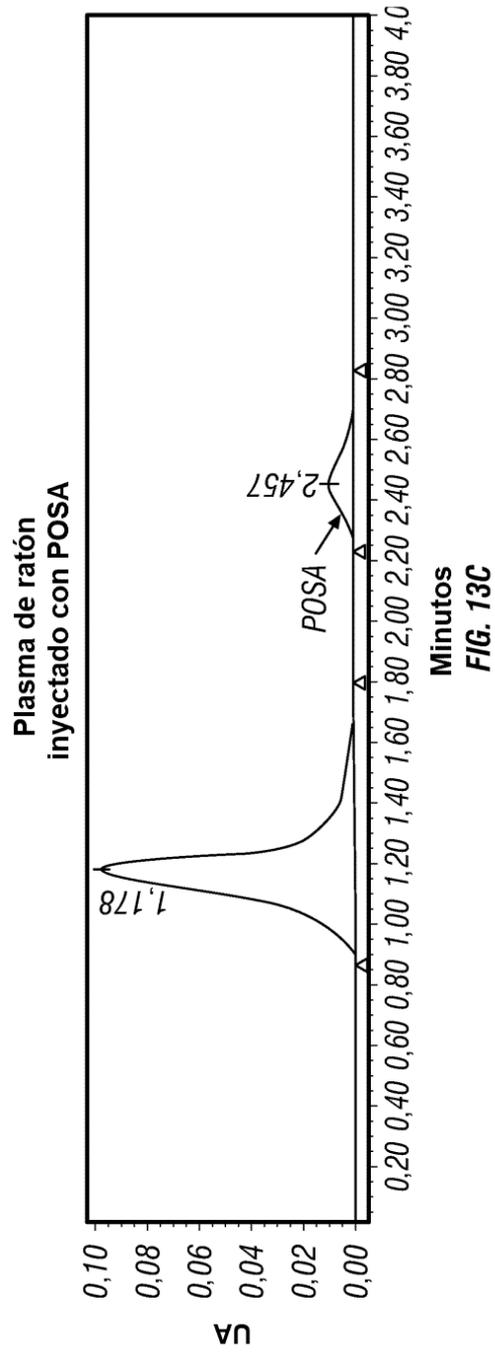




**FIG. 13A**



**FIG. 13B**



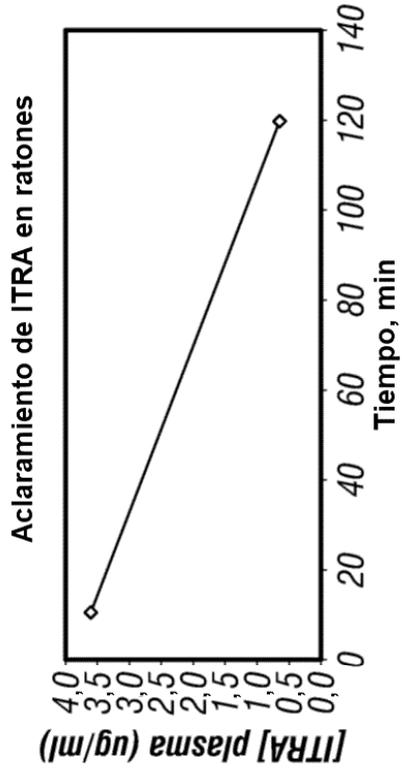


FIG. 14A

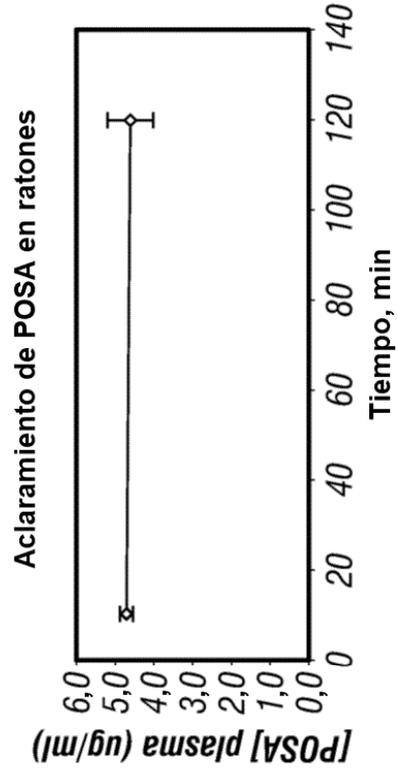


FIG. 14B

| Tiempo, min | [Fármaco], µg/ml |      |
|-------------|------------------|------|
|             | ITRA             | POSA |
| 10          | 3,6              | 4,71 |
| 120         | 0,64             | 4,62 |

| Tiempo, min | [Fármaco], µg/ml |      |
|-------------|------------------|------|
|             | ITRA             | POSA |
| 10          | 3,6              | 4,71 |
| 120         | 0,64             | 4,62 |