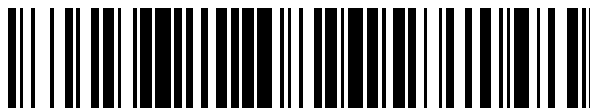


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 440**

21 Número de solicitud: 201001230

51 Int. Cl.:

A61K 31/7048 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

27.09.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.09.2012

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

16.01.2014

Fecha de la concesión:

28.01.2014

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.02.2014

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
AV. SENECA, 2
28040 MADRID (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**TORRADO DURAN, Juan Jose;
RUIZ SALDAÑA, Helga Karina;
SERRANO LOPEZ, Dolores Remedios;
MOLERO MARTIN-PORTUGUES, Gloria;
NOMBELA CANO, Cesar;
BOLAS FERNANDEZ, Francisco;
DEA AYUELA, Maria Auxiliadora;
BILBAO RAMOS, Pablo Estanislao y
VEGAS SANCHEZ, Maria Del Carmen**

54 Título: **FORMULACIONES TOPICAS DE ANFOTERICINA B Y METODO DE OBTENCION**

57 Resumen:

La invención se refiere a la preparación de nuevas formulaciones de anfotericina B de administración por vía tópica. En dichas formulaciones, la anfotericina B se encuentra formando un complejo con ciclodextrina. La poca afinidad de la anfotericina B por la ciclodextrina provoca la liberación de la mayor parte del antifúngico tras la administración de la formulación, ocasionando un aumento del efecto farmacológico de la anfotericina B gracias al cual ésta manifiesta acción antiparasitaria (antileishmaniosis) además de la acción antimicótica (cutánea, mucocutánea y superficial), principal indicación para la que se prescribe actualmente la anfotericina B. Para la preparación de estas formulaciones se utiliza una combinación de excipientes (además de la ciclodextrina que actúa como solubilizante), tales como viscosizantes, emulsificantes y excipientes grasos. En la presente invención se describe la preparación de formulaciones tópicas de anfotericina B, presentando cada o una de ellas una forma farmacéutica diferente: gel, crema, pomada y colirio.

ES 2 387 440 B2

DESCRIPCIÓN

FORMULACIONES TÓPICAS DE ANFOTERICINA B Y MÉTODO DE OBTENCIÓN

5

Sector de la Técnica

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la fabricación de preparaciones farmacéuticas. De forma más concreta, la invención se refiere a la
10 preparación y obtención de nuevas composiciones de anfotericina B de administración por vía tópica, y su utilización en el tratamiento y prevención de micosis superficiales, cutáneas y mucocutáneas, así como para el tratamiento de leishmaniosis.

Estado de la Técnica

15

La anfotericina B fue descubierta a mediados de los años 50 del siglo pasado por la empresa Squibb, que posteriormente la comercializó en forma de suspensión de administración intravenosa con el nombre comercial Fungizona[®] (anfotericina B desoxicolato). Esta formulación todavía está en el mercado y aunque en algunos
20 países, por ejemplo España, se ha dejado de comercializar sustituyéndola por otras formulaciones menos tóxicas, como liposomas y complejos lipídicos de anfotericina B, Fungizona[®] sigue siendo todavía la formulación de referencia de este antifúngico.

La anfotericina B interactúa directamente con el ergosterol de la membrana celular
25 fúngica pero no interfiere con la síntesis de la membrana sino que la desestabiliza, facilitando la formación de canales con la pérdida consecuente de iones y componentes celulares produciendo así la muerte celular. En gran parte, esta acción se debe a su peculiar estructura química caracterizada por presentar una doble naturaleza hidrófila y lipófila. Esta propiedad, junto con el comportamiento anfótero (tiene
30 grupos ácido y base) que da nombre a la molécula (anfotericina), facilita su incorporación a las membranas celulares induciendo la desestabilización de las mismas. Su mayor afinidad por los esteroides de la membrana celular fúngica, que por

el colesterol de la célula animal, explica que la anfotericina B resulte más tóxica para el patógeno que para el hospedador, a pesar de lo cual resulta ser un antifúngico de toxicidad muy elevada.

- 5 La peculiar estructura química de este antifúngico es asimismo responsable de las importantes dificultades para su solubilización, condicionando así la preparación de formulaciones de anfotericina B. Sólo por su deficiente solubilidad se justifica, con carácter excepcional, la utilización de suspensiones de administración intravenosa.
- 10 Asimismo, su escasa afinidad por el agua es responsable de la tendencia a la formación de agregados moleculares cuando se dispersa en un medio acuoso. Se han descrito varios estados de agregación de anfotericina B con diferente actividad y toxicidad. De forma resumida éstos serían tres: monomérico, dimérico y poliagregado. La forma más utilizada en terapéutica es la dimérica, obtenida por mezcla de
- 15 anfotericina B y desoxicolato sódico junto con un cambio de pH (Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP y Torrado-Santiago S. “Amphotericin B formulations and drug targeting”, *J. Pharm. Sci.* 2008: 97, 2405-2425). A pesar de las limitaciones para su utilización a causa de la toxicidad, tras muchos años desde su lanzamiento al mercado la anfotericina B sigue siendo considerada como un antifúngico de primera elección
- 20 en muchos casos, tanto por su amplio espectro como, sobre todo, porque su uso no ha generado resistencias clínicas relevantes.

Desde el descubrimiento de la anfotericina B han sido varias las formulaciones de la misma que se han comercializado en todo el mundo. La primera formulación que se

25 comercializó y la que recibe el nombre de anfotericina B convencional es:

Anfotericina B desoxicolato (abreviadamente, AMB desoxicolato) (comercializado bajo el nombre de Fungizona[®]): se trata de un complejo coloidal de anfotericina B con desoxicolato sódico. Su forma farmacéutica es la de polvo liofilizado estéril para

30 reconstituirse y la vía de administración es la intravenosa, aunque también existe presentación para suspensión oral.

Debido a los problemas encontrados en esta formulación (principalmente, la nefrotoxicidad), y dado que la anfotericina B había demostrado una gran eficacia, se propusieron formulaciones lipídicas de la misma como alternativa al tratamiento clásico.

5

Estas formulaciones lipídicas han demostrado ser menos tóxicas que la anfotericina B desoxicolato en varios estudios experimentales manteniendo el mismo espectro antifúngico, lo que permite una dosificación más alta y, con ello, aumentar el índice terapéutico.

10

Las formulaciones lipídicas que han llegado al mercado son:

Anfotericina B complejo lipídico (comercializado bajo el nombre de Abelcet[®]): se trata de un complejo de anfotericina B con dos fosfolípidos: L- α -dimiristoilfosfatidilcolina (abreviadamente, DMPC), L- α -dimiristoilfosfatidilglicerol (en forma de sales de sodio y amonio) (abreviadamente, DMPG). Su forma farmacéutica es la de un concentrado para suspensión y la vía de administración es la perfusión.

15

20 Anfotericina liposomal (comercializado bajo el nombre de AmBisome[®]): se trata de una formulación farmacéutica que comprende anfotericina B encapsulada en la bicapa de liposomas. La forma farmacéutica es la de un liofilizado y la vía de administración es por infusión intravenosa.

25 Anfotericina B dispersión coloidal (comercializado bajo el nombre de Amphotec[®] o Amphocil[®]): se trata de un complejo de anfotericina B con sulfato sódico de colesterilo. La forma farmacéutica es la de liofilizado para reconstitución y la vía de administración es por infusión intravenosa.

30 Otra formulación farmacéutica que se lanzó al mercado (aprobada en España en el año 1967) comprendía anfotericina B combinada con gramicidina, neomicina y triamcinolona y en esta ocasión la formulación se presentaba en forma de pomada

(Catálogo de Especialidades Farmacéuticas del Consejo General de Colegios Oficiales de farmacéuticos, 1998) (comercializada bajo el nombre de Trigon[®]). Sin embargo, una combinación de cuatro componentes activos en una misma formulación (polifármaco) está actualmente desaconsejada ya que aumenta el riesgo de resistencias y efectos adversos. Esta formulación farmacéutica se dejó de comercializar en España a finales del siglo pasado.

Por otra parte, tal y como se ha comentado anteriormente en la presente invención, los principales inconvenientes que plantea la anfotericina B para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas son su escasa solubilidad en medio acuoso y su deficiente estabilidad física y química. Por este motivo, paralelamente a la investigación llevada a cabo para lanzar al mercado nuevos medicamentos de este antifúngico cada vez más perfeccionados, se han realizado también diversos estudios para intentar aumentar su solubilidad en medio acuoso así como también mejorar su estabilidad. En los últimos años ha cobrado gran interés el uso de las ciclodextrinas para incrementar la solubilidad y estabilidad de la anfotericina B (EP147851B1, US4883785A, WO8910739A1). Se ha demostrado que las ciclodextrinas forman un complejo con anfotericina B que presenta una solubilidad en agua y una estabilidad que son sustancialmente mayores que las de los compuestos o formulaciones conocidas de anfotericina B. Además el complejo tiene una palatabilidad, estabilidad a la luz y toxicidad mejoradas respecto a las formulaciones o compuestos de anfotericina B conocidos. Entre las ciclodextrinas que se han usado a tal efecto destaca el uso de γ -ciclodextrina (EP147851B1) por los buenos resultados que se obtienen.

25

Se han descrito también diversas alternativas a la utilización de la γ -ciclodextrina que proporcionan, como ella, buenos resultados. Por ejemplo, en la patente WO8910739A1 se propone un derivado hidroxialquil ciclodextrina en lugar de la molécula base de γ -ciclodextrina. Asimismo, en la patente WO2006089007A2 se expone la utilización de un nuevo derivado polimerizado de ciclodextrina al que la anfotericina B se une por enlace covalente (unión pues de mayor grado de fuerza que la descrita en las patentes anteriores).

30

Adicionalmente, se han propuesto también alternativas respecto al método de síntesis de estos complejos anfotericina B-ciclodextrina (abreviadamente, AMB-CD). Desde que se propuso la utilización de las ciclodextrinas para aumentar la solubilidad y estabilidad de la anfotericina B se han estado usando diversas variantes de un mismo método de síntesis del complejo anfotericina B-ciclodextrina. Este método se basa en un cambio de pH y en el uso de disolventes, como el etanol, y posterior secado y eliminación de restos por liofilización o atomización. En contraposición, en la patente JP8059483A se describe un nuevo método para elaborar dichos complejos. Esta nueva alternativa de síntesis propone la utilización del disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), disolvente más tóxico que los usados convencionalmente, que luego se retira por diálisis.

Las formulaciones de anfotericina B comercializadas hasta la fecha están destinadas a administrarse prioritariamente por vía intravenosa y la forma farmacéutica en la que se comercializan es la de polvo liofilizado. Para poder administrar la anfotericina B por vía intravenosa, se deberá dispersar previamente el liofilizado en medio acuoso. El periodo de validez (o estabilidad física y química en uso tras la dilución) del polvo de anfotericina B una vez dispersado en medio acuoso es muy corto (unos pocos días y conservado en nevera), lo que dificulta su uso comercial.

Además, en los últimos años se ha producido el agravamiento de varios problemas sanitarios que demandan el desarrollo de formulaciones tópicas de anfotericina B:

- Prevención de infecciones nosocomiales: En enfermos hospitalizados se acentúa el peligro de infección fúngica provocada por los catéteres y sondas. Por esta razón, y de forma preventiva, se usan combinaciones de antifúngicos de amplio espectro (especialmente anfotericina B) con antibióticos preparados generalmente en los servicios de Farmacia del propio hospital. En estos casos es muy importante que el producto a administrar sea además lubricante y tenga un cierto efecto adhesivo sobre la sonda para que su acción perdure en el tiempo existiendo siempre un contacto estrecho entre el fármaco y la sonda. La

forma farmacéutica idónea del medicamento a administrar para esta aplicación es la presentación en forma de gel.

- 5 - Tratamiento y prevención de infecciones fúngicas en inmunodeprimidos: Tanto en inmunodepresiones patológicas (SIDA) como iatrogénicas (por antiinflamatorios corticoides, transplantes, etc.) pueden aparecer infecciones en mucosas (boca, vagina, ojos,...) debidas a la microbiota oportunista, especialmente del género *Candida*. Para esta aplicación resultan muy interesantes los geles (si son muy diluidos podrían ser colirios) y las cremas. El uso de estas formulaciones tópicas se hace especialmente idóneo en el caso de 10 infecciones en la cavidad bucal para las que deben usarse compuestos especialmente adhesivos y resistentes al agua para que tengan efectos prolongados.
- 15 - Tratamiento de micosis cutáneas: Las micosis cutáneas se suelen asociar a un deficiente secado y contaminación (agravándose en pacientes inmunodeficientes) en pies y espalda. Un exceso de humedad puede favorecer la aparición de estas infecciones que se suelen tratar secando la zona (talco) y aplicando cremas, pomadas o geles antifúngicos.

En la presente invención se describen formulaciones de anfotericina B para 20 administración por vía tópica en las que tanto el uso en calidad de excipiente de la γ -ciclodextrina, que proporciona un aumento en la solubilidad en medio acuoso de la anfotericina B, como la nueva forma de presentación del medicamento a administrar (gel, crema, pomada o colirio), que facilita el contacto de la misma con el agente infectante, proporcionan como resultado final un aumento en el efecto farmacológico 25 de la anfotericina B. Gracias a este aumento en su efecto farmacológico la anfotericina manifiesta acción antiparasitaria (en concreto, antileishmaniosis) además de la acción antimicótica (cutánea, mucocutánea y superficial) principal indicación para la que se prescribe actualmente la anfotericina B. Además, las formulaciones preparadas en la presente invención presentan un perfil de seguridad drásticamente mejorado con 30 respecto al de cualquiera de las formulaciones de anfotericina B conocidas hasta ahora.

Explicación de la Invención

En primer lugar, se debe tener en cuenta que el uso en esta descripción y en las reivindicaciones de los artículos el/la, un/a/o incluye la referencia al plural a no ser
5 que en el contexto se indique explícitamente lo contrario.

La invención se refiere a nuevas formulaciones farmacéuticas de anfotericina B de administración por vía tópica, así como a su método de preparación y a sus aplicaciones. En dichas formulaciones la anfotericina B se encuentra formando un
10 complejo con ciclodextrina. En concreto, en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención la anfotericina B se encuentra formando un complejo con γ -ciclodextrina.

La formación del complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina aumenta la solubilidad en
15 medio acuoso de la anfotericina B y esto provoca, a su vez, una disminución de la afinidad de la misma por los componentes grasos de las formulaciones farmacéuticas. De esta forma, el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina se liberará de su vehículo con más facilidad y en mayor medida que la anfotericina B sin complejar.

20 A su vez, la γ -ciclodextrina actúa también como promotora de absorción y ejerce una acción adhesiva por lo que favorecerá la penetración y la actividad de la anfotericina B.

Asimismo, la forma de presentación de las formulaciones farmacéuticas de la presente
25 invención, en concreto, gel, crema, pomada y colirio, facilita el contacto del antifúngico con el agente infectante.

La acción combinada de todas las características descritas contribuye al aumento del efecto farmacológico de la anfotericina B gracias al cual ésta manifiesta actividad
30 antiparasitaria (en concreto, antileishmaniosis) además de la acción antimicótica (cutánea, mucocutánea y superficial), principal indicación para la que se prescribe actualmente la anfotericina B.

Otro aspecto importante de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención es que la anfotericina B presenta un estado de agregación monomérico, a diferencia del estado de agregación que suele presentar ésta en las formulaciones farmacéuticas comercializadas hasta el momento, que es el estado dimérico.

Además, las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente invención presentan una estabilidad física y química superior que las formulaciones de anfotericina B comercializadas hasta el momento. Esta estabilidad física y química superior se explica, en parte, por el estado de agregación monomérico que presenta la anfotericina B en las formulaciones de la invención, así como por el hecho de encontrarse formando un complejo con la γ -ciclodextrina.

Tal y como ya se ha comentado, la interacción entre los dos componentes del complejo, anfotericina B y γ -ciclodextrina, tiene como resultado un efecto solubilizante de la anfotericina B en medios acuosos. Dicho efecto se fundamenta en la formación de micelas en una relación molar de anfotericina B: γ -ciclodextrina entre 1:50 y 1:200. Dicho de otra forma, cada molécula de anfotericina B está influenciada por la presencia de entre 50 y 200 moléculas de γ -ciclodextrina a su alrededor.

La presente invención se refiere, en primer lugar, a nuevas formulaciones tópicas de anfotericina B en distintas formas farmacéuticas: gel, crema, pomada y colirio. Estas formulaciones de la invención comprenden un complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina y un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable, y se caracterizan además porque la relación molar entre la anfotericina B y la γ -ciclodextrina está dentro del intervalo entre 1:50 y 1:200 y porque la anfotericina B presenta un estado de agregación monomérico.

En la presente invención, la expresión “un excipiente tópico” se refiere a cualquier componente, o componentes, distinto del principio activo, en este caso anfotericina B, presente en la formulación farmacéutica o utilizado en su fabricación y cuya función

es servir como soporte (vehículo o base) del principio activo y facilitar su fabricación y administración por vía tópica.

5 En la formulación farmacéutica en gel de la invención, el excipiente tópico a usar es un excipiente adecuado para la preparación de geles. Dicho excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre derivados de celulosa, derivados de guar, polímeros vinílicos, polímeros carboxivinílicos, polímeros acrílicos, polímeros naturales, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre metilcelulosa,
10 hidroxipropilcelulosa y copolímeros reticulados de acrilato de alquilo C₁₀₋₃₀.

En la presente invención, la expresión “excipiente adecuado para la preparación de geles” se refiere a cualquier excipiente tópico farmacéuticamente aceptable indicado para la fabricación de formulaciones farmacéuticas en forma de gel.

15

En la formulación farmacéutica en crema de la invención, el excipiente tópico a usar es un excipiente adecuado para la preparación de cremas. Dicho excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre siliconas, derivados de siliconas, bases emulgentes aceite/agua (abreviadamente, O/A) de tipo no iónico, y/o
20 combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre ciclometicona y dimeticona.

En la presente invención, la expresión “excipiente adecuado para la preparación de cremas” se refiere a cualquier excipiente tópico farmacéuticamente aceptable indicado para la fabricación de formulaciones farmacéuticas en forma de crema.

25

En la formulación farmacéutica en pomada de la invención, el excipiente tópico a usar es un excipiente adecuado para la preparación de pomadas. Dicho excipiente adecuado para la preparación de pomadas se selecciona entre un excipiente adhesivo oral, parafina, derivados de parafina, bases agua/aceite (abreviadamente, A/O), cremas
30 agua/aceite (abreviadamente, A/O), y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de pomadas es una mezcla

comprendida por carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina, en una base de polietileno y aceite mineral.

- 5 En la presente invención, la expresión “excipiente adecuado para la preparación de pomadas” se refiere a cualquier excipiente tópico farmacéuticamente aceptable indicado para la fabricación de formulaciones farmacéuticas en forma de pomada.

La formulación farmacéutica en colirio de la invención comprende el complejo de
10 anfotericina B- γ -ciclodextrina disuelto en suero salino o glucosado.

En la presente invención se reivindica también el uso de las formulaciones farmacéuticas descritas para el tratamiento de infecciones fúngicas y/o parasitarias en seres humanos y/o animales. De forma más concreta, las formulaciones farmacéuticas
15 de la invención se pueden usar para el tratamiento de micosis superficiales, cutáneas y mucocutáneas, así como para el tratamiento de leishmaniosis cutánea.

La presente invención se refiere también al método para la preparación de las formulaciones farmacéuticas descritas anteriormente. Este método comprende, en
20 primer lugar, la solubilización de la anfotericina B mediante formación de un complejo con γ -ciclodextrina y, en segundo lugar, la preparación de cada una de las formulaciones farmacéuticas de la invención (gel, crema, pomada y colirio) mediante la adición de un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable a la solución del complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina. En concreto, el método para la preparación
25 de las formulaciones de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- a) se prepara una disolución en medio acuoso de γ -ciclodextrina y se ajusta el pH de dicha disolución hasta un valor entre 11,5 y 14,
- b) a continuación se añade la anfotericina B a la disolución de la etapa (a) en una
30 relación molar anfotericina B: γ -ciclodextrina entre 1:50 y 1:200 y se agita constantemente hasta su completa disolución,
- c) se ajusta el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 4 y 8.

d) se añade un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable a la solución del complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina de la etapa (c).

5 Para la preparación de la formulación farmacéutica en gel de la invención se ha de añadir como excipiente tópico en la etapa (d) del método, un excipiente adecuado para la preparación de geles y, además, se han de añadir las siguientes etapas a continuación de la etapa (d):

Etapa (e): se agita suavemente.

10 Etapa (f): se deja en reposo durante un tiempo comprendido entre un minuto y tres días.

En concreto, el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre derivados de celulosa, derivados de guar, polímeros vinílicos, polímeros carboxivinílicos, polímeros acrílicos, polímeros naturales, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de geles se selecciona entre metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y copolímeros reticulados de acrilato de alquilo C₁₀₋₃₀, tales como Carbopol[®] Ultrez 20 y Carbopol[®] ETD 2020.

20 Para la preparación de la formulación farmacéutica en crema de la invención se ha de añadir como excipiente tópico en la etapa (d) del método, un excipiente adecuado para la preparación de cremas, y además, se ha de añadir la siguiente etapa a continuación de la etapa (d):

Etapa (e): se agita durante un tiempo comprendido entre un minuto y una hora.

25 En concreto, el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre siliconas, derivados de siliconas, bases emulgentes O/A de tipo no iónico, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de cremas se selecciona entre ciclometicona y dimeticona.

30 Para la preparación de la formulación farmacéutica en pomada de la invención se ha de añadir como excipiente tópico en la etapa (d) del método, un excipiente adecuado

para la preparación de pomadas, y además, se han de añadir las siguientes etapas a continuación de la etapa (c) y antes de la etapa (d):

Etapa (c1): se liofiliza el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina de la etapa (c),

Etapa (c2): se pulveriza el liofilizado de la etapa (c1).

5

En concreto, el excipiente adecuado para la preparación de pomadas se selecciona entre un excipiente adhesivo oral, parafina, derivados de parafina, bases A/O, cremas A/O, y/o combinaciones de los mismos. De forma preferida, el excipiente adecuado para la preparación de pomadas es Orabase[®] (mezcla comprendida por
10 carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina, en una base de polietileno y aceite mineral).

Para la preparación de la formulación farmacéutica en colirio de la invención se han de reemplazar las anteriores etapas (a) y (c) por las siguientes nuevas etapas (a') y
15 (c'), respectivamente, añadiéndose además una nueva etapa (c'1) a continuación de la nueva etapa (c'), y omitiéndose la etapa (d):

Etapa (a'): se prepara una disolución de γ -ciclodextrina en medio salino isotónico o en suero glucosado y se ajusta el pH de dicha disolución hasta un valor entre 11,5 y 14,0,

Etapa (c'): se ajusta el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 7,2 y 7,6.

20 Etapa (c'1): se lleva a cabo una filtración esterilizante.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención han demostrado tener una mayor actividad frente a micosis superficiales, cutáneas y mucocutáneas (se probaron
25 11 cepas de levadura diferentes) que la formulación convencional de la anfotericina B (anfotericina B desoxicolato) y que la formulación de anfotericina B disuelta en DMSO.

Adicionalmente, estas formulaciones han demostrado en distintos estudios *in vivo* ser eficaces para su uso contra *Leishmania* (se probaron 6 especies de *Leishmania*
30 diferentes) mostrando, además, un perfil de seguridad mucho mayor que la formulación convencional de anfotericina (anfotericina B desoxicolato) y que la

formulación de anfotericina B disuelta en DMSO, al presentar mucha menos citotoxicidad que dichas formulaciones.

Asimismo, las formulaciones descritas en la presente invención han mostrado una
5 estabilidad física y química marcadamente superior frente a la de la formulación convencional de anfotericina (anfotericina B desoxicolato).

A continuación se ilustra la invención mediante los siguientes ejemplos de
preparación de las nuevas formulaciones farmacéuticas de anfotericina B así como
10 diferentes estudios realizados con el fin de evaluar los resultados concretos de eficacia y toxicidad obtenidos con estas formulaciones. Estos ejemplos son simplemente ilustrativos pero no limitativos del alcance de la invención.

Modo de realización preferido

15

Ejemplo 1. Formación y caracterización de complejos de anfotericina B con γ -ciclodextrina

Para preparar el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina primero se disolvió γ -
20 ciclodextrina en agua. A continuación, se añadió hidróxido sódico 2N para aumentar el pH a 12 y posteriormente se adicionó la anfotericina B con agitación hasta su disolución completa. Una vez disuelta la anfotericina B, se procedió a neutralizar la disolución con ácido fosfórico llevando el pH a 5,5 (valor de pH para la piel). Para determinar las características de la interacción anfotericina B- γ -ciclodextrina se
25 ensayaron distintas cantidades de ambos componentes y, tras filtrar por una membrana de 0,45 μ m, las muestras se analizaron por espectrofotometría a 364 nm. De esta forma, se realizó un diagrama de solubilidad anfotericina B- γ -ciclodextrina a 25°C para lo cual se preparó previamente una disolución de anfotericina B en dimetilsulfóxido con el fin de obtener una recta de calibrado que permitiera la
30 cuantificación de la solubilidad de anfotericina B en presencia de γ -ciclodextrina por comparación con los datos de solubilidad de la anfotericina B en la recta de calibrado. A partir del diagrama de solubilidad hallado se determinó que la relación molar entre

la anfotericina B y la γ -ciclodextrina en el complejo formado y para las condiciones concretas en las que se realizaron los ensayos de solubilidad era de 1:70 (anfotericina B: γ -ciclodextrina) (dicho diagrama de solubilidad se muestra en la figura 1). Al mismo tiempo, la técnica espectrofotométrica permitió también la determinación del estado de agregación (monomérico, dimérico o poliagregado) de la anfotericina B en el complejo formado, ya que se había observado previamente que los picos de máxima absorbancia del espectro de IR de anfotericina B variaban según el estado de agregación de la misma.

10 Mediante un barrido espectrofotométrico de la disolución de anfotericina B en γ -ciclodextrina (AMB- γ -CD) (tanto en medio salino como en medio glucosado) se comprobó que la disposición de la anfotericina B correspondía al estado de agregación monomérico (Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP y Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting. J. Pharm. Sci. 2008: 97, 2405-2425).

15 Asimismo, se analizó el tamaño de las partículas mediante dispersión láser (Zetatrak Ultra, Microtrac Inc.). El tamaño hidrodinámico del complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina resultó ser inferior a 1 nm. Es importante resaltar que con el paso del tiempo (a partir de una semana, en el caso de la disolución de anfotericina B- γ -ciclodextrina en medio salino; y a partir de dos semanas, en el caso de la disolución de anfotericina B- γ -ciclodextrina en medio glucosado) se apreció en el complejo una

20 tendencia a la agregación evidenciada por el aumento del tamaño de partícula (característica que revela la inestabilidad física).

Para finalizar la caracterización, se liofilizó una disolución acuosa del complejo anfotericina B: γ -ciclodextrina en una relación molar 1:70, y el sólido obtenido se analizó por difracción de rayos X, espectrofotometría infrarroja (IR) y calorimetría diferencial de barrido. Los resultados obtenidos tanto mediante difracción de rayos X como mediante calorimetría diferencial de barrido evidenciaban la existencia de un sólido amorfo que difería de la estructura molecular del material de partida,

30 anfotericina B, que es un sólido cristalino.

Se realizó asimismo un estudio comparativo de las distintas formulaciones preparadas, usando como técnica la espectrofotometría infrarroja. La figura 2 muestra el resultado del estudio. Comparando el espectro de IR del liofilizado (complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina) frente al de anfotericina B (mostrados ambos en la Fig. 2), se observó que la región del espectro correspondiente tanto al grupo $-\text{NH}_2$ como al resto $-\text{OH}$ del grupo ácido carboxílico (entre 1000 cm^{-1} y 1500 cm^{-1}) había quedado oculta, lo que sugería que esos grupos de la molécula de anfotericina B podrían haberse modificado durante la formación del complejo. También podía apreciarse un estiramiento de los picos ubicados en la región alrededor de los 1800 cm^{-1} , que corresponde a los grupos $-\text{CH}_3$ y al resto $-\text{CO}$ del grupo ácido carboxílico de la molécula de anfotericina B, y en la región alrededor de 1400 cm^{-1} , que corresponde a los grupos $-\text{OH}$ (grupos alcohol) de la misma, lo que indica la formación de enlaces de hidrógeno. Por lo tanto, los espectros de IR evidenciaron la interacción existente entre la anfotericina B y la ciclodextrina. Dicha interacción tiene como resultado un efecto solubilizante de la anfotericina por formación de micelas en una relación molar de anfotericina B: γ -ciclodextrina de 1:70 tal y como se dedujo anteriormente a partir del diagrama de solubilidad de anfotericina B en presencia de γ -ciclodextrina. Todas las alteraciones observadas en las señales del espectro de IR correspondientes a la fracción de anfotericina y producidas por la formación del complejo anfotericina-ciclodextrina se explican por la influencia de las 70 moléculas de γ -ciclodextrina sobre cada molécula de anfotericina. En vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la conveniencia de añadir un exceso de ciclodextrina para mejorar la estabilidad física del complejo evitando así problemas de agregación, hecho que había sido comprobado experimentalmente con anterioridad por los propios inventores, se estableció como preferida una relación molar (anfotericina B: γ -ciclodextrina) de 1:100. Es importante señalar que, en la práctica, el límite de solubilidad real de la anfotericina B en medio acuoso y a 25°C , es de $2,8\text{ g/l}$ (gramos de anfotericina B por cada litro de la solución formada por anfotericina B y agua).

Ejemplo 2. Preparación de distintas formulaciones farmacéuticas tópicas de anfotericina B y selección de las formulaciones preferidas de la invención

2.A. Preparación de distintas formulaciones farmacéuticas tópicas de anfotericina B

2.A.1. Preparación de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B- γ -ciclodextrina
5 en forma de gel:

En primer lugar, se preparó el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina. Para ello se disolvieron 12,5 gramos de γ -ciclodextrina en aproximadamente 50 ml de agua desionizada. La solución obtenida se llevó a pH 12,0 mediante la adición de hidróxido
10 de sodio 2N, se adicionaron 125 mg de anfotericina B con agitación constante hasta su total disolución y se llevó la solución obtenida a pH 5,5 utilizando ácido fosfórico 2N, para finalmente completar el volumen a 100 ml con agua desionizada.

En segundo lugar, se prepararon distintas formulaciones en gel utilizando los
15 siguientes agentes gelificantes:

- Hidroxipropilcelulosa Tipo H (Hypromelosa)
- Carbopol[®] ETD 2020
- Carbopol[®] Ultrez 20
- 20 - Metilcelulosa (Metolosa 1500)

- Respecto a los geles derivados de celulosa: Se prepararon geles con hidroxipropilcelulosa al 3% en peso (p/p) y con metilcelulosa al 2% p/p. Para ello, se adicionó el agente gelificante a la solución del complejo anfotericina B con γ -
25 ciclodextrina, agitando de forma suave para no generar burbujas, y la mezcla se dejó en reposo durante 24 horas para su completa homogenización.

- Respecto a los geles con Carbopol[®] (derivados acrílicos): Se prepararon geles utilizando dos agentes gelificantes distintos, Carbopol[®] ETD 2020 y Carbopol[®] Ultrez
30 20. Para ello, se añadió en cada caso el agente gelificante a una concentración del 1% p/p, se dispersó en la solución del complejo anfotericina B con γ -ciclodextrina, y se ajustó el pH a un valor de 5,5 con trietanolamina.

2.A.2. Preparación de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B- γ -ciclodextrina en forma de crema:

5 Se ensayó una formulación en crema utilizando una mezcla de siliconas, concretamente Dow Corning 3225C (15% p/p) y ciclometicona (15% p/p). Se prepararon 100 gramos de formulación en crema de la siguiente manera:

En primer lugar se preparó el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina. Para ello, en un
10 vaso de precipitados, se disolvió la γ -ciclodextrina en aproximadamente 40 ml de agua y se añadieron gotas de una solución de hidróxido de sodio 2 N hasta ajustar el valor del pH de la disolución a 12,0. Manteniendo la agitación constante, se agregó la anfotericina B y se continuó con la agitación hasta total disolución. Se añadieron unas
15 gotas de una solución de ácido fosfórico 2N hasta llevar a pH 5,5. Esta solución se completó con agua hasta un volumen de 70 ml, disolviendo previamente en ella 1 gramo de cloruro sódico.

En segundo lugar, se preparó la formulación farmacéutica en crema. Para ello, en otro vaso de precipitados se mezclaron 15 ml de ciclometicona y 15 ml de Dow Corning
20 3225C y se agitaron utilizando un homogenizador Ultra Turrax. A esta mezcla se adicionó poco a poco y manteniendo la agitación, la solución preparada en primer lugar que contenía el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina, y se continuó con la agitación, hasta conseguir la consistencia deseada.

25 2.A.3. Preparación de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B- γ -ciclodextrina en forma de pomada:

Se preparó una formulación en forma de pomada empleando el excipiente adhesivo oral Orabase[®]. Esta base adhesiva está constituida por carboximetilcelulosa sódica,
30 pectina, gelatina y una mezcla de parafina líquida y polietileno. Se escogió este excipiente en concreto para la preparación de la pomada de la invención debido a sus propiedades adherentes y a su efecto protector en lesiones de la piel.

En primer lugar, se preparó el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina siguiendo el procedimiento de preparación del mismo detallado en el apartado 1 de este ejemplo.

5 En segundo lugar, se liofilizó el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina resultante a fin de eliminar el agua de dicho complejo. El liofilizado resultante, previamente pulverizado en un mortero, se mezcló con la base adhesiva hasta su completa homogenización sin grumos.

10 2.A.4. Preparación de formulaciones farmacéuticas de anfotericina B- γ -ciclodextrina en forma de colirio:

Se elaboró una formulación de anfotericina B- γ -ciclodextrina en forma de colirio. Para ello se preparó en primer lugar, al igual que para todas las formulaciones de la
15 invención, el complejo anfotericina B con γ -ciclodextrina. Sin embargo, para esta formulación farmacéutica en particular, la preparación del complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina presenta varias diferencias respecto al resto de formulaciones de la invención. Se disolvieron 14,375 gramos de γ -ciclodextrina en aproximadamente 50 ml de, o bien una solución salina fisiológica estéril, o bien una solución estéril de
20 dextrosa al 5% p/v. La solución obtenida se llevó a pH 12,0 con hidróxido de sodio 2N, se adicionaron 143,75 mg de anfotericina B con agitación constante hasta su total disolución y se llevó la solución obtenida a pH 7,4 utilizando ácido ortofosfórico 2N para finalmente completar el volumen hasta 100 ml con, o bien la solución salina fisiológica estéril, o bien la solución estéril de dextrosa al 5% p/v, según la solución
25 que se usara al principio. Posteriormente, se realizó una filtración esterilizante con un filtro de 0,22 μ m de acetato de celulosa Minisart NML[®] Sartorius. A la hora de calcular la cantidad de cada uno de los reactivos de partida (anfotericina B y γ -ciclodextrina) necesaria para la preparación de la formulación en colirio de la invención, se tuvo en cuenta que un 15% de la formulación final queda retenido en el
30 filtro.

2.B. Caracterización de las distintas formulaciones preparadas, comparación de las mismas en términos de actividad antifúngica y selección de las formulaciones preferidas de la invención

- 5 Se determinó la viscosidad de cada una de las formulaciones anteriores así como el estado de agregación de anfotericina B en cada formulación, y se evaluó el efecto *in vitro* de las distintas formulaciones sobre *Candida albicans* mediante antifungigrama por difusión.
- 10 La viscosidad varió según la formulación entre 50 y 4000 cps (Brookfield DV-III, aguja CP41, entre 5 y 25 rpm y $20 \pm 2^\circ\text{C}$). El estado de agregación se mantuvo como monomérico en todas las formulaciones menos en la formulación en gel con hidroxipropilcelulosa que varió a poliagregado. Por otra parte, en el análisis por espectrofotometría de las formulaciones en gel con Carbopol[®] se apreció un descenso
- 15 en absorbancias con respecto a la formulación en gel con metilcelulosa lo que puede ser indicativo de una deficiente liberación de la anfotericina B.

Para el estudio de sensibilidad se utilizó como medio de cultivo agar Mueller Hinton (MHA) suplementado con 2 % p/v de glucosa y 0,5 µg/ml de azul de metileno. Se

20 prepararon soluciones de anfotericina B en dimetilsulfóxido a las concentraciones de 600; 240; 96; 38,4 y 15,4 µg/ml. Las muestras del gel, crema y colirio de anfotericina B se disolvieron/dispersaron inicialmente en agua y luego en tampón fosfato 0,2 M pH 10,5 a una concentración de 96 µg/ml. Los discos de papel para ensayo se

25 impregnaron con 20 µl de cada solución estándar y de muestra, se dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguidamente fueron colocados en las placas de cultivo que contenían MHA y se inocularon con la suspensión del hongo (*C. albicans 1394*). Tras ser mantenidas en refrigeración a 5°C durante 2 horas, las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas, para medir posteriormente los halos de inhibición.

Formulación	Halo de inhibición en mm
AMB en DMSO	24,9 ± 0,1
AMB desoxicolato	22,5 ± 0,1
AMB-γ-CD (gel) con metilcelulosa	24,8 ± 0,2
AMB-γ-CD (gel) con hidroxipropilcelulosa	12,6 ± 0,3
AMB-γ-CD (gel) con Carbopol® ETD 2020	18,1 ± 0,1
AMB-γ-CD (gel) con Carbopol® Ultrez 20	18,7 ± 0,1
AMB-γ-CD (crema) con siliconas	26,4 ± 0,2
AMB-γ-CD (colirio)	27,0 ± 0,3

Tabla 1. Resultados de actividad de las distintas formulaciones estudiadas en relación con anfotericina B disuelta en DMSO (AMB en DMSO) y anfotericina B desoxicolato (AMB desoxicolato).

5

Se descartaron las formulaciones con hidroxipropilcelulosa y con Carbopol® al demostrar una actividad fungicida inferior. Consecuentemente, se seleccionó la formulación en gel con metilcelulosa como la formulación en gel preferida de la invención. También se estudió el posible efecto de la viscosidad del gel en la sensibilidad. Para ello se prepararon geles de metilcelulosa con concentraciones al 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 y 4,0 % p/p y con viscosidades crecientes desde 330 cps hasta 3500 cps. La actividad antimicrobiana de todas ellas fue similar, por lo que se eligió una concentración de metilcelulosa al 3% p/p como la más adecuada por su viscosidad (1520-2470 cps).

15

Ejemplo 3. Estudio de la actividad antifúngica de las formulaciones de la invención

20

Siguiendo el método de preparación de la formulación farmacéutica en gel de la invención descrito en el ejemplo 2, se preparó la formulación farmacéutica en gel de anfotericina B-γ-ciclodextrina seleccionada como preferida en el ejemplo anterior.

Para ello, se usaron las siguientes cantidades de los distintos reactivos, excipientes y disolventes: anfotericina B (0,125 g), γ -ciclodextrina (12,5 g), metilcelulosa (3 g), pequeñas cantidades de NaOH, ácido ortofosfórico para ajustar el pH a un valor dentro del intervalo 5,5-5,7, y agua c.s.p. (cantidad suficiente para) 100. Se analizó la actividad antifúngica de esta formulación bajo diversas condiciones.

3.1. Actividad frente a distintas cepas de hongos y comparación de resultados con un control comercial (Neosensitabs[®], Rosco, Dinamarca)

10 Para este estudio se utilizaron discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs[®] que contenían 10 μ g de anfotericina B. Por otra parte, se prepararon soluciones control de anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido a las concentraciones de 600 y 96 μ g de anfotericina B por mililitro de solución, con el fin de que los discos cargados con 20 μ l de esta solución incorporaran 12 y 1,92 μ g de anfotericina B por disco. Asimismo,

15 para la formulación en gel de la invención se prepararon cuatro concentraciones en solución tampón fosfato (0,2 M pH 10,5) adecuadas para obtener discos con 0,96; 1,92; 5 y 10 μ g de anfotericina B por disco, respectivamente. El medio de cultivo empleado fue MHA suplementado con 2 % p/v de glucosa y 0,5 μ g/ml de azul de metileno. Este agar fundido a temperatura de 50°C fue inoculado con 3 ml de una

20 suspensión del hongo (se utilizaron varias cepas de levadura, véase Fig. 3), previamente ajustada a una absorbancia de 0,1 a 600 nm, en solución salina fisiológica (NaCl 0,9 % p/v). Dicha suspensión del hongo se había preparado a partir de cultivos de la levadura en agar Sabouraud dextrosa incubados durante 72 horas a 30°C.

25 Se impregnaron discos para ensayo con 20 μ l de cada una de las soluciones de control y de cada una de las soluciones de la formulación en gel de la invención, se dejaron secar durante 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente se depositaron sobre las placas de MHA que contenían la suspensión del hongo. En estas mismas placas de cultivo se colocaron también discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs[®]. Estas

30 placas se refrigeraron a 5°C durante 2 h y luego se incubaron a 30°C durante 48 h. Los resultados obtenidos al medir los halos de inhibición se muestran en la figura 3.

Los resultados de este ensayo comparativo, muestran que 10 µg de anfotericina B de la formulación en gel de la invención provocan una inhibición mayor que la producida por la misma cantidad del antifúngico en los discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs®. Este resultado resulta sorprendente ya el DMSO se considera promotor de la absorción al igual que la ciclodextrina y, por otra parte, la anfotericina B disuelta en DMSO se presenta en forma monomérica exactamente igual que como ocurre en el caso de la formulación de anfotericina en gel de la invención. Caben varias posibles explicaciones a estos resultados, entre ellas, la posibilidad de que el gel retenga en las proximidades mayores concentraciones de anfotericina B siendo así el efecto dilución menor que con el DMSO, y/o una mayor estabilidad física y/o química de la anfotericina en la formulación en gel colocada en el disco en comparación con la formulación disuelta en DMSO, y/o una mejor difusión de la anfotericina B a través del agar.

3.2. Ensayo de sensibilidad

Este ensayo se realizó en las mismas condiciones que el experimento descrito en el apartado 2.B. para caracterizar todas las formulaciones de anfotericina B preparadas anteriormente en el apartado 2.A.. En la tabla 2 se muestra el promedio de las medidas de los halos de inhibición (en mm) obtenidos con cada una de las soluciones control de anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido preparadas (solución estándar 1 (S1) (600 µg/ml), solución estándar 2 (S2) (240 µg/ml), solución estándar 3 (S3) (96 µg/ml), solución estándar 4 (S4) (38,4 µg/ml) y solución estándar 5 (S5) (15,4 µg/ml)) y con la solución de la formulación en gel de la invención (solución de muestra (M) (96 µg/ml)) para cada cepa estudiada junto con su desviación estándar correspondiente. No se obtuvo halo de inhibición, para ninguna de las cepas estudiadas, ni al usar discos impregnados con el placebo de la formulación (formulación en gel sin anfotericina B), ni con discos únicamente tratados con el medio tamponado o con DMSO. En la presente invención se entiende por placebo de la formulación, aquella formulación que no contiene el principio activo (en este caso, anfotericina B) pero cuya preparación y composición es igual a la de la formulación de la invención).

Aplicando un análisis de datos mediante la prueba t-Student a los resultados obtenidos tanto con la formulación de anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido como con la formulación en gel de la invención, se determinó que los datos para la formulación en gel de la invención eran estadísticamente diferentes ($p < 0,05$) a los datos de la anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido (las diferencias entre los valores de ambos eran estadísticamente significativas), ya que en todas las cepas estudiadas el valor t obtenido fue menor que el valor t tabulado, con lo que se anula la hipótesis de que las medias de los dos grupos de muestras son iguales.

CEPA	Anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido ($\mu\text{g/ml}$)					Formulación en gel de la invención ($\mu\text{g/ml}$)
	S1 600	S2 240	S3 96	S4 38,4	S5 15,4	M 96
1. <i>C. albicans</i> CECT 1394	29,1 \pm 0,1	27,3 \pm 0,1	25,9 \pm 0,2	24,5 \pm 0,1	22,4 \pm 0,3	29,4 \pm 0,2
2. <i>C. dubliniensis</i> 63341	27,7 \pm 0,2	26,3 \pm 0,2	25,3 \pm 0,2	23,6 \pm 0,1	22,3 \pm 0,2	27,1 \pm 0,3
3. <i>C. glabrata</i> 60661	20,2 \pm 0,5	17,8 \pm 0,7	16,5 \pm 0,2	15,3 \pm 0,2	13,2 \pm 0,1	17,5 \pm 0,2
4. <i>C. glabrata</i> 60750	22,1 \pm 0,2	19,7 \pm 0,4	18,1 \pm 0,2	15,8 \pm 0,4	13,6 \pm 0,2	20,6 \pm 0,3
5. <i>C. guilliermondii</i> 62863	16,5 \pm 0,5	15,2 \pm 0,1	13,3 \pm 0,4	11,4 \pm 0,4	10,0 \pm 0,3	16,3 \pm 0,3
6. <i>C. krusei</i> 52009	12,2 \pm 0,1	11,2 \pm 0,1	9,5 \pm 0,2	7,9 \pm 0,2	-	10,4 \pm 0,4
7. <i>C. krusei</i> 52011	12,4 \pm 0,4	10,9 \pm 0,6	9,6 \pm 0,3	8,9 \pm 0,1	-	10,9 \pm 0,1
8. <i>C. krusei</i> 55574	16,5 \pm 0,3	14,3 \pm 0,2	12,4 \pm 0,3	10,2 \pm 0,1	8,9 \pm 0,3	15,1 \pm 0,2
9. <i>C. parapsilosis</i> 57744	18,3 \pm 0,1	16,4 \pm 0,2	14,3 \pm 0,2	13,6 \pm 0,1	12,0 \pm 0,1	17,9 \pm 0,1
10. <i>Saccharomyces</i> 61978	19,2 \pm 0,1	17,3 \pm 0,2	15,6 \pm 0,2	13,8 \pm 0,2	12,0 \pm 0,1	19,1 \pm 0,4
11. <i>Trichosporon</i> sp. 61978	20,4 \pm 0,3	18,5 \pm 0,1	17,3 \pm 0,2	14,6 \pm 0,1	12,2 \pm 0,1	21,7 \pm 0,2

10

Tabla 2. Medida en mm del diámetro de los halos de inhibición, con su correspondiente desviación estándar, obtenidos en el ensayo de sensibilidad de diferentes cepas frente a anfotericina B. Como criterio para determinar la sensibilidad se estima que halos superiores a 15 mm corresponden a cepas sensibles, menores de 10 mm a cepas resistentes, y entre 10 y 14 a cepas intermedias.

15

3.3. Ensayo de inhibición de crecimiento de levadura sobre membrana

Para realizar este ensayo se preparó un preinóculo en 50 ml de medio mínimo YNB (base nitrogenada de levadura) con galactosa 50 mM y se incubó a 37 °C durante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos y luego se lavó dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Las células fueron finalmente suspendidas en PBS hasta una absorbancia de 0,2 a 600 nm.

Se prepararon soluciones de la formulación en gel de la invención a las siguientes concentraciones: 25, 50, 75, 150, 300, 450 y 600 µg/ml. Con estas soluciones se impregnaron membranas estériles de celulosa (Millipore) de 0,22 µm de diámetro de poro (6 membranas para cada una de las 11 cepas) durante un tiempo aproximado de 10 segundos. Posteriormente estas membranas se lavaron. Un primer grupo de ellas (3 de esas 6 membranas, para cada cepa) se enjuagaron tres veces consecutivas con una solución de PBS, mientras que un segundo grupo (las otras 3 membranas restantes) se sumergieron durante 1 hora también en PBS. Todas las membranas se dejaron secar durante 20 minutos a 37°C antes de ser inoculadas.

Se prepararon placas con agar Sabouraud dextrosa con galactosa 500 mM y sobre cada una de ellas se colocó una de las membranas que estuvieron en contacto con la formulación en gel de la invención. Se depositaron 50 µl de la suspensión en PBS del microorganismo en estudio sobre cada una de las membranas y se extendió esta suspensión por toda la membrana. Se secaron las placas a 37°C durante 1 hora para secar el inóculo y posteriormente se invirtieron las placas y se incubaron durante 48 horas más, reubicando la membrana dentro de la placa cada 10 ó 12 horas.

Se realizó el ensayo por triplicado para cada concentración (se usaron tres membranas para cada condición de ensayo) y además se prepararon placas control con membranas sin anfotericina B.

En la tabla 3 pueden observarse al detalle los resultados por triplicado de este ensayo. Para cada cepa, la primera fila de resultados corresponde a las membranas lavadas tres

veces con PBS (fila A), y la segunda fila a las membranas que se dejaron sumergidas durante una hora después de aplicar la formulación (fila B).

En este ensayo, los resultados obtenidos difieren entre sí dependiendo de la metodología utilizada y de la cepa empleada. Así, se visualizó un mayor crecimiento de todas las cepas ensayadas cuando la membrana inoculada con la formulación se dejaba en remojo durante una hora en PBS que cuando la membrana se lavaba tres veces consecutivas con esta misma solución. En concreto, el crecimiento de la especie *Candida krusei* fue mayor que el de las otras, lo que pone de manifiesto la mayor resistencia de esta especie frente a anfotericina B.

CEPA		CONTROL	CONCENTRACIÓN DE ANFOTERICINA B (µg/ml)						
			25	50	75	150	300	450	600
<i>C. albicans</i> 1394	A	+ + +	- ± -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
	B		- ± ±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
<i>C. dublin.</i> 63341	A	+ + +	+ + +	+ + ±	- - ±	- - -	- - -	- - -	- - -
	B		+ + +	+ + +	+ + +	+ + ±	- - -	- - -	- - -
<i>C. glabr.</i> 60661	A	+ + +	+ + +	+ + ±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
	B		+ + +	+ + ±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
<i>C. glabr.</i> 60750	A	+ + +	+ + +	+ + ±	± ± ±	± - -	- - -	- - -	- - -
	B		+ + +	+ + +	+ + +	- - ±	- - -	- - -	- - -
<i>C. guillier.</i> 62863	A	+ + +	+ + +	+ + ±	- - ±	- - -	- - -	- - -	- - -
	B		+ + +	+ + ±	+ + +	+ + ±	- - -	- - -	- - -
<i>C. krusei</i> 52009	A	+ + +	+ + +	+ + +	+ + ±	- - ±	- ± ±	- - ±	- - -
	B		+ + +	+ + +	+ + +	+ + ±	- ± ±	- ± ±	- - ±
<i>C. krusei</i> 52011	A	+ + +	+ + +	+ + +	+ + ±	± ± ±	- - -	- - -	- - -
	B		+ + +	+ ± ±	+ ± ±	± ± ±	- - -	- - -	- - -
<i>C. krusei</i> 55574	A	+ + +	+ + +	- - ±	- - -	- - -	- - -	- - -	- - -
	B		+ + +	± ± ±	- ± ±	- - ±	- - ±	- - ±	- - -
<i>C. paraps.</i> 57744	A	+ + +	+ + +	+ ± ±	- - ±	- - -	- - -	- - -	- - -
	B		+ + +	+ + +	+ + ±	± ± ±	- - -	- - -	- - -
<i>Sacchar.</i>	A	+ + +	+ + +	± ± ±	± ± ±	± ± ±	- - -	- - -	- - -

61978	B		+++	+++	++±	±±±	---	---	---
Trichosp. 61978	A	+++	+++	++±	---	---	---	---	---
	B		+++	+++	++±	---	---	---	---

Tabla 3. Inhibición de la formación de biopelículas.

(+) : crecimiento en toda la membrana, (±) : crecimiento en parte de la membrana, (-) : membrana sin crecimiento. A: membranas lavadas tres veces con PBS; B: membranas que se dejaron sumergidas durante una hora después de aplicar la formulación.

5

3.4. Ensayo de penetración de anfotericina B en biopelículas fúngicas

Para realizar este ensayo se prepararon preinóculos de cada una de las cepas en estudio en 50 ml de medio mínimo YNB con galactosa 50 mM, siguiendo el mismo procedimiento usado para el ensayo de inhibición de crecimiento de levadura sobre membrana (punto anterior 3.3.), y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Los cultivos obtenidos se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos, posteriormente se lavaron dos veces con PBS y con las células obtenidas se preparó una suspensión en PBS y se ajustó hasta una absorbancia de 0,2 medida a 600 nm.

15

Para obtener las biopelículas se prepararon placas con agar Sabouraud dextrosa al que se adicionó galactosa 500 mM. Sobre cada una de las placas se colocó una membrana estéril de polipropileno de 0,22 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro que se inoculó con 50 µl de la suspensión en PBS. Las placas se secaron a 37°C durante 1 hora, y posteriormente se invirtieron e incubaron durante 48 horas más, reubicando la membrana dentro de la placa cada 10 ó 12 horas.

20

Para la incorporación de anfotericina B: Se preparó agar YNB con galactosa 500 mM, se esterilizó en autoclave y, antes de solidificar, se dividió en 6 porciones adicionándose a las mismas anfotericina B, en dos formas distintas, por un lado, la formulación de anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido y, por otro, la formulación en gel de la invención, para obtener placas, por duplicado (es decir, para cada una de las dos formulaciones), con las siguientes concentraciones en ambos casos: 150, 300 y 600 µg/ml. Las placas de agar YNB con galactosa a las que se les ha incorporado anfotericina B constituyen la capa A de la biopelícula de ensayo (véase la Fig. 4).

30

Sobre las placas de agar YNB con galactosa y anfotericina B se colocaron las membranas con o sin la biopelícula del microorganismo objeto de evaluación. Como controles se utilizaron los duplicados de cada placa en los que se habían dispuesto membranas estériles utilizando para ello membranas de exactamente las mismas características, 0,22 μm de diámetro de poro y 47 mm de diámetro, pero en esta
5 ocasión sin biopelícula. Estas membranas constituyen la capa B de la biopelícula de ensayo (véase la Fig. 4).

Sobre esta membrana, se dispone una nueva membrana que sirve de separación por
10 contacto directo. En esta ocasión, se trata de una membrana de 0,22 μm de diámetro de poro y 25 mm de diámetro. Esta nueva membrana constituye la capa C de la biopelícula de ensayo (véase la Fig. 4).

Sobre esta última membrana se colocaron discos para ensayo de 6 mm de diámetro
15 impregnados con 20 μl de PBS. Estos discos constituyen la capa D de la biopelícula de ensayo (véase la Fig. 4). Este sistema se incubó a 37°C durante 4 horas (Fig. 4). A lo largo del experimento estos discos, inicialmente sólo impregnados con PBS, fueron absorbiendo (en los casos donde procedía) anfotericina B conforme ésta se difundía, consiguiendo así progresivamente actividad antifúngica gracias precisamente a esa
20 absorción de anfotericina B.

Para determinar el grado de penetración de anfotericina B a través de la biopelícula
fúngica, los discos descritos anteriormente como capa D, fueron depositados sobre
placas de agar Mueller Hinton inoculado con una suspensión de *Candida albicans*
25 como microorganismo de referencia, de igual manera que para la determinación microbiológica de la sensibilidad frente a anfotericina B (apartado 3.2.). Se incubaron las placas a 30°C durante 48 horas y se midieron los halos de inhibición obtenidos (Samaranayake, Y. H., Ye, J., Yau, J. Y. Y., Cheung, B. P. K. and Samaranayake, L.P. In vitro method to study antifungal perfusion in Candida biofilms. Journal of
30 Clinical Microbiology. Feb. 2005: 818-825; Al-Fattani, M. A. and Douglas, L. J. Penetration of Candida biofilm by antifungal agents. Antimicrobial agents and chemotherapy. Sep. 2004, Vol. 48, No. 9: 3291-3297). Los resultados se muestran en

la tabla 4. Observando las medidas de los halos de inhibición que se obtuvieron con el control, es decir, con la membrana sin biopelícula fúngica, se aprecian claramente las diferencias respecto a la cantidad de anfotericina B que pudo llegar hasta los discos colocados sobre la última membrana y que inicialmente sólo estaban impregnados con PBS. Al igual que en los ensayos anteriores, la formulación en gel de la invención se caracteriza por una gran capacidad de penetración.

CEPA	MEDIDAS DE HALOS DE INHIBICIÓN EN mm					
	AMB EN DIMETILSULFÓXIDO			FORMULACIÓN EN GEL DE LA INVENCIÓN		
	150 ug/ml	300 ug/ml	600 ug/ml	150 ug/ml	300 ug/ml	600 ug/ml
1 <i>C. albicans 1394</i>	0	0	11,3 ± 0,56	29,9 ± 0,40	34,3 ± 0,20	38,6 ± 0,36
2 <i>C. dublin. 63341</i>	0	0	0	24,2 ± 0,66	29,2 ± 0,21	31,6 ± 0,40
3 <i>C. glabrata 60661</i>	0,0	2,0 ± 4,08	11,3 ± 0,71	23,9 ± 0,40	28,1 ± 1,40	31,6 ± 0,16
4 <i>C. glabrata 60750</i>	0	0	0	21,6 ± 0,18	28,3 ± 0,37	30,9 ± 0,16
5 <i>C. guillier. 62863</i>	9,5 ± 0,44	13,5 ± 0,16	17,4 ± 0,34	29,2 ± 0,09	31,7 ± 0,12	34,6 ± 0,22
6 <i>C. krusei 52009</i>	0	0	0	23,7 ± 0,22	28,4 ± 0,15	31,5 ± 0,42
7 <i>C. krusei 52011</i>	0	0	8,5 ± 0,30	26,4 ± 0,23	31,7 ± 0,20	35,3 ± 0,11
8 <i>C. krusei 55574</i>	0	0	7,5 ± 0,39	26,1 ± 0,10	30,5 ± 0,16	32,5 ± 0,08
9 <i>C. paraps. 57744</i>	0	0	10,7 ± 0,76	27,7 ± 0,44	29,4 ± 0,30	31,7 ± 0,09
10 <i>Sacchar. 61978</i>	0	0	2,1 ± 4,15	14,7 ± 0,25	30,4 ± 0,21	33,3 ± 0,24
11 <i>Trichosp. 61978</i>	0	2,3 ± 4,55	6,2 ± 7,20	24,4 ± 0,21	29,3 ± 0,20	33,2 ± 0,20
12 <i>Control</i>	12,5 ± 1,41	16,6 ± 1,77	18,8 ± 1,71	28,3 ± 1,84	31,6 ± 1,83	34,3 ± 1,55

Tabla 4. Penetración de anfotericina B en biopelículas fúngicas.

3.5. Determinación de la capacidad fungicida de anfotericina B en la biopelícula fúngica

Para realizar este ensayo se preparó un conjunto de tubos de ensayo estériles conteniendo 5 ml de PBS cada uno, tres tubos para el control y tres para cada concentración a evaluar (150, 300 y 600 µg/ml). De cada cepa se usaron las placas con

las membranas que se evaluaron en el ensayo de penetración de biopelículas (ensayo 3.4) y su correspondiente control. Utilizando el asa de siembra se tomó de cada membrana una fracción de colonias en un área de 2 mm² y se dispersaron en uno de los tubos con PBS utilizando un agitador vortex. De esta suspensión se prepararon diluciones para inocular placas de YED (Yeast-Extract Dextrose Medium, Extracto de levadura + dextrosa), y una vez inoculadas las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas con el fin de determinar la proporción de células viables de la biopelícula tras el tratamiento con anfotericina B.

10 Se obtuvieron diferentes resultados dependiendo de la cepa estudiada, de tal manera que las biopelículas de las siguientes cepas:

- *C. albicans* 1394

- *C. glabrata* 60661

- *C. parapsilosis* 57744

15 - *Saccharomyces* 61978

- *Trichosporon* 61978,

mostraron una mayor susceptibilidad frente a la formulación en gel de la invención que frente a la formulación de anfotericina disuelta en DMSO. El resto de las cepas, sin embargo, no mostraron diferencias significativas entre la viabilidad de las biopelículas expuestas a la formulación de anfotericina disuelta en DMSO con respecto a la formulación en gel de la invención.

En la tabla 5 puede visualizarse de forma detallada el número de colonias obtenidas para cada especie por mm² de biopelícula expuesta a la acción del antifúngico.

CEPA		UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)						
		AMB EN DIMETILSULFÓXIDO			FORMULACIÓN EN GEL DE LA INVENCION			CONTROL
		150 ug/ml	300 ug/ml	600 ug/ml	150 ug/ml	300 ug/ml	600 ug/ml	
1	<i>C. albicans</i> 1394	10000	8000	6500	180	4000	120	375000

2	<i>C. dublin. 63341</i>	15000	12500	80	12000	220	100	112500
3	<i>C. glabrata 60661</i>	6000	5000	3000	0	29	14	300000
4	<i>C. glabrata 60750</i>	5000	15000	18000	6000	8000	6500	250000
5	<i>C. guillier. 62863</i>	9000	750	1250	12500	600	320	15000
6	<i>C. krusei 52009</i>	45000	10000	6000	8000	7000	6000	175000
7	<i>C. krusei 52011</i>	200000	150000	35000	150000	8000	7000	200000
8	<i>C. krusei 55574</i>	9000	7500	6000	10000	7000	6000	175000
9	<i>C. paraps. 57744</i>	7500	5000	4000	6000	25000	150	2500
10	<i>Sacchar. 61978</i>	225000	10000	4300	10000	6000	120	20000
11	<i>Trichosp. 61978</i>	4000	400	10	400	50	120	200000

Tabla 5. Viabilidad de las biopelículas expuestas a un medio con anfotericina B. Se muestra el número de unidades formadoras de colonias por mm² de biopelícula obtenidas después de exponer la membrana con la biopelícula del microorganismo a anfotericina B disuelta en dimetilsulfóxido en comparación con la formulación en gel de la invención.

5

3.6. Comparación de eficacia contra la micosis cutánea entre la formulación en gel de la invención y clotrimazol en crema

Considerando que la formulación en crema de clotrimazol es actualmente el producto de primera elección en el tratamiento de micosis cutáneas, se realizó un ensayo de sensibilidad comparativo, utilizando *C. albicans* como microorganismo de referencia, entre clotrimazol en crema y la formulación en gel de la invención. Para ello se prepararon diluciones de anfotericina B en dimetilsulfóxido a las concentraciones de 600; 240; 96; 38,4 y 15,4 µg/ml, al igual que en los estudios anteriores, mientras que la formulación en gel de la invención, por su parte, se diluyó hasta una concentración de 60 µg/ml. Con la crema de clotrimazol se prepararon cuatro diluciones de clotrimazol en dimetilsulfóxido, de 96; 192; 480 y 960 µg/ml, considerando que la concentración teórica del antifúngico en la crema es del 1% p/p. Se inocularon discos para ensayo con las soluciones preparadas y se dispusieron sobre las placas de MHA que contenía la suspensión de *C. albicans*. Se incubaron las placas durante 48 horas a 30°C y se midieron los halos de inhibición.

15
20

Los resultados obtenidos muestran notables diferencias entre las dos formulaciones en estudio. Con la crema de clotrimazol, a diferencia de la formulación en gel de la

invención, únicamente se obtuvieron halos de inhibición claramente definidos con la concentración más alta (960 µg/ml). En la tabla 6 pueden observarse al detalle los resultados de este ensayo. A partir de los resultados obtenidos se observa que una concentración de 60 µg/ml de anfotericina B en la formulación en gel de la invención, da lugar a un halo de inhibición similar al que forma una concentración de 960 µg/ml de clotrimazol en la formulación de crema.

FORMULACIÓN	CONCENTRACION	HALO DE INHIBICIÓN (mm)
Anfotericina B en DMSO	15,4 µg /ml	24,3 ± 0,18
	38,4 µg /ml	27,5 ± 0,40
	96 µg /ml	28,6 ± 0,43
	240 µg /ml	30,6 ± 0,30
	600 µg/ml	32,3 ± 0,29
Formulación en gel de la invención	60 µg /ml	28,2 ± 0,29
Clotrimazol en crema	96 µg /ml	0
	192 µg /ml	0
	480 µg /ml	0
	960 µg /ml	29,2 ± 0,53

10 Tabla 6. Sensibilidad de *C. albicans* frente a la formulación de AMB disuelta en DMSO, formulación en gel de la invención y clotrimazol en crema.

Con el fin de comprobar que la concentración de clotrimazol se corresponde con la teórica (1% p/p), se extrajo el clotrimazol a partir de la crema, usando DMSO, se impregnaron discos para ensayo y se comparó su actividad frente al disco patrón de clotrimazol Neo Sensitabs® el cual contiene 10 µg de clotrimazol. El diámetro de los halos observados fue el mismo en ambos casos. Adicionalmente, se prepararon diluciones con la formulación en gel de la invención a la misma concentración de 10 µg y se ensayaron conjuntamente con sus respectivos discos patrón de anfotericina B Neo Sensitabs®. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Es importante mencionar el hecho de que los halos de inhibición obtenidos con el clotrimazol, tanto en los discos impregnados con clotrimazol procedente de la formulación en crema

como en los discos patrón de clotrimazol Neo Sensitabs[®], no son tan claramente definidos como los que se obtienen con la anfotericina B.

5

Halo de inhibición (mm)	
Anfotericina B en DMSO	26,9 ± 0,1
Formulación en gel de la invención	34,4 ± 0,1
Disco AMB Neo Sensitabs [®]	23,2 ± 0,4
Clotrimazol en crema	21,5 ± 0,5
Disco Clotrimazol Neo Sensitabs [®]	21,4 ± 0,5

10

Tabla 7. Sensibilidad comparativa de *C. albicans* frente a clotrimazol, tanto en la formulación en crema como en discos clotrimazol Neo Sensitabs[®], y a anfotericina B, tanto la formulación en gel de la invención como AMB disuelta en DMSO. La concentración en todos los preparados y los discos Neo Sensitabs[®] fue de 10 µg de antifúngico por disco.

15 **Ejemplo 4. Actividad antileishmania, citotoxicidad y seguridad de uso**

En primer lugar, se determinó la actividad antiparasitaria de la formulación en gel de la invención, gel de anfotericina B- γ -ciclodextrina en metilcelulosa (3% p/p), en distintas especies de *Leishmania*, y se comparó con la de una formulación que contenía únicamente el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina pero sin agente gelificante y con la de anfotericina B desoxicolato. Los promastigotes de distintas cepas fueron mantenidos mediante cultivos *in vitro* en 20 ml de medio de cultivo Schneider Drosophila (Sigma), en frascos de cultivo con tapas que permitían el intercambio aéreo (tissue Culture Flask 25 cm² SARTED). Los frascos se incubaron en posición horizontal en estufa de incubación a 26°C. Se hicieron pases periódicos cada 7 días y para su conservación se congelaron 1x10⁷ promastigotes, en fase estacionaria, en 1,5 ml de Suero Bovino Fetal, mediante congelación gradual. Se dispusieron en placas de microtitulación (SARSTED) promastigotes en fase de crecimiento logarítmico de las distintas cepas a una concentración de 1,25x10⁶ promastigotes/ml y en un volumen final de 200 µl. Para la determinación de la

susceptibilidad a anfotericina B se prepararon diluciones seriadas de las formulaciones de anfotericina B en medio de cultivo Schneider (5, 2,5, 0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039 y 0,019 $\mu\text{g/ml}$), que se añadieron por triplicado a las placas de microtitulación. Se incubaron a 26°C en contacto con las formulaciones y, tras 48 horas, se determinó el efecto de la anfotericina B sobre la actividad metabólica del parásito por adición de 20 μl de una solución de resazurina 2,5 mM (Sigma) en PBS, dejándose en incubación durante 3 h a 26°C. A continuación, se determinó la intensidad de fluorescencia en espectrofluorímetro con una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Se determinó el porcentaje de parásitos viables y la concentración inhibitoria media (IC_{50}) por el método de regresión Probit utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) v. 15.0. La tabla 8 muestra los resultados obtenidos.

Especies	AMB desoxicolato	AMB- γ -CD sin agente gelificante	Formulación en gel de la invención
<i>L. infantum</i>	0,029	0,056	0,126
<i>L. amazonensis</i>	0,336	0,307	0,346
<i>L. guyanensis</i>	0,124	0,133	0,365
LC3*	0,101	0,095	0,135
LD1*	0,066	0,07	0,107
<i>L. braziliensis</i>	0,048	0,057	0,201

Tabla 8. Concentraciones inhibitorias medias (IC_{50}) obtenidas (en $\mu\text{g/ml}$) con las distintas formulaciones en las diferentes especies de *Leishmania* estudiadas. *Aislados obtenidos de lesiones cutáneas en enfermos de Bolivia.

Los resultados de la tabla 8 muestran cómo la formulación constituida únicamente por el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina sin agente gelificante tiene una actividad equiparable, en la mayoría de especies estudiadas, a la formulación de anfotericina B desoxicolato (análogo de Fungizona[®]), a excepción del caso de *L. infantum*. Sin embargo, cuando se utilizó la formulación en gel de la invención se produjo un descenso de eficacia que posiblemente esté relacionado con la velocidad de liberación del gel (el gel se libera más lentamente que la disolución).

b) En segundo lugar, se estudió la citotoxicidad en cultivos de macrófagos de la línea J774. Los macrófagos se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma) y se utilizaron, en

fase de crecimiento logarítmico, en placas de microtitulación (SARSTED) a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/ml y en un volumen final de 200 μ l. Se prepararon diluciones seriadas de las distintas formulaciones de anfotericina B (ver tabla 8) en medio de cultivo RPMI-1640 (5, 2,5, 0,625, 0,156, 0,078, 0,039 y 0,019 μ g/ml), que se añadieron por triplicado a las placas de microtitulación. Se dejaron en incubación a 37°C en contacto con las formulaciones y, después de 24 horas, se añadieron 20 μ l de una solución de resazurina 2,5 mM (Sigma) en PBS, dejándose en incubación 3 h a 26°C. A continuación se determinó la intensidad de fluorescencia en espectrofluorímetro con una longitud de onda de excitación de 535 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. Se determinó el porcentaje de macrófagos viables y la concentración citotóxica media (CC₅₀) por el método de regresión Probit utilizando el paquete estadístico SPSS v. 15.0. La tabla 9 muestra los resultados de citotoxicidad obtenidos.

	AMB desoxicolato	AMB-γ-CD sin agente gelificante	Formulación en gel de la invención
CC ₅₀ (μ g/ml)	11,52	4,25	98,77

Tabla 9. Resultados de citotoxicidad (CC₅₀) de las formulaciones estudiadas.

De los resultados de la tabla 9 se deduce que la formulación constituida únicamente por el complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina sin agente gelificante es más citotóxica que la anfotericina B desoxicolato, sin embargo, cuando la primera se formula de tal forma que se obtiene la formulación en gel de la invención disminuye la toxicidad de una forma exponencial.

Si definimos el margen de seguridad (MS) de uso de un fármaco como el cociente entre las concentraciones tóxicas y eficaces, en este caso concreto, el MS se calcularía como el cociente entre CC₅₀ e IC₅₀. Los resultados de márgenes de seguridad para las distintas formulaciones estudiadas en las distintas especies de *Leishmania* se recogen en la tabla 10.

Especies	AMB desoxicolato	AMB-γ-CD sin agente gelificante	Formulación en gel de la invención
<i>L. infantum</i>	397	75,9	783
<i>L. amazonensis</i>	34,3	14,7	283
<i>L. guyanensis</i>	92,9	31,95	270,6
LC3*	114	44,7	731,6
LD1*	174,5	60,7	923,1

<i>L. braziliensis</i>	240	74,6	491,4
------------------------	-----	------	-------

Tabla 10. Márgenes de seguridad obtenidos como cociente entre CC₅₀ e IC₅₀. *Aislados procedentes de lesiones cutáneas en enfermos de Bolivia.

Teniendo en cuenta que la formulación en gel de la invención se compara con
 5 formulaciones de anfotericina cuya comercialización ha sido aprobada por las
 agencias reguladoras pertinentes (lo que indica, entre otras cosas, que dichas
 formulaciones presentan un perfil de seguridad suficiente para su comercialización),
 los resultados de la tabla 10 muestran claramente que el gel en estudio presenta unas
 características de seguridad no sólo muy adecuadas para su uso *in vivo* sino además
 10 bastante mejores que las que presentan las formulaciones actualmente en el mercado.
 Se concluye, por tanto, que la formulación en gel de la invención es sensiblemente
 más segura para su administración en seres humanos y animales en comparación con
 la formulación que actualmente se prescribe para su administración en seres humanos
 y con la formulación constituida únicamente por el complejo AMB- γ -CD sin agente
 15 gelificante (tabla 9) al ser drásticamente menos tóxica que estas dos formulaciones.

4.1. Actividad leishmanicida *in vivo* sobre el criceto dorado

Se establecieron dos grupos de 5 cricetos dorados, a los que se les administró en la
 20 almohadilla plantar de la pata posterior izquierda, a día 0 y por inyección subcutánea,
 1×10^7 promastigotes metacíclicos en 0,5ml de una solución de *L. amazonensis* en
 medio Schneider. En ningún caso se infectó la pata posterior derecha de los cricetos ni
 ninguna de las patas anteriores. En ningún caso se administró tratamiento en la pata
 posterior derecha de los cricetos ni en ninguna de las patas anteriores.

25

El día 37 *postinfección* (p.i.) se inició el tratamiento tópico con la formulación en
 pomada de la invención, mediante aplicación con espátula sobre la almohadilla plantar
 de la pata posterior izquierda e inmovilización durante 2 horas. Tras esta primera
 aplicación, se repitió el tratamiento cada 24 horas durante los 4 días siguientes
 30 completando un tratamiento de 5 días en total. Durante los días de tratamiento con la
 formulación en pomada de la invención, días 37 al 41, la pata que recibió el

tratamiento se mantuvo vendada y por ese motivo no se disponen datos durante ese intervalo de días.

El tamaño de la inflamación, característica de la infección por *L. amazonensis*, se determinó semanalmente por la medida del diámetro de las patas posteriores izquierdas infectadas y derechas no infectadas, con ayuda de un calibrador (Vernier Caliper), hasta la finalización del experimento en el día 58 p.i. (ver tabla 11).

GRUPO	CONTROL				FORMULACIÓN EN POMADA DE LA INVENCIÓN			
	Pata izquierda infectada no tratada		Pata derecha ni infectada ni tratada		Pata izquierda infectada y tratada		Pata derecha ni infectada ni tratada	
	D (mm)	± DS	D (mm)	± DS	D (mm)	± DS	D (mm)	± DS
0	4,42	± 0,44	3,72	± 0,18	3,58	± 0,53	3,34	± 0,21
6	3,34	± 0,27	3,34	± 0,36	3,50	± 0,23	3,38	± 0,15
13	3,82	± 0,35	3,12	± 0,16	3,60	± 0,23	3,34	± 0,09
20	5,76	± 0,23	3,64	± 0,18	4,70	± 0,86	3,32	± 0,60
28	6,04	± 0,75	3,30	± 0,21	5,88	± 0,19	3,38	± 0,19
34	7,06	± 0,86	3,32	± 0,26	6,62	± 0,53	3,60	± 0,20
40	7,90	± 1,10	3,60	± 0,41	ND	ND	ND	ND
48	7,70	± 0,89	3,44	± 0,25	6,80	± 0,49	3,48	± 0,15
51	7,56	± 0,57	3,42	± 0,28	7,13	± 0,49	3,65	± 0,45
58	8,70	± 1,16	3,52	± 0,24	6,98	± 0,41	3,40	± 0,08

10

Tabla 11. Evolución de la inflamación en la almohadilla plantar de la pata posterior izquierda de criceto dorado por infección con *L. amazonensis* en relación a la pata posterior derecha, ni infectada ni tratada. Clave: D: diámetro, DS: desviación estándar, ND: No Determinado.

15

Los resultados recogidos en la Tabla 11 y en la Figura 5 muestran una clara tendencia hacia la reducción de la intensidad de la inflamación inducida por la infección después de la aplicación del tratamiento con la formulación en pomada de la invención durante 5 días (área recuadrada en figura 5), pasados los cuales y suspendido el tratamiento, el tamaño de la lesión tiende a estabilizarse.

20

Ejemplo 5. Análisis de la estabilidad química de las formulaciones de la invención (gel y colirio) en comparación con Fungizona®

Se empleó un método desarrollado para el análisis de anfotericina B en muestras biológicas (Espada R, Josa JM, Valdespina S, Dea MA, Ballesteros MP, Alunda JM and Torrado JJ. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. Biomedical Chromatography. 2008: 22 (4): 402-407), descartándose previamente cualquier posible interferencia por parte de los componentes de la formulación a través del análisis de los correspondientes placebos (formulaciones que contienen todos los excipientes pero sin anfotericina B). En la tabla 12 se muestran las buenas características de estabilidad de la formulación en gel de la invención. Dicha estabilidad se deduce de la escasa variación en el tiempo del valor de la concentración de anfotericina B. La formulación a evaluar (formulación en gel de la invención) se conservó a temperatura ambiente y protegida de la luz y, además de la determinación de la concentración de anfotericina B por cromatografía líquida, se midió el pH y se hizo un barrido en el espectrofotómetro para evaluar si mantenía el estado de agregación monomérico. En ninguno de los tres análisis se produjeron variaciones notables, es decir, no se apreciaron cambios significativos en la concentración de anfotericina, la formulación mantuvo su valor de pH entre 5,0 y 5,5 y no se observaron variaciones en el estado de agregación.

Concentración de anfotericina B (% p/p)	
Tiempo cero	100,0 % ± 0,007
Primer mes	101,2 % ± 0,003
Segundo mes	100,5 % ± 0,006
Tercer mes	99,1 % ± 0,005
Cuarto mes	99,8 % ± 0,008
Quinto mes	100,6 % ± 0,002
Sexto mes	99,1 % ± 0,013

Tabla 12. Concentración de anfotericina B en la formulación en gel de la invención determinada por cromatografía líquida.

Se estudió también la estabilidad química de la formulación menos viscosa (colirio) de la invención y se comparó con la formulación comercial convencional de la anfotericina B (anfotericina B desoxicolato, análogo de Fungizona®).

5

Se prepararon dos formulaciones, en forma de colirio, del complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina. En la primera de las formulaciones se utilizó una solución fisiológica de cloruro de sodio como solvente, con la finalidad de proporcionar a la preparación la isotonicidad adecuada. En esta formulación se evaluaron el pH, el tamaño de partícula, el contenido de anfotericina B, la configuración monomérica, la esterilidad y la sensibilidad utilizando *C. albicans* como microorganismo de referencia. Los resultados se presentan en la tabla 13. En ella pueden observarse las diferencias entre los valores obtenidos con la formulación conservada en refrigeración frente a la conservada a temperatura ambiente.

15

		0 días	1 día	2 días	3 días	7 días	15 días	30 días
pH	t. amb.	7,5	-	-	-	7,5	7,5	7,5
	t. refrig.		-	-	-	7,5	7,5	7,5
Tamaño de partícula (nm)	t. amb.	1,2	-	-	-	4,2	2,2	1,8
	t. refrig.		-	-	-	0,96	657,3	1964,7
Estado agregación	t. amb.	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
	t. refrig.		Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
Contenido de anfotericina B (% p/p)	t. amb.	100,0	100,5	99,0	101,0	99,7	99,0	100,0
	t. refrig.		102,2	101,0	102,2	99,9	100,7	100,5
Sensibilidad de <i>C. albicans</i> (mm)	t. amb.	28,6	-	-	-	-	-	28,3
	t. refrig.		-	-	-	-	-	28,4
Esterilidad	t. amb.	Estéril	-	-	-	-	-	Estéril
	t. refrig.		-	-	-	-	-	Estéril

Tabla 13. Resultados obtenidos con la formulación en colirio de la invención con solución salina durante los 30 días evaluados con muestras a temperatura ambiente y en refrigeración.

20

La segunda formulación de colirio se preparó utilizando una solución de glucosa al 5% p/v como solvente. Los ensayos realizados fueron los mismos que los que se llevaron a cabo sobre la primera formulación. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14. En ella pueden observarse las diferencias entre los valores obtenidos con la formulación conservada en refrigeración frente a la conservada a temperatura ambiente.

		0 días	1 día	2 días	3 días	7 días	15 días	30 días
pH	t. amb.	7,7	-	-	-	7,6	7,6	7,6
	t. refriger.		-	-	-	7,6	7,6	7,6
Tamaño de partícula (nm)	t. amb.	1,0	-	-	-	0,6	50,7	372,7
	t. refriger.		-	-	-	0,9	48,7	1102,0
Estado agregación	t. amb.	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
	t. refriger.		Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
Contenido de anfotericina B (% p/p)	t. amb.	100,0	98,1	97,0	98,6	97,9	95,4	87,9
	t. refriger.		99,0	100,1	100,7	101,3	100,4	98,7
Sensibilidad de <i>C. albicans</i> (mm)	t. amb.	29,5	-	-	-	-	-	29,1
	t. refriger.		-	-	-	-	-	29,1
Esterilidad	t. amb.	Estéril	-	-	-	-	-	Estéril
	t. refriger.		-	-	-	-	-	Estéril

10 Tabla 14. Resultados obtenidos con la formulación en colirio de la invención con solución glucosa al 5% p/v durante los 30 días evaluados con muestras a temperatura ambiente y en refrigeración.

15 De la comparación de resultados de las tablas 13 y 14 podemos deducir que el medio en el que se disperse la anfotericina B (suero salino o glucosado) tiene un efecto crítico en la estabilidad química, siendo ésta mayor en medio salino. Por otra parte, por los datos de tamaño de partícula se observa que en ambos medios existe una tendencia a la formación de agregados y/o precipitados.

20 Se preparó también una formulación de anfotericina B desoxicolato en forma de colirio, a fin de hacer el estudio comparativo respecto a las dos formulaciones

anteriores. A pesar de obtener mejores resultados de estabilidad química con la formulación de anfotericina B disuelta en suero salino, se optó por la dilución de anfotericina B en suero glucosado para evitar la formación de precipitados (Martindale, Guía completa de consulta farmacoterapéutica, SC. Sweetman (director).

5 Pharma Editores S.L. 2003). Los ensayos realizados fueron los mismos que se llevaron a cabo sobre las dos formulaciones anteriores.

Para la formulación de anfotericina B desoxicolato en forma de colirio preparada en medio glucosado, se obtuvieron los resultados que se presentan en la tabla 15. Los
10 datos de la tabla 15 muestran la inestabilidad de la formulación (en comparación con los datos de la tabla 14), evidenciada por el cambio en el pH, por la formación claramente visible de agregados que aumentaron notablemente el tamaño de partícula, y por el descenso en el porcentaje de anfotericina B.

15

		0 días	1 día	2 días	3 días	7 días	15 días	30 días
pH	t. amb.	7,4	-	-	-	6,3	5,4	5,2
	t. refriger.		-	-	-	7,3	5,0	4,3
Tamaño de partícula (nm)	t. amb.	1,6	-	-	-	0,9	3010	6200
	t. refriger.		-	-	-	0,9	3890	5800
Estado agregación	t. amb.	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero
	t. refriger.		Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero	Dímero
Contenido de anfotericina B (% p/p)	t. amb.	100,0	96,1	94,7	100,6	97,0	93,7	83,6
	t. refriger.		97,2	98,6	100,7	98,8	98,9	95,3
Sensibilidad de <i>C. albicans</i> (mm)	t. amb.	21,8	-	-	-	-	-	21,2
	t. refriger.		-	-	-	-	-	21,1
Esterilidad	t. amb.	Estéril	-	-	-	-	-	Estéril
	t. refriger.		-	-	-	-	-	Estéril

Tabla 15. Resultados obtenidos con la formulación en colirio de anfotericina B desoxicolato con solución glucosa al 5% p/v durante los 30 días evaluados con muestras a temperatura ambiente y en refrigeración.

20

Los resultados indican que la formulación en colirio de la invención que contiene al complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina reconstituido en suero glucosado, mantiene sus propiedades químicas (contenido en anfotericina B) de una forma significativamente mejor (t-Student, $P < 0,01$) que la formulación en colirio de anfotericina B desoxicolato. Especialmente importante es la diferencia en tamaño de partícula entre las dos formulaciones anteriores, existiendo una mayor agregación en la formulación comercial. Este hecho se intensifica al almacenar el producto a menor temperatura (nevera). La mayor inestabilidad de la formulación comercial se refleja también a través de los cambios en pH. Se puede concluir que las nuevas formulaciones de anfotericina B reivindicadas en la presente invención presentan unas características de estabilidad química superiores a las de la formulación de anfotericina B comercial de referencia (anfotericina B desoxicolato, análogo de Fungizona[®]).

15

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra el diagrama de solubilidad de anfotericina B en presencia de γ -ciclodextrina a 25°C. (Nota: el peso molecular de la anfotericina B es 924,1 g/mol y el de la γ -ciclodextrina es 1297 g/mol). Dicho diagrama representa la concentración (mM) de anfotericina B frente a la concentración (mM) de γ -ciclodextrina en el límite de solubilidad de la anfotericina B a 25°C. Como se observa en la figura, la función solubilidad se puede ajustar a la ecuación de una recta de expresión: $y = 0,0161x - 0,1876$. La bondad del ajuste de una recta de regresión se mide con R^2 y en este caso concreto $R^2 = 0,9964$.

La Figura 2 representa los espectros de absorción infrarroja (IR) de la molécula de anfotericina B, la molécula γ -ciclodextrina, la mezcla física anfotericina B- γ -ciclodextrina (AMB-GCD) y el liofilizado de una disolución de anfotericina B- γ -ciclodextrina en una relación molar 1:70 y sin filtrar. En dichos espectros de absorción infrarroja se representa el porcentaje de transmitancia (% T) frente a la longitud de onda a la cual se produce absorción en la región de IR (cm^{-1}).

La Figura 3 muestra un diagrama de barras comparativo de la inhibición (representada mediante los diámetros (medidos en mm) de los halos de inhibición obtenidos) a la que da lugar la formulación en gel de la invención (10 μg de anfotericina B, barra izquierda) sobre distintas cepas de hongos (cepas mostradas en el eje X) en comparación con la inhibición producida por discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs[®] en MHA (discos con 10 μg de anfotericina B, barra derecha). El fabricante de los discos patrón de anfotericina B Neo-Sensitabs[®] señala los siguientes parámetros para determinar la sensibilidad de un microorganismo frente a anfotericina B (AMB): Resistente (R), si el halo de inhibición es menor de 10 mm. Intermedio (I), si la medida está entre 10 y 14 mm y Sensible (S), si la medida es mayor o igual de 15 mm.

En la Figura 4 se representa el dispositivo que se usó para realizar el ensayo de penetración de anfotericina B en biopelículas de hongos (ejemplo 3.4). La capa A corresponde a una placa con agar YNB-Galactosa a la que se adicionó anfotericina B en las dos formas (anfotericina B disuelta en DMSO y la formulación en gel de la invención). La capa B representa una membrana de 0,22 μm de diámetro de poro y 47 mm de diámetro con o sin biopelícula de *Candida albicans*. La capa C simboliza una membrana de 0,22 μm de diámetro de poro y 25 mm de diámetro que sirve de separación por contacto directo. La capa D se refiere a discos para ensayo de 6 mm de diámetro impregnados con 20 μl de PBS.

En la Figura 5 se observa la evolución en el tiempo (medido en días) del diámetro (mm) de la almohadilla plantar de las patas posteriores derecha e izquierda de los cricetos infectados, antes y después del tratamiento con la formulación en pomada de la invención. La serie representada mediante una doble línea fina continua corresponde a la evolución de la pata posterior izquierda (infectada pero sin tratamiento) de los cricetos que no recibieron tratamiento. La serie representada mediante una línea gruesa continua corresponde a la evolución de la pata posterior izquierda (infectada y con tratamiento) de los cricetos que recibieron tratamiento. La serie representada mediante una línea discontinua de rayas corresponde a la evolución de la pata posterior derecha (no infectada y sin tratamiento) de los cricetos que no recibieron tratamiento en su pata posterior izquierda. La serie representada mediante

una línea discontinua de puntos corresponde a la evolución de la pata posterior derecha (no infectada y sin tratamiento) de los cricetos que recibieron tratamiento en su pata posterior izquierda con la formulación en pomada de la invención.

- 5 Las fotografías de la Figura 6 muestran el detalle de la almohadilla plantar de la pata posterior izquierda de un animal testigo sin tratar (a) y de un animal después del tratamiento (b). El tratamiento se hizo desde el día 37 al 41.

Reivindicaciones

1. Formulación farmacéutica tópica en forma de gel, crema, pomada o colirio que comprende un complejo de anfotericina B- γ -ciclodextrina y un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable en la que la relación molar anfotericina B: γ -ciclodextrina es 1:71 y el excipiente se añade en proporciones tales que el estado de agregación de la anfotericina B se mantiene monomérico en dicha formulación consiguiéndose un efecto sinérgico que aumenta el efecto antimicrobiano del complejo.
5
2. Formulación farmacéutica según las reivindicaciones anteriores donde dicha formulación tiene forma de gel y el excipiente tópico farmacéuticamente aceptable se selecciona entre derivados de celulosa, derivados de guar, polímeros vinílicos, polímeros carboxivinílicos, polímeros acrílicos, polímeros naturales y/o combinaciones de los mismos.
10
15
3. Formulación farmacéutica según la reivindicación 2 en la que el excipiente se selecciona entre metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y copolímeros reticulados de acrilato de alquilo C₁₀₋₃₀.
20
4. Formulación farmacéutica según la reivindicación 3 en el que el excipiente es metilcelulosa.
5. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1 donde dicha formulación tiene forma de crema y el excipiente tópico farmacéuticamente aceptable se selecciona entre siliconas, derivados de siliconas, bases emulgentes aceite/agua (O/A) de tipo no iónico y/o combinaciones de los mismos.
25
6. Formulación farmacéutica según la reivindicación 5 en la que el excipiente se selecciona entre ciclometicona y dimeticona.
30

- 5
7. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1 donde dicha formulación tiene forma de pomada y el excipiente tópico farmacéuticamente aceptable se selecciona entre un excipiente adhesivo oral, parafina, derivados de parafina, bases aceite/agua (A/O), cremas agua/aceite (A/O) y/o combinaciones de los mismos.
- 10
8. Formulación farmacéutica según la reivindicación 7 en la que el excipiente es una mezcla comprendida por carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina, en base de polietileno y aceite mineral.
- 15
9. Formulación farmacéutica según la reivindicación 1 en la que dicha formulación tiene forma de colirio y comprende el complejo de anfotericina B- γ -ciclodextrina disuelto en suero salino o glucosado.
- 20
10. Formulación farmacéutica según las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de infecciones fúngicas y/o parasitarias en seres humanos y/o animales.
- 25
11. Formulación farmacéutica según la reivindicación 10 en la que las infecciones fúngicas comprenden micosis superficiales, cutáneas y mucocutáneas.
12. Formulación farmacéutica según la reivindicación 10 en la que las infecciones parasitarias incluyen leishmaniosis cutánea.
13. Método para preparar formulaciones farmacéuticas tópicas en forma de gel, crema, pomada o colirio que comprende las siguientes etapas:
- (a) preparar una disolución en medio acuoso de γ -ciclodextrina y ajustar el pH a un valor entre 11,5 y 14.

- (b) Añadir anfotericina B a la disolución de la etapa (a) en una relación molar de anfotericina B y γ -ciclodextrina 1:71 y agitar constantemente hasta su completa disolución.
- (c) Ajustar el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 4 y 8.
- 5 (d) Añadir un excipiente tópico farmacéuticamente aceptable a la solución del complejo anfotericina B- γ -ciclodextrina de la etapa (c).
14. Método según la reivindicación 13 en el que en la etapa (a) el pH de la disolución en medio acuoso de γ -ciclodextrina se ajusta a un valor de 12.
- 10
15. Método según las reivindicaciones 13 y 14 en el que en la etapa (c) el pH de la mezcla anfotericina B: γ -ciclodextrina se ajusta a un valor de 5,5 para formulaciones farmacéuticas en forma de gel, crema o pomada.
- 15
16. Método según las reivindicaciones 13 y 14 en el que en la etapa (c) el pH de la mezcla anfotericina B: γ -ciclodextrina se ajusta a un valor de 7,2-7,4 para formulaciones farmacéuticas en forma de colirio.
- 20
17. Método según las reivindicaciones 13-15 en el que el excipiente tópico de la etapa (d) es un excipiente adecuado para la preparación de geles y en el que se añaden las siguientes etapas a continuación de la etapa (d):
- (e): agitar suavemente
- (f): dejar en reposo durante un tiempo comprendido entre un minuto y tres días
- 25
- donde la formulación farmacéutica que se prepara está en forma de gel.
18. Método según la reivindicación 17 en el que el tiempo que ha que dejar en reposo la mezcla en la etapa (f) es de 24 horas.
- 30

- 5
19. Método según las reivindicaciones 17 y 18 en el que el excipiente tópico farmacéuticamente aceptable se selecciona entre derivados de celulosa, derivados de guar, polímeros vinílicos, polímeros carboxivinílicos, polímeros acrílicos, polímeros naturales y/o combinaciones de los mismos.
- 10
20. Método según la reivindicación 19 en el que el excipiente se selecciona entre metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y copolímeros reticulados de acrilato de alquilo C₁₀₋₃₀.
- 15
21. Método según las reivindicaciones 13-15 en el que el excipiente tópico de la etapa (d) es un excipiente adecuado para la preparación de cremas y en el que se añaden la siguiente etapa a continuación de la etapa (d):
(e): agitar durante un tiempo comprendido entre un minuto y una hora donde la formulación farmacéutica que se prepara está en forma de pomada.
- 20
22. Método según la reivindicación 21 donde el excipiente tópico farmacéuticamente aceptable se selecciona entre siliconas, derivados de siliconas, bases emulgentes aceite/agua (O/A) de tipo no iónico y/o combinaciones de los mismos.
- 25
23. Método según las reivindicaciones 21 y 22 donde el excipiente para la preparación de cremas se selecciona entre ciclometicona y dimeticona.
- 30
24. Método según las reivindicaciones 13-15 en el que el excipiente tópico de la etapa (d) es un excipiente adecuado para la preparación de pomadas y en el que se añaden la siguiente etapa a continuación de la etapa (c) y antes de la etapa (d):
(c1): liofilizar el complejo anfotericina B: γ -ciclodextrina de la etapa(c)
(c2): pulverizar el liofilizado de la etapa (c1)

donde la formulación farmacéutica que se prepara está en forma de pomada.

- 5 25. Método según la reivindicación 24 en el que el excipiente adecuado para la preparación de pomadas se selecciona entre un excipiente adhesivo oral, parafina, derivados de la parafina, bases A/O, cremas A/O y/o combinaciones de los mismos.
- 10 26. Método según la reivindicación 25 en el que el excipiente adecuado para la preparación de pomadas es una mezcla comprendida por carboximetilcelulosa sódica, pectina y gelatina, en una base de polietileno y aceite mineral.
- 15 27. Método según las reivindicaciones 13, 14 y 16 en el que se remplazan las anteriores etapas (a) y (c) por las siguientes nuevas etapas (a') y (c'), respectivamente, añadiéndose además una nueva etapa (c'1) a continuación de la nueva etapa (c') y omitiéndose adicionalmente la etapa (d):
- 20 (a'): preparar una disolución de γ -ciclodextrina en suero salino o en suero glucosado y ajustar el pH de dicha disolución hasta un valor entre 11,5 y 14,0.
- (c'): ajustar el pH de la mezcla de la etapa (b) a un valor entre 7,2 y 7,6
- (c'1): llevar a cabo una filtración esterilizante
- 25 donde la formulación farmacéutica que se prepara está en forma de colirio.
28. Método según la reivindicación 27 en el que en la etapa (c') el pH de la mezcla preparada en la etapa (b) se ajusta a un valor de 7,4.

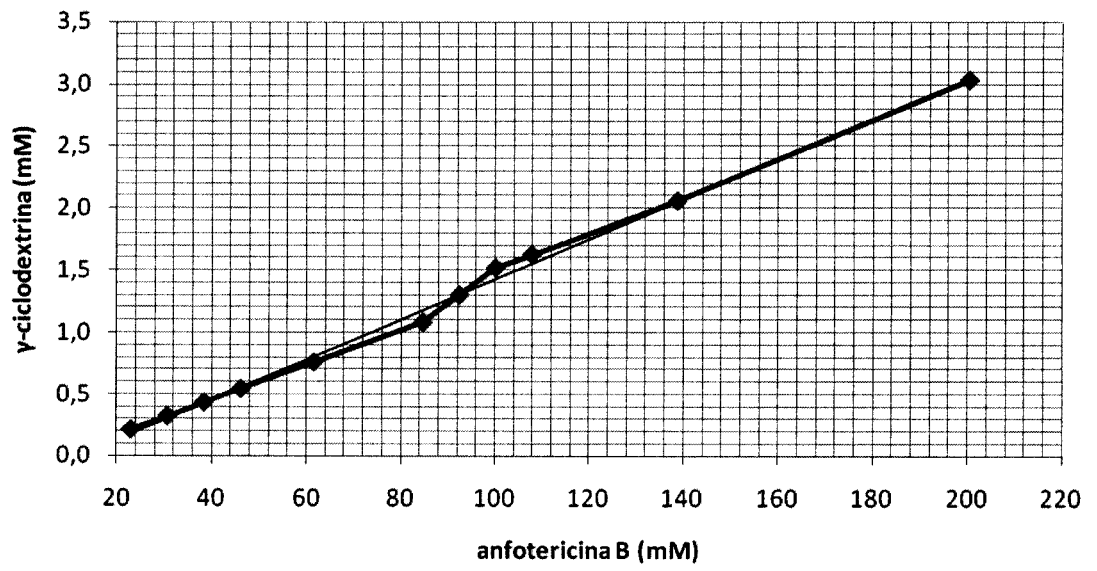


Figura 1

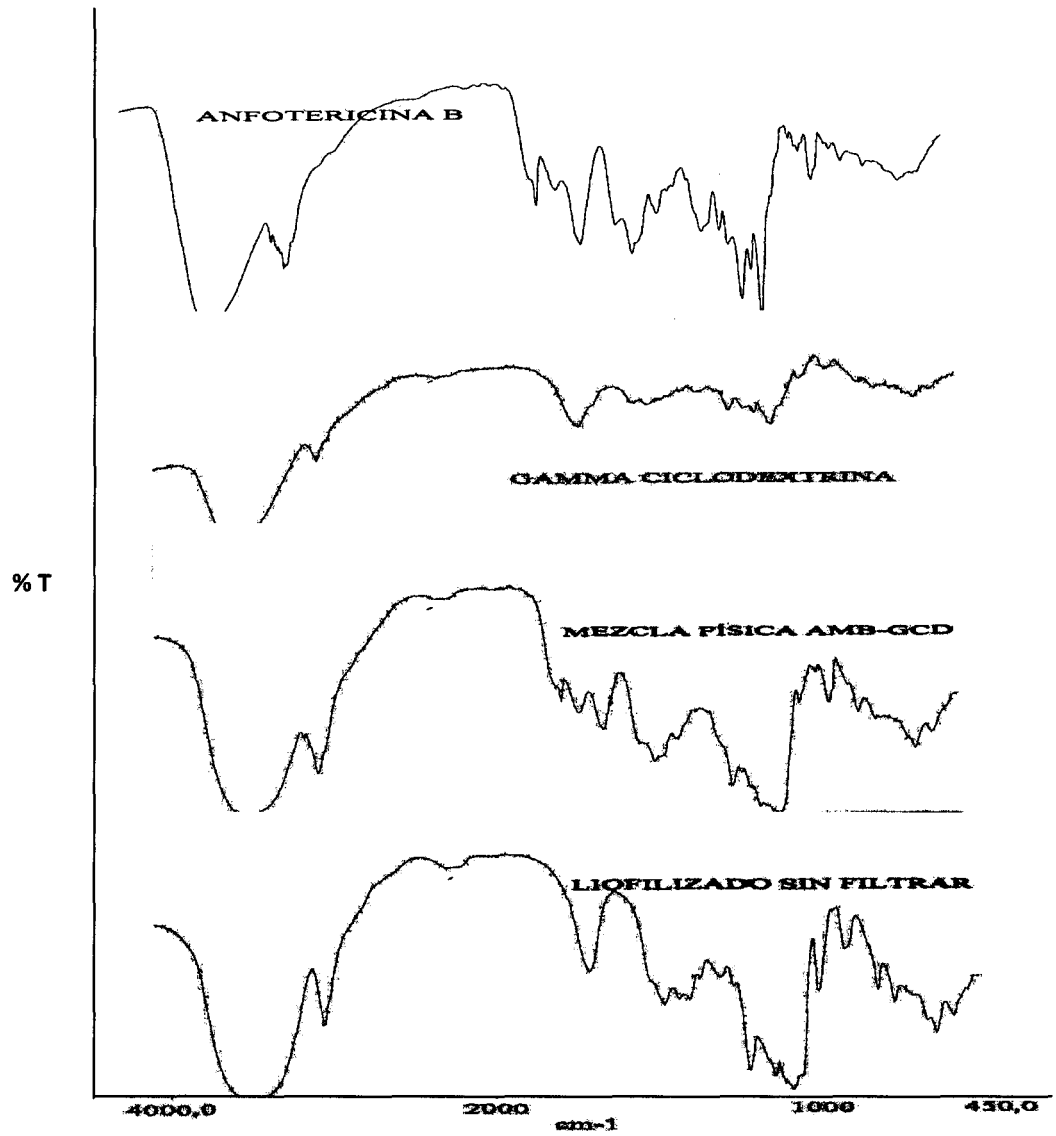


Figura 2

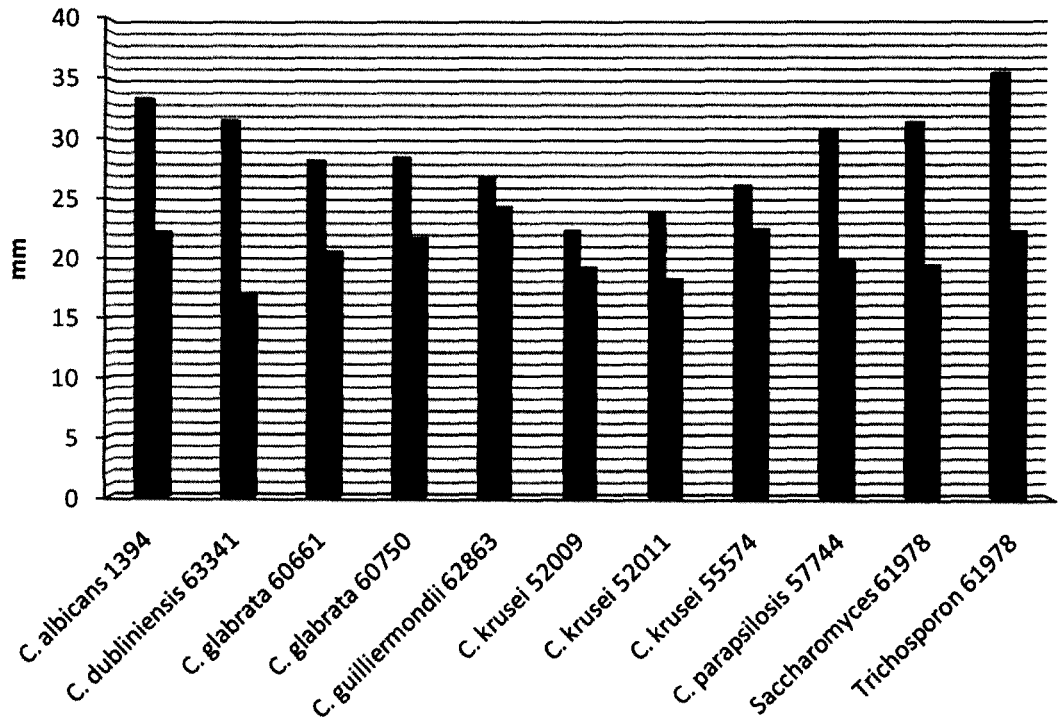


Figura 3

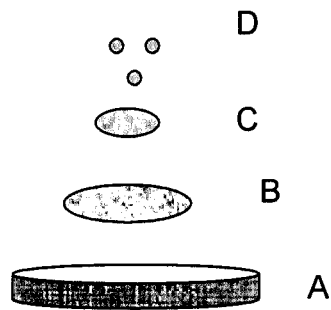


Figura 4

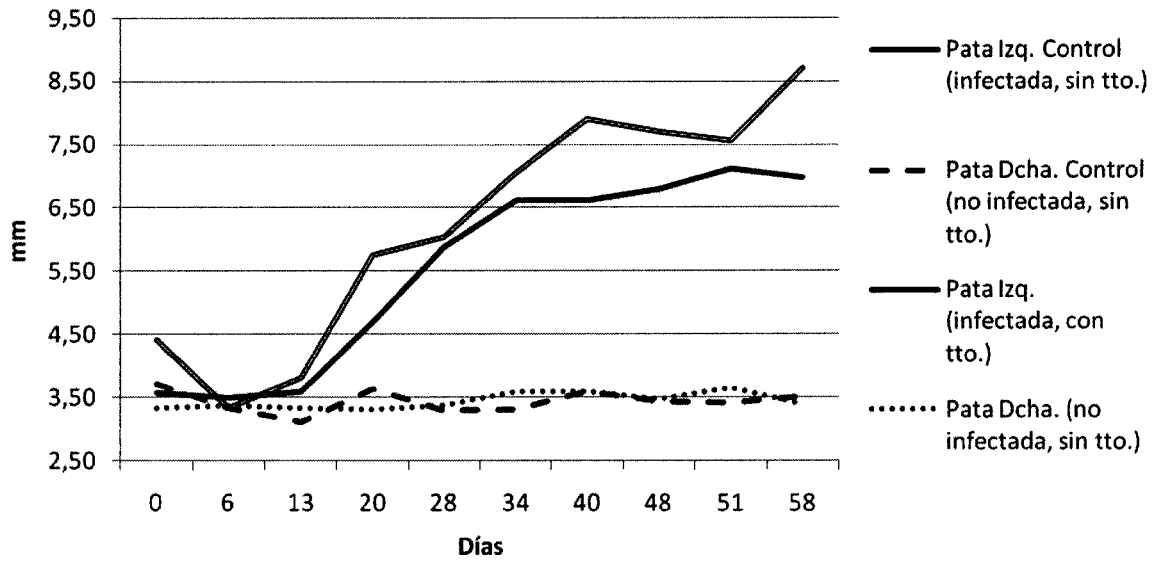


Figura 5



(a)



(b)

Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201001230

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.09.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 4883785 A (CHOW ET AL.) 28.11.1989, columna 2, líneas 8-37; columna 3, líneas 22-46; ejemplos.	1-31
A	KIM, YE-TAE et al.; A thermosensitive vaginal gel formulation with HP γ CD for the pH-dependent release and solubilization of amphotericin B; European Journal of Pharmaceutical Sciences 41 (2010) 399-406; disponible online 21.07.2010.	1-31
A	KAJTÁR, M. et al; Aggregation of amphotericin B in the presence of γ -cyclodextrin; Biopolymers, volumen 28, número 9, páginas 1585-1596 (1989); ISSN 0006-3525.	1-31
A	WO 9927940 A1 (YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM) 10.06.1999, página 2, línea 27 – página 3, línea 30.	1-31

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
06.09.2012

Examinador
N. Vera Gutierrez

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/7048 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61K47/40 (2006.01)

A61K9/06 (2006.01)

A61K9/08 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, CAS, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.09.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 3-12, 19-31	SI
	Reivindicaciones 1, 2, 13-18	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-31	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 4883785 A (CHOW et al.)	28.11.1989
D02	KIM, YE-TAE et al.; European Journal of Pharmaceutical Sciences 41 (2010) 399-406; disponible online 21.07.2010.	21.07.2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a una formulación farmacéutica tópica que comprende un complejo anfotericina B - gamma-ciclodextrina y un excipiente tópico aceptable, en la que la relación molar anfotericina B : gamma-ciclodextrina está dentro del intervalo entre 1:50 y 1:200 y presentando la anfotericina B un estado de agregación monomérico.

El documento D01 divulga un complejo de anfotericina B y gamma-ciclodextrina en el que la relación molar anfotericina B : gamma-ciclodextrina está entre 1:20 y 1:100, preferentemente entre 1:30 y 1:100 y más preferentemente, entre 1:40 y 1:100 (columna 2, líneas 8-37). Se consigue así mejorar la estabilidad y la solubilidad de la anfotericina B. En los ejemplos se describe la preparación de distintos complejos a partir de una disolución acuosa de gamma-ciclodextrina cuyo pH se ajusta a 12,6 y a 11,5 (ejemplos 1, 3 y ejemplos 2, 4, respectivamente). Se añade a continuación anfotericina B y se ajusta el pH a un valor alrededor de 7,5 - 8. La relación molar anfotericina B : gamma-ciclodextrina es 1:2 (ejemplos 1, 3) y 1:50 (ejemplos 2, 4). En la columna 3, líneas 22-46 se indica que los complejos obtenidos pueden presentarse en formulaciones líquidas, sólidas, semisólidas ..., siendo estas últimas efectivas en infecciones tópicas.

Por ello, se considera que las reivindicaciones 1, 2, 13-18 de la solicitud no son nuevas (Artículo 6.1 L.P.).

Respecto a las reivindicaciones 3-12, 19-31 relativas a la presentación de la formulación en forma de gel, crema, pomada y colirio y a sus métodos de preparación y excipientes empleados en cada caso, se considera que no poseen actividad inventiva dado que se trata de las formas farmacéuticas habituales destinadas a la administración tópica de sustancias activas y cuya preparación forma parte de la práctica galénica habitual que un experto en la materia aplicaría sin necesidad de un esfuerzo inventivo. De igual manera, no es posible reconocer actividad inventiva al empleo de los excipientes mencionados, en ausencia de una ventaja técnica asociada a esa selección, dado que se trata de excipientes habituales en el estado de la técnica para la obtención de este tipo de formulaciones tópicas. Por ejemplo, en el documento D02 se describe una formulación en forma de gel de aplicación vaginal que contiene un complejo de anfotericina B e hidroxipropil-gamma-ciclodextrina. En los apartados 2.3 y 2.5 se prepara la formulación en gel del complejo obtenido a partir de una solución de hidroxipropil-gamma-ciclodextrina (150 mg; 0,1 mmol) cuyo pH se ajusta a 11,5, a la cual se añade anfotericina B (2mg; 0,002 mmol), ajustando el pH a aproximadamente 7.

Por tanto, se considera que la invención tal como se define en las reivindicaciones 3-12, 19-31 de la solicitud, no implica actividad inventiva (Artículo 8.1 L.P.).