

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 989**

51 Int. Cl.:

C07D 498/18 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01)

A61K 47/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2011 E 11170078 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2402350**

54 Título: **Nuevos complejos de inclusión farmacéuticos sólidos solubles en agua y sus soluciones acuosas para uso oral, oftálmico, tópico o parenteral que contienen un macrólido y ciertas ciclodextrinas**

30 Prioridad:

01.07.2010 IT MI20101212

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

04.05.2015

73 Titular/es:

**EUTICALS S.P.A. (100.0%)
Viale Bianca Maria, 25
20122 Milan, IT**

72 Inventor/es:

**MANGIA, ALBERTO;
GRISENTI, PARIDE;
MONTI, RICCARDO;
REZA ELAHI, SHAHRZAD y
VERZA, ELISA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 534 989 T3

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

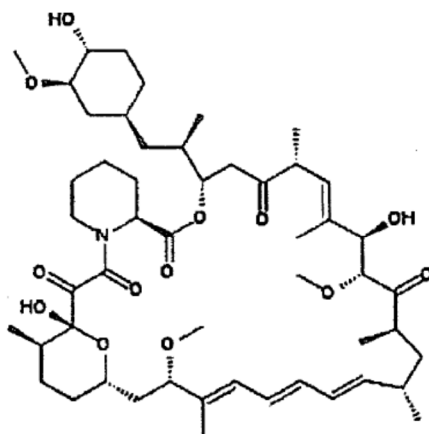
DESCRIPCIÓN

Nuevos complejos de inclusión farmacéuticos sólidos solubles en agua y sus soluciones acuosas para uso oral, oftálmico, tópico o parenteral que contienen un macrólido y ciertas ciclodextrinas

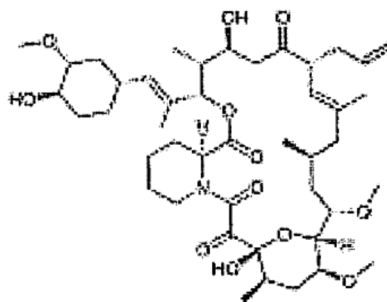
Esta invención se refiere a nuevos complejos de inclusión farmacéuticos sólidos solubles en agua y sus soluciones acuosas para uso oral, oftálmico, tópico o parenteral que contienen un macrólido y ciertas ciclodextrinas.

Estado de la técnica

Los macrólidos son un grupo de fármacos (típicamente antibióticos) cuya actividad proviene de la presencia de un anillo macrolídico, un gran anillo de lactona macrocíclico al que pueden estar unidos uno o más desoxiazúcares. Los anillos de lactona habitualmente tienen 14, 15 o 16 miembros. Los macrólidos pertenecen a la clase de policétidos de productos naturales. Entre esta familia, sirolimus, también conocido como rapamicina de fórmula 1, identificado por el número de registro 53123-88-9, y tacrolimus de fórmula 2, identificado por el número de registro 104987-11-3, son compuestos conocidos por su actividad inmunosupresora, y se usan para prevenir el rechazo de trasplantes de órganos y médula ósea en el cuerpo.



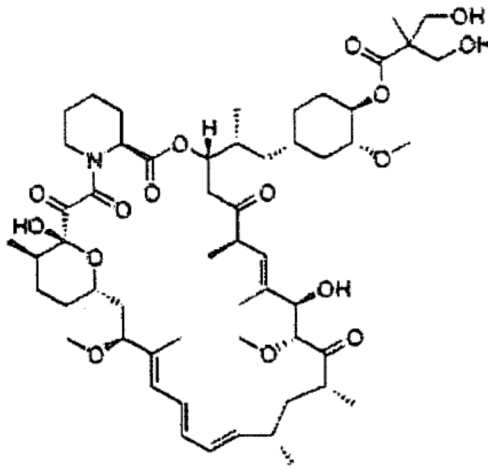
Fórmula 1



Fórmula 2

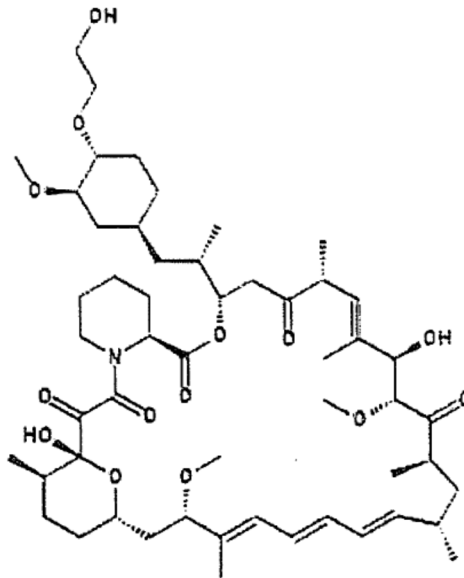
Los derivados de rapamicina, tal como temsirolimus, everolimus y pimecrolimus, un derivado sintético de ascomicina, muestran una actividad inhibidora similar para una proteína específica (mTOR) implicada en la regulación del crecimiento, proliferación y supervivencia celular.

Temsirolimus de fórmula 3, identificado por el número de registro 162635-04-3, está estructuralmente relacionado con rapamicina y se usa para tratar carcinoma de células renales avanzado (un tipo de cáncer de riñón). También se está estudiando en el tratamiento de otros tipos de cáncer.



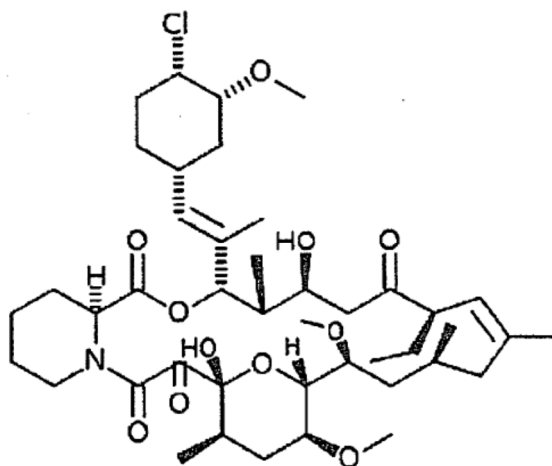
Fórmula 3

- 5 Everolimus de fórmula 4, identificado por el número de registro 159351-69-6, se usa para tratar cáncer de riñón avanzado que no respondió a tratamiento con ciertos otros fármacos anticancerosos. También se está estudiando en el tratamiento de otros tipos de cáncer como macroglobulinemia de Waldenstrom o cáncer de mama.



Fórmula 4

- 10 Pimecrolimus de fórmula 5, identificado por el número de registro 137071-32-0, un derivado sintético de ascomicina, se usa para el tratamiento de dermatitis atópica.



Fórmula 5

5 Todos estos compuestos tienen mala solubilidad acuosa a temperatura ambiente, variando desde 0,01 a 0,000006 mol/l, y se describe que son inestables en solución tras el almacenamiento y, como consecuencia de la solólisis, de su enlace éster que produce pérdida de actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo* (Yuri V. Il'ichev, Lori Alquier, y Cynthia A. Maryanoff, ARKIVOC, 2007 (XII) 110-131; Ping Cai, Rushung Tsao, y Mark E. Ruppen, DMD Fast Forward. 31 Mayo, 2007).

10 Además en estado sólido estos compuestos pueden existir en forma amorfa o cristalina, la forma amorfa es muy inestable a degradación oxidativa (*Tetrahedron Letters* (1990), 31(34), 4845-8. *Xenobiotica*, 27(9), 869 (1997); *J Org. Chem.*, 63, 10069, (1998)).

15 Se sabe perfectamente que las formas amorfas tienen mayor solubilidad (se ha descrito que el aumento de solubilidad de material cristalino a amorfo es entre 10 y 1600 veces), son menos estables, propensas a degradación si se compara con una forma cristalina.

20 Además la mala solubilidad habitualmente se asocia a mala absorción en el cuerpo y mala disponibilidad. El documento US 5 024 998 sugiere que las soluciones parenterales acuosas de fármacos apenas solubles en agua combinados con ciclodextrinas son capaces de minimizar la precipitación del fármaco en los sitios u órganos de inyección después de la aplicación parenteral.

25 El documento EP839028 describe la posibilidad de preparar una composición farmacéutica para la administración oral en forma de una dispersión sólida de rapamicina en alfa o beta ciclodextrina.

30 Realmente, los datos de la bibliografía confirman que la rapamicina finamente micronizada o rapamicina amorfa necesita estabilizarse para fines de formulación usando diferentes técnicas de recubrimiento que prevén el uso de varios polímeros sintéticos, como metacrilato de polibutilo (PBMA), polietileno-co-acetato de vinilo (PEVA) o complejo de polielectrolitos como sulfato de protamina y celulosa, como se describe en los documentos WO 2006026531, WO 2006039237, WO 2007011708 y EP 2135601.

35 Sin embargo, estas matrices poliméricas muestran mala solubilidad en agua o son polielectrolitos, es decir, polímeros que pueden ser solubles en agua solo en un estrecho intervalo de pH. Además los datos de la bibliografía no describen datos cuantitativos sobre la estabilidad de estos complejos.

40 Por las razones citadas anteriormente se exploró la posibilidad de aumentar la solubilidad y estabilidad de macrólidos mediante el uso de una forma amorfa estabilizada en combinación con una gamma ciclodextrina.

Breve descripción de las figuras

40 Figura 1: Disminución de la pureza cromatográfica (datos de HPLC) de rapamicina amorfa y de rapamicina cristalina (60°C durante 17 días (408 horas)).

45 Figura 2: Estabilidad del complejo rapamicina gamma CD preparado usando diferentes solventes: etanol anhidrido, etanol al 96% y acetona.

Figura 3: Estabilidad del complejo everolimus gamma CD preparado usando acetona como solvente frente a everolimus amorfo.

Figura 4: Perfil de HPLC/MS del complejo rapamicina gamma CD.

Figura 5: Perfil de HPLC/MS del complejo everolimus gamma CD.

5 Figura 6: Perfil de HPLC/MS del complejo temsirolimus gamma CD.

Figura 7: Perfil de HPLC/MS del complejo pimecrolimus gamma CD.

Figura 8: Perfil de HPLC/MS del complejo tacrolimus gamma CD.

10 Figura 9: Perfiles de HPLC/UV y HPLC/MS de rapamicina.

Figura 10: Perfiles de HPLC/UV y HPLC/MS de everolimus.

15 Figura 11: Perfiles de HPLC/UV y HPLC/MS de temsirolimus.

Figura 12: Perfiles de HPLC/UV y HPLC/MS de pimecrolimus.

Figura 13: Perfiles de HPLC/UV y HPLC/MS de tacrolimus.

20 Figura 14: DRX de rapamicina (material de partida) tratada con secador por rociado.

Figura 15: DRX de pimecrolimus (material de partida) tratada con secador por rociado.

25 Figura 16: DRX de temsirolimus (material de partida) tratada con secador por rociado.

Figura 17: DRX de tacrolimus (material de partida) tratada con secador por rociado.

Figura 18: DRX de everolimus (material de partida) tratada con secador por rociado.

30 Figura 19: DRX de gamma CD (material de partida).

Figura 20: DRX de rapamicina cristalina (material de partida).

35 Figura 21: DRX del complejo rapamicina y gamma CD ciclodextrina.

Figura 22: DRX de una mezcla física de gamma CD y rapamicina (0,6% p/p).

40 Figura 23: Espectros de DRX expandidos solapados, en el intervalo de 3 y 30 2θ, de: una mezcla física de gamma CD y rapamicina (0,6% p/p; en color verde), el DRX de rapamicina cristalina (en color rojo) y el DRX del complejo rapamicina gamma CD (en azul).

Descripción de la invención

45 Las siguientes definiciones se usan a lo largo de la especificación y las reivindicaciones.

El término "alfa ciclodextrina", o "alfa CD" se refiere al compuesto identificado con el número de registro 10016-20-3, también denominado ciclomaltohexaosa.

50 El término "beta ciclodextrina", o "beta CD" se refiere al compuesto identificado con el número de registro 7585-39-9, también denominado ciclomaltoheptaosa. El término "gamma ciclodextrina", o "gamma CD" se refiere al compuesto identificado con el número de registro 17465-86-0, también denominado ciclomaltooctaosa.

El término "amorfo" se refiere a un estado sólido de un compuesto que es no cristalino.

55 El término "macrólido" como se usa en el presente documento, se refiere a rapamicina, temsirolimus, everolimus, pimecrolimus y tacrolimus.

60 El fin de la presente invención era mejorar tanto la estabilidad como la solubilidad de macrólidos cuando se adsorben en ciclodextrina, mediante la formación de un complejo de inclusión. Como saben bien los expertos en la materia estos complejos con frecuencia muestran propiedades fisicoquímicas alteradas comparadas con la molécula invitada, tal como solubilidad acuosa, estabilidad o biodisponibilidad aumentadas.

65 Un objeto de la presente invención es por tanto proporcionar complejos de inclusión de macrólidos con gamma ciclodextrina, que se pueden usar para fines de formulación al tiempo que posiblemente se disminuye la toxicidad de los materiales acompañantes habitualmente empleados para fines de formulación.

Realmente, se ha encontrado sorprendentemente que las gamma ciclodextrinas muestran un efecto positivo sobre la estabilidad de macrólidos y previenen la precipitación de soluciones acuosas sobresaturadas sin usar un solvente orgánico como cosolvente. Otro objeto de la presente invención es por tanto una solución acuosa de estos complejos, que no contenga ningún solvente orgánico.

Un objeto adicional de la presente invención es el uso de estos complejos para preparar formulaciones orales, oftálmicas, tópicas e inyectables, así como el uso de tales complejos y/o formulaciones como agentes inmunosupresores.

Para proceder con estudios formulativos se han realizado pruebas de estabilidad preliminares en rapamicina micronizada (10^{-5} micrómetros) y en solución (etanol). Los resultados obtenidos por nosotros confirman que este producto finamente micronizado y en solución es inestable: a las pocas horas se observó una disminución sensible (-10%) en el valor del ensayo.

Se hicieron varios intentos para estabilizar la rapamicina amorfa, o rapamicina finamente micronizada, de la degradación sin éxito: la adición de antioxidantes, como alfa tocoferol y ácido ascórbico, no pudo controlar esta degradación incluso trabajando en una atmósfera inerte (nitrógeno) y en condiciones refrigeradas (0-4°C).

Este comportamiento se observó solo en rapamicina micronizada por debajo de 20 micrómetros, en rapamicina amorfa y en solución pero no en rapamicina cristalina con un tamaño de partícula mayor (es decir, >100 micrómetros).

En la tabla 1 y en la correspondiente figura 1 se describen los datos de estabilidad obtenidos a 60°C en rapamicina en una forma amorfa y cristalina (productos con un tamaño de partícula > 100 micrómetros): mientras que la rapamicina cristalina presenta después de 408 horas (17 días) la misma pureza cromatográfica, la rapamicina amorfa muestra una disminución del -14% de pureza cromatográfica.

Tabla 1: Disminución de la pureza cromatográfica (datos de HPLC; % de área) de rapamicina amorfa y de rapamicina cristalina (60°C durante 17 días (408 horas))

Horas	Rapamicina amorfa	Rapamicina cristalina
0	98,90	99,10
20	93,00	99,10
96	90,00	99,10
168	88,00	99,00
408	84,90	99,00

Hemos verificado que la misma degradación se produce incluso en algunos derivados sintéticos de rapamicina (es decir, temsirolimus y everolimus) y también en pimecrolimus y tacrolimus.

Para superar estos problemas de estabilidad se decidió estudiar la posibilidad de estabilizar estos macrólidos de la degradación mediante la formación de un complejo con ciclodextrinas comercialmente disponibles y, entre varios compuestos de esta familia, de alfa ciclodextrina (alfa CD), beta ciclodextrina (beta CD) y gamma ciclodextrina (gamma CD). Estos oligosacáridos cíclicos tienen la característica común de estar compuestos de 6, 7 y 8 unidades de α -D-glucopiranosido unidas 1 \rightarrow 4.

Un estudio preliminar sobre la movilidad cromatográfica de HPLC de estos macrólidos en presencia de ciclodextrinas confirma que la interacción entre estos macrólidos y ciclodextrina era muy débil.

El primer macrólido evaluado por nosotros fue rapamicina adsorbida en alfa ciclodextrina (alfa CD), beta ciclodextrina (beta CD) y gamma ciclodextrina (gamma CD).

Para preparar estos complejos, se disolvió rapamicina en un solvente orgánico, preferiblemente un solvente orgánico polar, seleccionado entre acetona, metanol y etanol, después estas soluciones se mezclaron con las ciclodextrinas. Para obtener un complejo soluble en agua, la proporción en peso entre rapamicina, o uno de sus derivados, y una ciclodextrina está ventajosamente comprendida entre 1:100 y 1:400, más preferiblemente entre 1:111 y 1:333. A continuación la mezcla heterogénea obtenida evaporada cuidadosamente al vacío para dar los complejos como un polvo sólido; el polvo sólido húmedo se evaporó después al vacío. Se realizaron alternativas adecuadas a la evaporación al vacío de la mezcla heterogénea de rapamicina y ciclodextrinas con la técnica del secado por rociado, por filtración directa de la suspensión o por liofilización. Dicha filtración se puede realizar opcionalmente diluyendo dicha mezcla heterogénea con un solvente orgánico, preferiblemente un solvente orgánico apolar, más preferiblemente un hidrocarburo lineal o ramificado de C₅-C₈.

Los complejos obtenidos se evaluaron primero para la estabilidad en solución a 20-25°C y como polvo sólido almacenado a -20°C.

5 Los datos de estabilidad en solución (mezcla agua/acetonitrilo 1/1 v/v) indican que, entre los complejos de ciclodextrinas evaluados, el complejo de gamma CD muestra en el tiempo cero el mayor contenido de rapamicina; además los complejos de gamma CD y beta CD después de 19 días en solución a 20-25°C, no muestran una disminución del valor de ensayo inicial mientras que, en las mismas condiciones de almacenamiento, el complejo de alfa CD muestra una disminución en el valor de ensayo de -24% (tabla 2 en la sección experimental).

10 Los datos de estabilidad obtenidos en los complejos sólidos (polvo) almacenado a -20°C después de 26 días muestra una disminución en el valor de ensayo del -12% para alfa CD y del -5,4% para beta CD mientras que el contenido en rapamicina del complejo de gamma CD, en las mismas condiciones experimentales, no cambia (tabla en la sección experimental).

15 Sorprendentemente, a pesar de la semejanza química de las ciclodextrinas empleadas que se diferencian solo en 1 y 2 unidades de α -D-glucopiranosido, solo el complejo de gamma CD con rapamicina mostró buenos datos de estabilidad tanto en solución como en forma sólida.

20 Estos datos preliminares se confirmaron además en estado sólido (polvo) en diferentes condiciones de almacenamiento: a 25°C (humedad relativa del 60%) y a 40°C (humedad relativa del 75%) después de 5 y 15 días (tablas 4 y 5 en la sección experimental).

25 Por tanto, se confirmó que no solo el complejo rapamicina gamma CD era más estable que los complejos de alfa y beta CD, tanto a 25°C como a 40°C sino que la liberación de rapamicina del complejo con gamma CD a 40°C era casi cuantitativa (el 95% de recuperación de la rapamicina cargada en CD).

30 En base a estos datos sorprendentemente se encontró que, en nuestras condiciones experimentales, solo gamma CD era capaz de estabilizar rapamicina de la degradación, tanto en solución como en estado sólido mientras que los complejos de alfa y beta CD con rapamicina eran inestables.

35 Los datos de la bibliografía no describen la posibilidad de estabilizar rapamicina de la degradación mediante la formación de un complejo lábil con gamma CD. Además este comportamiento peculiar de gamma ciclodextrina es bastante diferente de los compuestos parentales alfa y beta CD que, desde un punto de vista estructural son muy similares y con frecuencia se consideran equivalentes para utilizarse para fines de formulación.

40 Esta posibilidad para estabilizar rapamicina a la degradación mediante un complejo con gamma CD se exploró adicionalmente en everolimus, temsirolimus, tacrolimus y pimecrolimus mostrando que estos compuestos estructuralmente relacionados tienen un comportamiento común: mientras que el compuesto puro en una forma amorfa, o finamente micronizado (es decir, con una distribución de tamaño de partícula de 10^{-5} micrómetros), es inestable, el correspondiente complejo de gamma CD es estable tanto en solución como en estado sólido. En la figura 3 y la tabla 7 se describen los datos de estabilidad del complejo de everolimus frente a everolimus amorfo: después de 96 horas a 60°C el aumento de los subproductos relacionados con la degradación en el complejo de everolimus es de +36% mientras que everolimus amorfo es del +513%. Se obtuvieron datos similares para el complejo de gamma CD con temsirolimus y el complejo de gamma CD con pimecrolimus.

45 Los datos analíticos realizados en estos complejos comprenden caracterización por HPLC/MS, HPLC/UV (véanse las figuras 4-13) y los datos de difracción de rayos X (DRX; véanse las figuras 14-23): estos datos analíticos confirman que la técnica de adsorción empleada no modifica el perfil de impurezas de los macrólidos y el estado sólido de gamma CD mientras que todos los macrólidos evaluados después del tratamiento con solvente están en una forma amorfa prevalente. Los datos de DRX producidos en los complejos obtenidos confirman que los macrólidos están presentes en una forma amorfa prevalente. Por último, para todos los complejos de macrólidos examinados con gamma CD se ha verificado un aumento sensible en la solubilidad en agua de los macrólidos originales; como se indica en la tabla a continuación.

55 Tabla 8. Solubilidad en agua (datos en mol/l, determinados a 20-25°C) de complejos de macrólidos con gamma CD frente al correspondiente macrólido utilizado como material de partida.

	Solubilidad en agua (mol/l) del material de partida (macrólido)*	Solubilidad en agua (mol/l) de los complejos macrólido gamma CD
Rapamicina	$6,7 \times 10^{-4}$	>0,01
Temsirolimus	0,011	>0,01
Everolimus	$1,9 \times 10^{-3}$	>0,01
Tacrolimus	7×10^{-5}	$>5 \times 10^{-3}$
Pimecrolimus	$5,3 \times 10^{-6}$	$>0,4 \times 10^{-4}$

* Calculado usando el software Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) V8.14.

Sección experimental**Materiales y métodos**

5 Rapamicina, temsirolimus, everolimus, tacrolimus y pimecrolimus fueron preparados por POLI INDUSTRIA CHIMICA SpA. Alfa ciclodextrina (alfa CD), beta ciclodextrina (beta CD) y gamma ciclodextrina (gamma CD) se compraron de Fluka.

10 Los métodos de HPLC usados para la determinación de ensayo y pureza para rapamicina, temsirolimus, everolimus, tacrolimus y pimecrolimus se describen en el presente documento.

15 Para la determinación por HPLC de la pureza cromatográfica de rapamicina: Columna: Thermo BDS Hypersil C18; 3 µm (100 x 4,6 mm). Composición de la fase móvil: elución isocrática

- Componente A: acetonitrilo al 50%
- Componente B: tampón acetato de amonio al 50% pH 5,8 (concentración de acetato de amonio 0,8 g/l; el valor de pH final se llevó a un valor final de 5,8 con ácido acético glacial).

20 Velocidad de flujo: 1,0 ml/min. Temperatura de la columna: 55°C. Volumen de inyección: 100 µl.

Solución de la muestra: pesar 25 mg de rapamicina y disolver en 100 ml de acetonitrilo/agua 1/1 v/v (concentración final 0,25 mg/ml). Detector de UV: 278 nm.

25 Para la determinación del ensayo de HPLC de rapamicina: Columna: Hypersil BDS-C18; 3 µm (100 x 4,6 mm). Composición de la fase móvil: elución isocrática

- Componente A: acetonitrilo al 58%
- Componente B: tampón acetato de amonio al 42% pH 5,8 (concentración de acetato de amonio 0,8 g/l; el valor de pH final se llevó a un valor final de 5,8 con ácido acético glacial).

30 Velocidad de flujo: 1,5 ml/min. Temperatura de la columna: 55°C. Volumen de inyección: 30 µl.

35 Solución de muestra y estándar: preparar una solución madre a la concentración de 0,25 mg/ml en acetonitrilo/agua 1/1, después diluir con fase móvil para obtener una concentración final de 20 microgramos/ml. Detector de UV: 278 nm.

40 Para la determinación por HPLC de la pureza cromatográfica de temsirolimus y everolimus: Columna: Zorbax SB-C18 3,5 µm (75 x 4,6 mm), Precolumna: Symmetry Shield RP18; 5 µm (20 x 3,9 mm).

Composición de la fase móvil:

- Componente A: 900 ml de agua, 100 ml de acetonitrilo y 50 µl de ácido acético acuoso al 50%
- Componente B: 1000 ml de acetonitrilo y 50 µl de ácido acético acuoso al 50%.

45 Elución en gradiente:

Tiempo (min)	Componente A	Componente B
0	60	40
10	55	45
25	30	70
65	30	70
66	60	40
70	60	40

50 Velocidad de flujo: 1 ml/min. Temperatura de la columna: 60°C. Volumen de inyección: 20 µl. Preparación de la muestra: solución de 0,5 mg/ml en acetonitrilo. Detector de UV: 278 nm.

Para la determinación por HPLC de la pureza cromatográfica de pimecrolimus: Columna: YMC ODS AQ, 5 µm (250 x 4,6 mm). Composición de la fase móvil: elución isocrática con acetonitrilo/tampón fosfato 0,01 M (pH 2,5) 70/30.

55 Velocidad de flujo: 1,2 ml/min. Temperatura de la columna: 60°C. Temperatura de la muestra 10°C. Volumen de inyección 10 µl. Solución de muestra: preparar una solución 0,5 mg/ml de pimecrolimus en acetonitrilo. Detector de UV: 210 nm.

Para la determinación por HPLC de la pureza cromatográfica de tacrolimus: Columna: Symmetry C18; 3,5 µm (150 x 2,1 mm). Composición de la fase móvil: elución isocrática.

- Componente A: 58% de solución acuosa de ácido acético al 0,1%
- Componente B: acetonitrilo al 15%
- Componente C: tetrahidrofurano al 27%

Velocidad de flujo: 0,3 ml/min. Temperatura de la columna: 50°C. Volumen de inyección: 10 µl.

10 Solución de muestra: pesar 25 mg de tacrolimus y disolver en 25 ml de acetonitrilo/agua 1/1 v/v (concentración final 1 mg/ml). Detector de UV: 278 nm.

El espectrómetro de masas utilizado es una trampa de iones Agilent Mod. 6300 en ionización positiva.

15 El equipo de secado por rociado utilizado es un Buchi modelo B290 equipado con un dispositivo de bucle inerte Advance B-295.

20 Los espectros de DRX (polvo) se registraron usando un difractor (PW1710 Philips) desde un ángulo inicial [1/2 2θ] de 5000 a 60000. Los diagramas de difracción se obtuvieron empleando un ánodo de Cu (Kα = 1,54060 Å y Kα = 1,54439 Å) sin ningún tratamiento físico de las muestras.

Ejemplo 1 - Preparación de complejo rapamicina/ciclodextrina sólido, reconstituible por secado; (etanol al 95%) como solvente

25 Una solución de rapamicina al 0,4% p/v en etanol (96%) se añadió a polvo de ciclodextrina. La proporción relativa final entre rapamicina y ciclodextrina se describe en las tablas 2 y 3.

30 Esta suspensión se mantuvo con agitación a 20-25°C durante 30 minutos después la mezcla obtenida se secó al vacío durante 18 horas para eliminar el etanol. El polvo sólido seco se almacenó a -20°C en una atmósfera de nitrógeno.

En la tabla 2 se describen los datos de ensayo (datos de HPLC) de los complejos rapamicina/CD en solución (mezcla de acetonitrilo/agua 1/1) a 20-25°C a t=0 y después de 19 días.

35 Tabla 2. Estabilidad de rapamicina/CD en solución (agua/acetonitrilo 1/1) a t=0 y después de 19 días almacenado a 20-25°C

Tiempo (días)	% de rapamicina sobre CD (% de recuperación calculado sobre la cantidad de rapamicina cargada)		
	alfa CD	beta CD	gamma CD
Cantidad inicial cargada	0,63	0,63	0,60
0	0,41 (65,6%)	0,37 (59,2%)	0,43 (71,67%)
19	0,31 (49,60%)	0,37 (59,20%)	0,43 (71,67%)
Disminución en el valor de ensayo después de 19 días (%)	-24,39	0	0

40 En la tabla 3 se describen los datos de ensayo (datos de HPLC) de complejos de rapamicina/CD (polvo) almacenados a -20°C a t=0 y después de 26 días.

Tabla 3. Estabilidad de rapamicina/CD (polvo) a t=0 y después de 6 días almacenado a -20°C

Tiempo (días)	% de rapamicina sobre CD (% de recuperación calculado sobre la cantidad de rapamicina cargada)		
	alfa CD	beta CD	gamma CD
Cantidad inicial cargada	0,63	0,63	0,60
0	0,41 (65,6%)	0,37 (59,2%)	0,43 (71,67%)
26	0,36 (57,6%)	0,35 (56,0%)	0,43 (71,67%)
Disminución en el valor de ensayo después de 26 días (%)	-12,2	-5,4	0

45 Se describen datos adicionales del complejo rapamicina/CD (polvo) almacenado a 25°C (HR del 60%) y a 40°C (HR del 75%) después de 5 y 15 días, respectivamente en las tablas 4 y 5. En estas tablas se describen los valores de ensayo de HPLC.

Tabla 4. Datos de estabilidad del complejo rapamicina/CD a 25°C, HR del 60% (los datos descritos son datos de ensayos en % de área)

Datos de estabilidad a 25°C, HR del 60%				
	Tiempo = 0	Tiempo = 5 días	Tiempo = 15 días	Tiempo = 15 días (repetido)
Alfa CD	0,38	0,32	0,33	0,34
Beta CD	0,36	0,31	0,30	0,31
Gamma CD	0,37	0,46	0,41	0,42

5 Tabla 5. Datos de estabilidad del complejo rapamicina/CD a 40°C (los datos descritos son datos de ensayos en % de área)

Datos de estabilidad a 40°C, HR del 75%				
	Tiempo = 0	Tiempo = 5 días	Tiempo = 15 días	Tiempo = 15 días (repetido)
Alfa CD	0,38	0,64	0,53	0,55
Beta CD	0,36	0,48	0,41	0,42
Gamma CD	0,37	0,42	0,50	0,52

10 **Ejemplo 2- Preparación de complejo rapamicina/ciclodextrina sólido, reconstituible por secado; acetona como solvente**

Una solución de rapamicina al 0,4% p/v en acetona se añadió a gamma ciclodextrina. La proporción relativa final entre rapamicina y ciclodextrina fue el 0,6% p/p. La suspensión obtenida se mantuvo con agitación a 20-25°C durante 30'. La mezcla obtenida se secó al vacío durante 18 horas para eliminar la acetona. Opcionalmente el sólido húmedo se puede recuperar por dilución de la suspensión con n-heptano y filtración; después se transfiere a un secador.

El polvo sólido seco se almacenó a -20°C en una atmósfera de nitrógeno.

20 Los datos de estabilidad del complejo rapamicina/gamma CD (polvo) obtenido a 60°C se compararon con los obtenidos usando como solventes etanol anhidrido y etanol al 96%; los datos obtenidos se resumen en la figura 2 y la tabla 6. En particular, en la figura 2 se describe la suma de los subproductos relacionados originados por degradación (datos de HPLC) durante una prueba de estabilidad realizada en el polvo a 60°C durante 696 horas.

25 Tabla 6. Estabilidad del complejo rapamicina/gamma CD preparado usando diferentes solventes: etanol anhidrido, etanol al 96% y acetona. En esta tabla se describe la suma de los subproductos relacionados originados por degradación (datos de HPLC) durante las pruebas de estabilidad realizadas en el polvo a 60°C durante 696 horas.

Tiempo (horas)	Etanol al 96%	Etanol anhidrido	Acetona
0	0,2	0,1	0,2
20	0,7	1	0,5
96	1,3	2,2	0,7
168	1,9	2,6	1,1
456	2,8	4,1	1,3
696	2,8	6,2	1,5

30 **Ejemplo 3- Preparación de complejo rapamicina/ciclodextrina sólido, reconstituible por secado por rociado; acetona como solvente**

35 Una solución de rapamicina al 0,1% p/v en acetona se añadió a gamma ciclodextrina. La proporción relativa final entre rapamicina y ciclodextrina fue el 0,6% p/p. La suspensión obtenida se mantuvo con agitación a 20-25°C durante 30'.

La suspensión obtenida se trató con un secador por rociado en las siguientes condiciones experimentales.

- Temperatura de la entrada de nitrógeno = 70°C
- Velocidad de alimentación = 17 ml/min
- Temperatura de la salida de nitrógeno = 54°C
- Velocidad del aspirador = 80%
- Frecuencia de la limpieza de la boquilla = 2 inyecciones/segundo

El polvo sólido obtenido se secó a 30°C durante 8 horas después se almacenó a -20°C en una atmósfera de nitrógeno. Las características de este complejo son las mismas descritas para los productos obtenidos en el ejemplo 2.

5 **Preparación del complejo gamma CD everolimus, complejo gamma CD temsirolimus, complejo gamma CD tacrolimus y complejo gamma CD pimecrolimus**

Estos complejos se prepararon según cada uno de los ejemplos 2 y 3.

10 **Datos de HPLC, UV y MS del complejo gamma CD rapamicina, complejo gamma CD everolimus, complejo gamma CD temsirolimus, complejo gamma CD pimecrolimus y complejo gamma CD tacrolimus y de los macrólidos correspondientes utilizados como material de partida**

15 Los perfiles de HPLC (HPLC y detector de UV) de todos los complejos se recogen en las figuras 4-8. Para cada complejo se han utilizado las condiciones cromatográficas de HPLC específicas descritas en la sección experimental.

20 **Figura 4. Complejo rapamicina gamma CD** = la corriente iónica total (TIC), el ion único a $m/z=952$ (aducto del ion molecular de rapamicina con potasio; $m/z=952$), el ion único a $m/z=1319$ (el aducto de gamma ciclodextrina con sodio; $m/z=1319$)

25 **Figura 5. Complejo everolimus gamma CD** = la corriente iónica total (TIC), el espectro de UV (278 nm), el ion único a $m/z=1026$ (aducto del ion molecular de everolimus con potasio), el ion único a $m/z=1297$ (ion molecular de gamma ciclodextrina)

Figura 6. Complejo temsirolimus gamma CD = la corriente iónica total (TIC), el espectro de UV (278 nm), el ion único a $m/z=1048$ (aducto del ion molecular de temsirolimus con amoniaco), el ion único a $m/z=1297$ (ion molecular de gamma ciclodextrina)

30 **Figura 7. Complejo pimecrolimus gamma CD** = la corriente iónica total (TIC), el espectro de UV (210 nm), el ion único a $m/z=848$ (aducto del ion molecular de pimecrolimus con potasio), el ion único a $m/z=1297$ (ion molecular de gamma ciclodextrina)

35 **Figura 8. Complejo tacrolimus gamma CD** = la corriente iónica total (TIC), el espectro de UV (220 nm), el ion único a $m/z=1297$ (ion molecular de gamma ciclodextrina), el ion único a $m/z=822$ (aducto del ion molecular de tacrolimus con agua)

40 Se encontró que los perfiles cromatográficos de HPLC UV y MS de estos complejos de macrólidos a $t=0$ no cambiado del correspondiente macrólido utilizado como material de partida.

Los análisis de HPLC/MS y HPLC/UV de cada macrólido utilizado como material de partida para la preparación de los complejos con CD se describen aquí.

45 **Figura 9. Rapamicina** = la corriente iónica total (TIC), el perfil de HPLC/UV y el espectro de masas del isómero principal de rapamicina eluyó a 23'.

Figura 10. Everolimus = la corriente iónica total (TIC), el perfil de HPLC/UV y el espectro de masas del isómero principal de everolimus eluyó a 21'.

50 **Figura 11. Temsirolimus** = la corriente iónica total (TIC), el perfil de HPLC/UV y el espectro de masas del isómero principal de temsirolimus eluyó a 20'.

Figura 12. Pimecrolimus = la corriente iónica total (TIC), el perfil de HPLC/UV y el espectro de masas del isómero principal de pimecrolimus eluyó a 27'.

55 **Figura 13. Tacrolimus** = la corriente iónica total (TIC), el perfil de HPLC/UV y el espectro de masas del isómero principal de tacrolimus eluyó a 11'0" (visible en el espectro adjunto del aducto de agua a $m/z=822$ y el aducto con sodio con $m/z=826$).

60 **Estabilidad del complejo de everolimus con gamma CD**

Los datos de estabilidad sobre el complejo de everolimus con CD preparado según cada uno de los ejemplos 2 y 3 se describen en la figura 3 y en la tabla 7.

65 En particular, en la figura 3, se describe la suma de los subproductos relacionados originados por degradación (datos de HPLC en % de área) durante las pruebas de estabilidad realizadas en el polvo a 60°C durante 96 horas.

Tabla 7. Estabilidad del complejo everolimus/gamma CD preparado usando acetona frente a everolimus amorfo. En esta tabla se describe la suma de los subproductos relacionados originados por degradación (datos de HPLC en % de área) durante las pruebas de estabilidad realizadas en el polvo a 60°C durante 96 horas.

5

	Everolimus amorfo (% del área de HPLC de impurezas totales)	Complejo everolimus CD (% del área de HPLC de impurezas totales)
0	1,5	1,59
24	2,44	1,79
48	4,52	1,87
72	7,1	1,99
96	9,2	2,17
168	14,1	2,62

Estado sólido del complejo gamma rapamicina, complejo gamma CD everolimus, complejo gamma CD temsirolimus, complejo gamma CD tacrolimus y complejo gamma CD pimecrolimus

- 10 El estado sólido de rapamicina cristalina después del tratamiento con el secador por rociado (o después de la evaporación de las soluciones etanólica o de acetona), de gamma CD (material de partida), del complejo rapamicina gamma CD, de rapamicina cristalina (material de partida), y de pimecrolimus, temsirolimus, tacrolimus y everolimus después de un tratamiento del secador por rociado (o después de la evaporación de las soluciones etanólica o de acetona) se describen en las figuras 14-23. Estos análisis confirman que después de la evaporación de las
- 15 soluciones etanólicas o acetónicas estos macrólidos están en una forma amorfa. Los espectros de DRX de los complejos con gamma CD confirman que la fase cristalina de gamma CD no está cambiada, como se subraya tanto en la figura 22 como en la tabla 9 a continuación y, con la resolución de la técnica empleada, no hay vestigios del macrólido en la forma cristalina.
- 20 Tabla 9. En esta tabla se describen los valores 2θ diagnósticos de una mezcla física de gamma CD y rapamicina cristalina (0,6% p/p) y de rapamicina cristalina. El primer sistema en la mezcla física se divide mientras que en la rapamicina cristalina es una reflexión única.

Mezcla física de gamma CD y rapamicina cristalina (0,6% p/p)	Rapamicina cristalina
6,94 y 7,20 2θ	7,24 2θ
14,32 2θ	14,48 2θ

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Complejo de inclusión, de un macrólido con gamma ciclodextrina, en donde la proporción en peso entre dicho macrólido y dicha gamma ciclodextrina está comprendida entre 1:100 y 1:400, **caracterizado en que** dicho macrólido se selecciona de rapamicina, pimecrolimus, temsirolimus, everolimus, tacrolimus.
2. Complejo según la reivindicación 1, en donde dicha proporción en peso entre dicho macrólido y dicha gamma ciclodextrina está comprendida entre 1:111 y 1:333.
- 10 3. Método para la preparación de un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que comprende los siguientes pasos:
 - 15 a. disolución del macrólido en un solvente orgánico para obtener una solución;
 - b. adición de dicha solución a gamma ciclodextrina;
 - c. evaporación de la mezcla.
4. Método según la reivindicación 3, **caracterizado en que** la proporción en peso entre dichos macrólido y gamma ciclodextrina está comprendida entre 1:100 y 1:400.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, **caracterizado en que** la proporción en peso entre dicho macrólido y dicha gamma ciclodextrina está comprendida entre 1:111 y 1:333.
6. Método según la reivindicación 3, en donde dicho solvente orgánico es un solvente orgánico polar.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, en donde dicho solvente orgánico polar se selecciona de acetona, metanol y/o etanol.
8. Método según la reivindicación 3, en donde dicha evaporación se realiza al vacío, secado por rociado, filtración y/o liofilización.
- 30 9. Método según la reivindicación 8, en donde dicha filtración se realiza diluyendo con un solvente orgánico, preferiblemente un solvente orgánico apolar, más preferiblemente un hidrocarburo lineal o ramificado de C₅-C₈.
- 35 10. Composición farmacéutica que contiene un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 40 11. Composición según la reivindicación 10, **caracterizada en que** dicha composición es una forma farmacéutica sólida.
12. Composición según la reivindicación 10, **caracterizada en que** dicha composición es una solución acuosa.
13. Composición según la reivindicación 12, **caracterizada en que** dicha solución acuosa no contiene ningún solvente orgánico.
- 45 14. Composición según la reivindicación 10, para uso oral, oftálmico, tópico o parenteral.

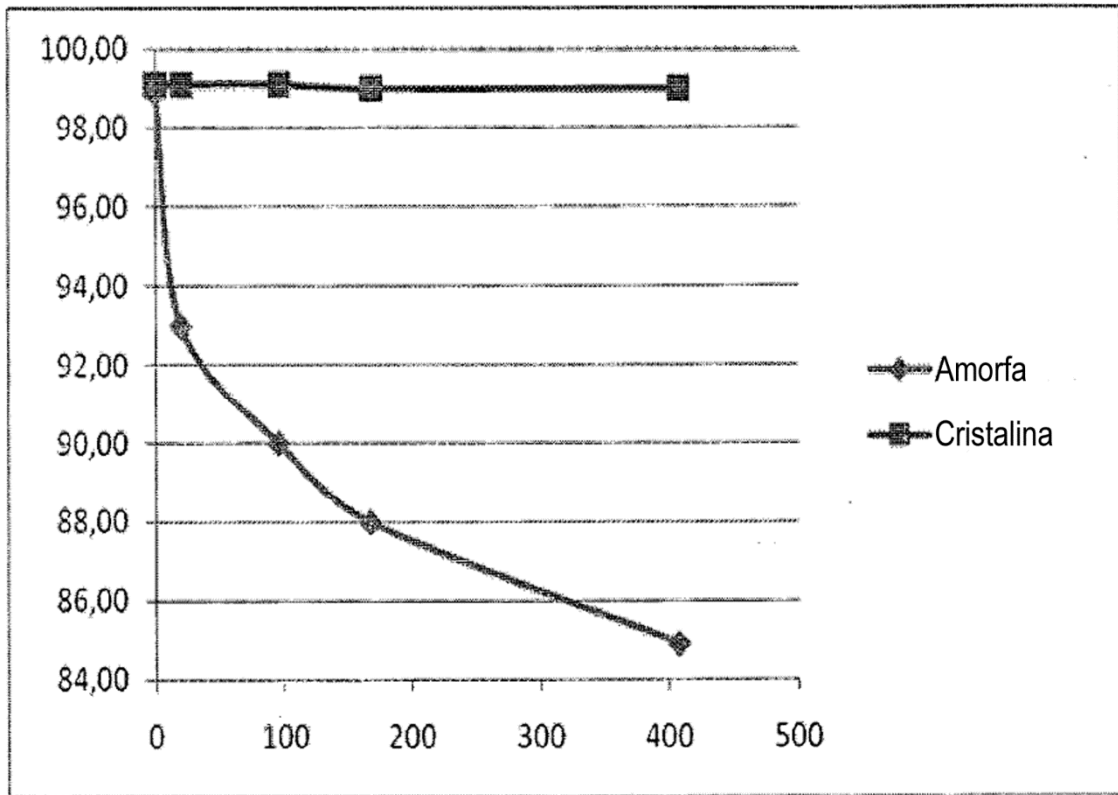


Figura 1

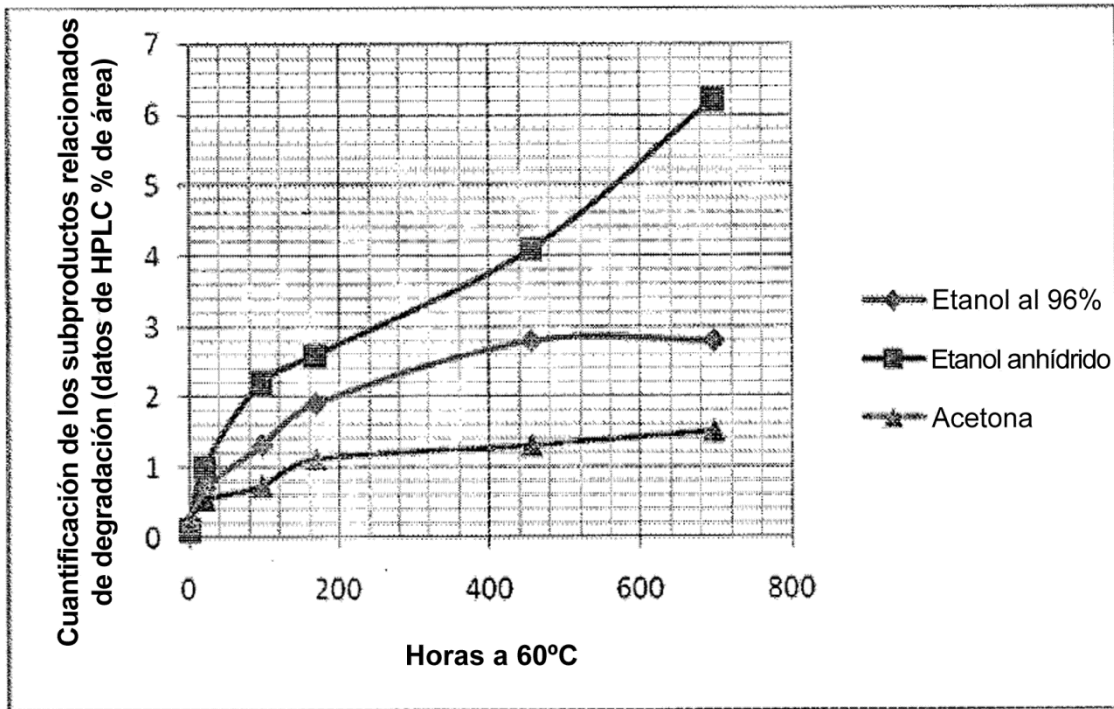


Figura 2

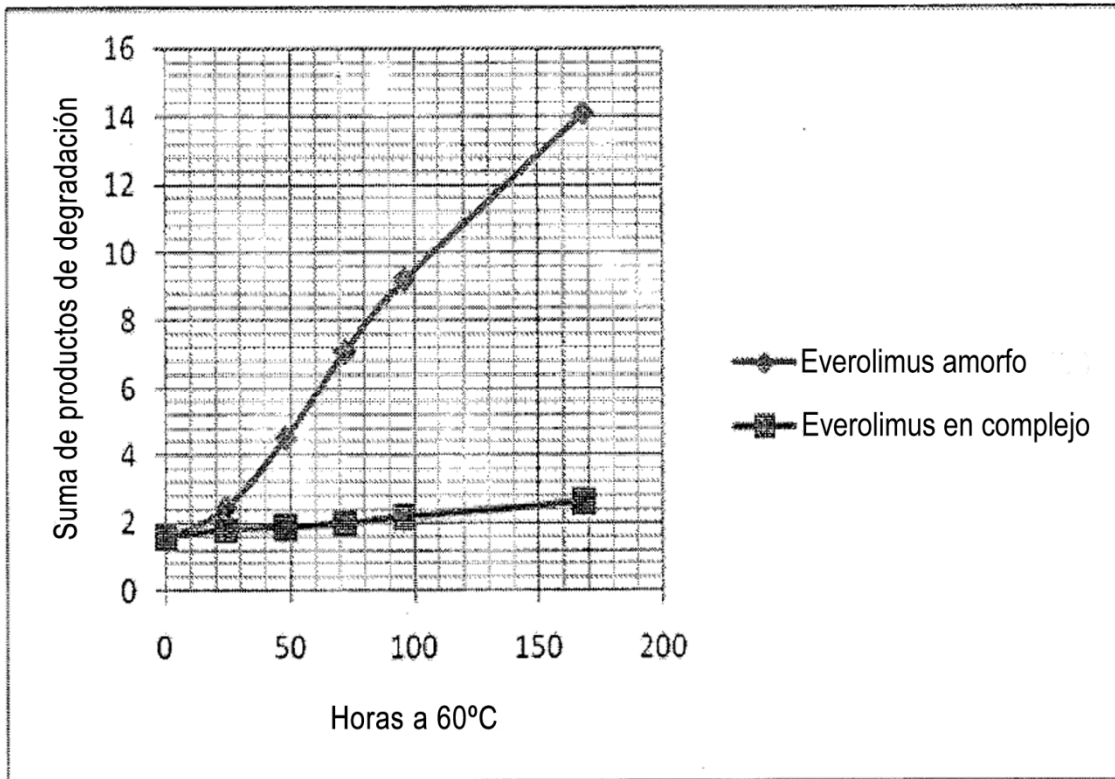


Figura 3

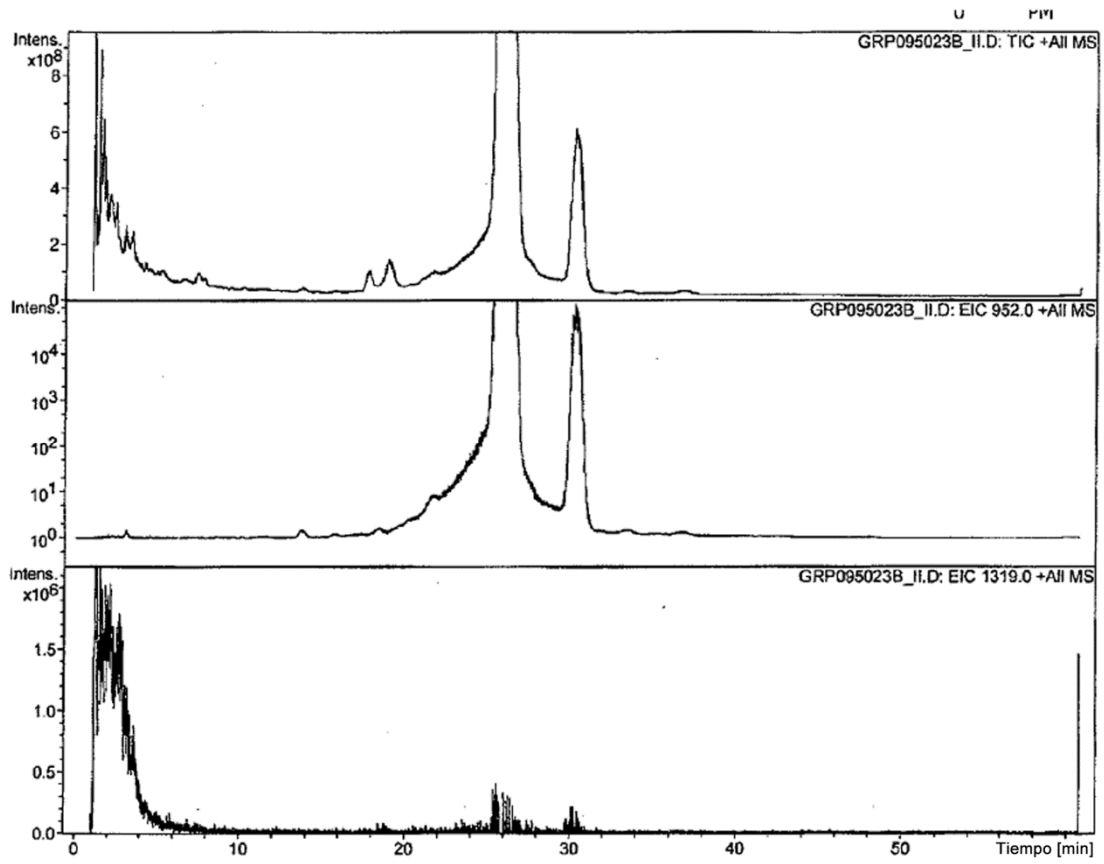


Figura 4

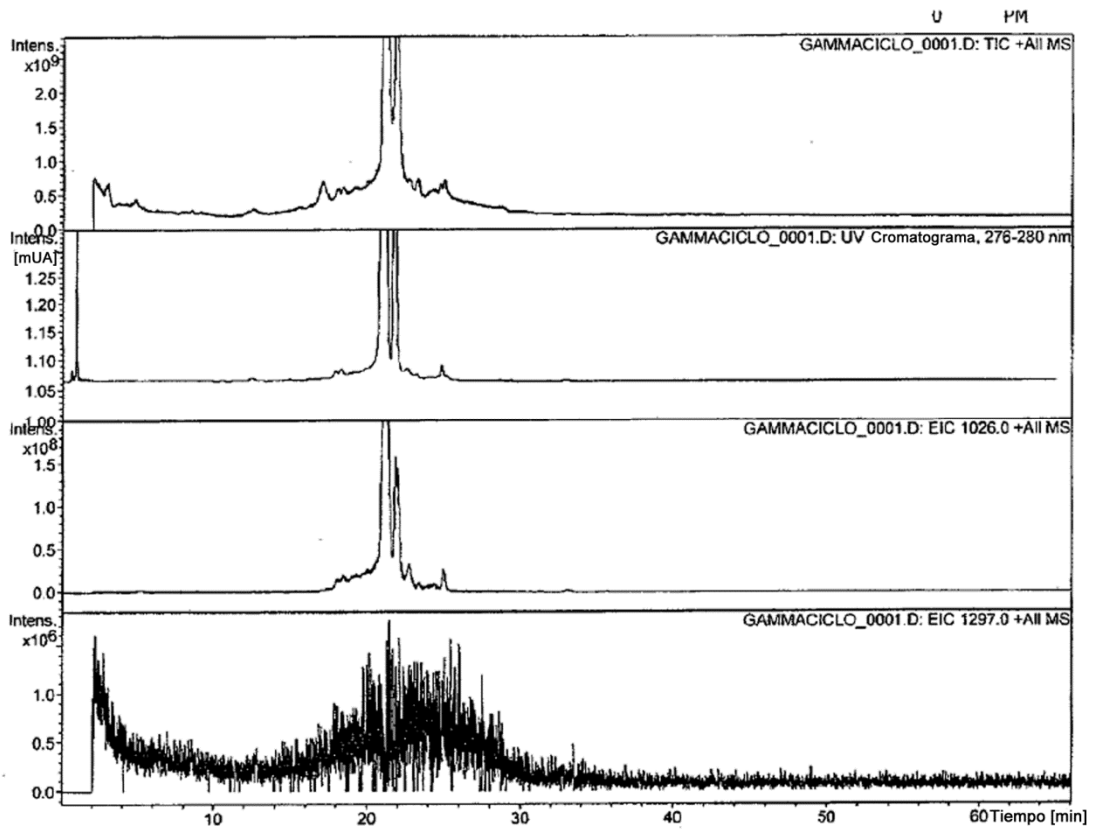


Figura 5

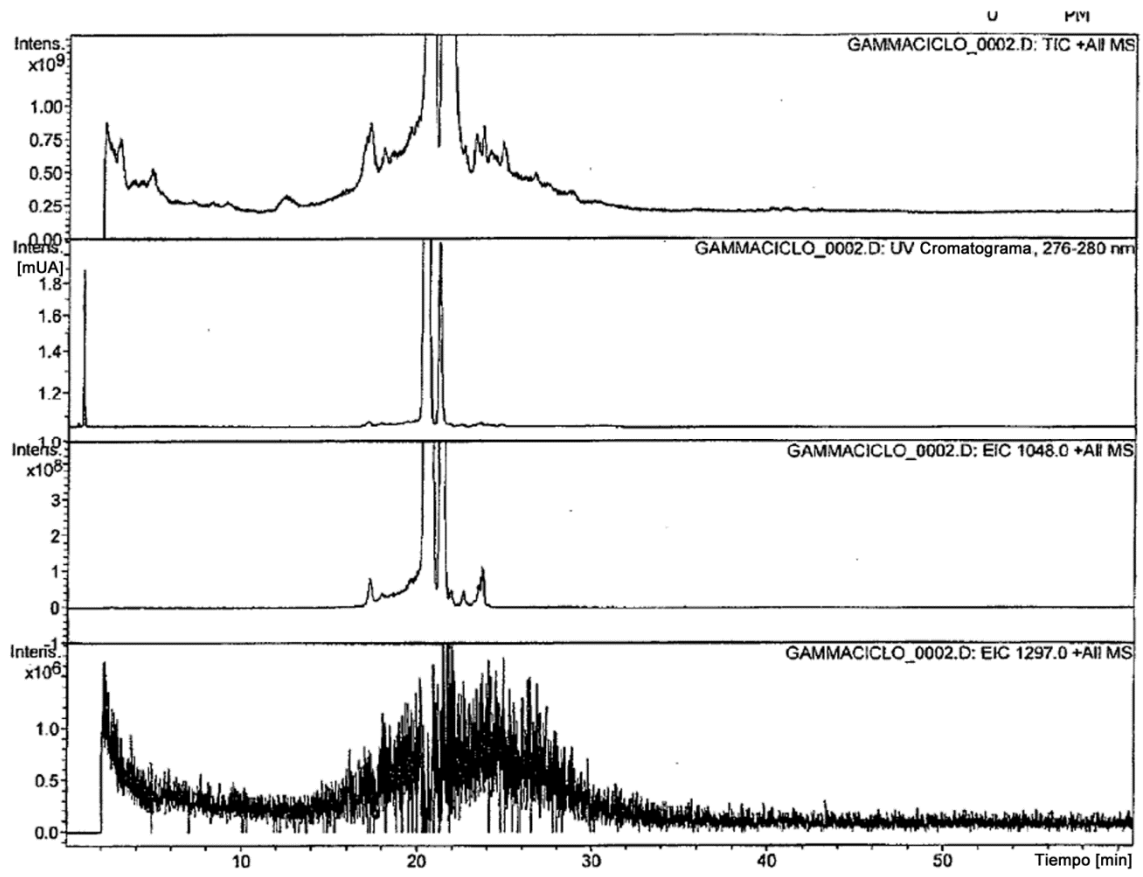


Figura 6

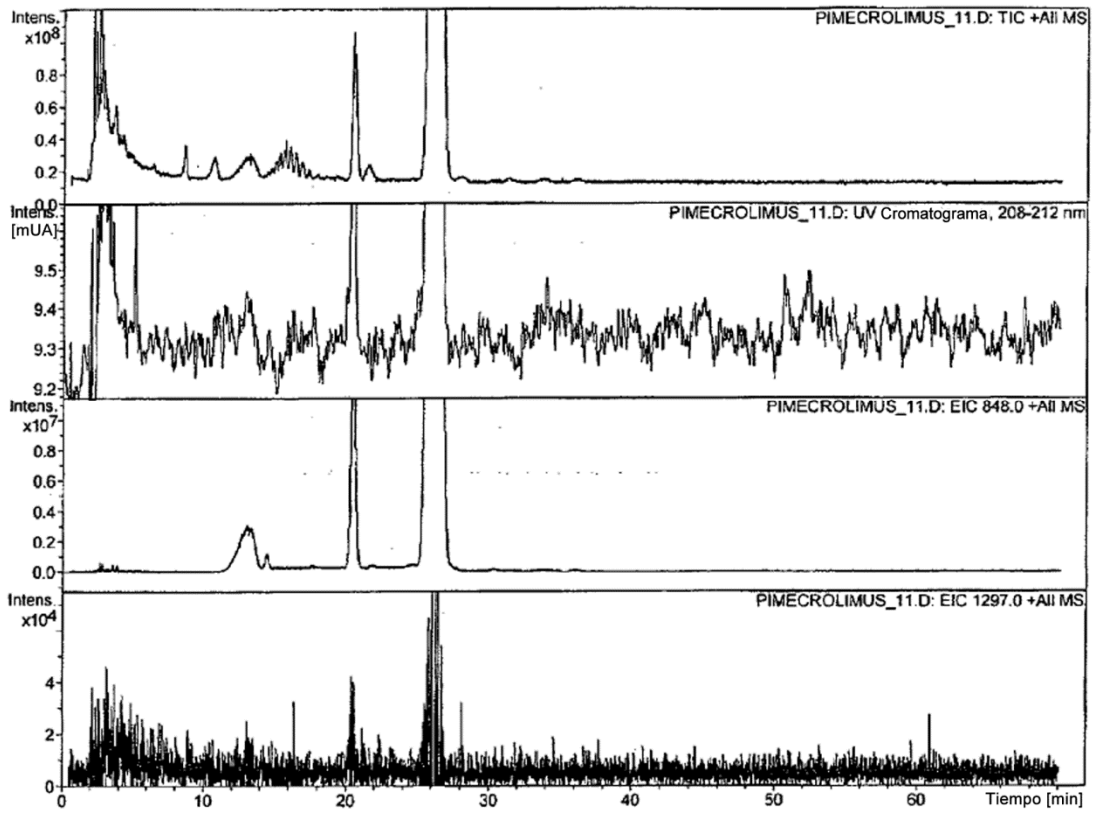


Figura 7

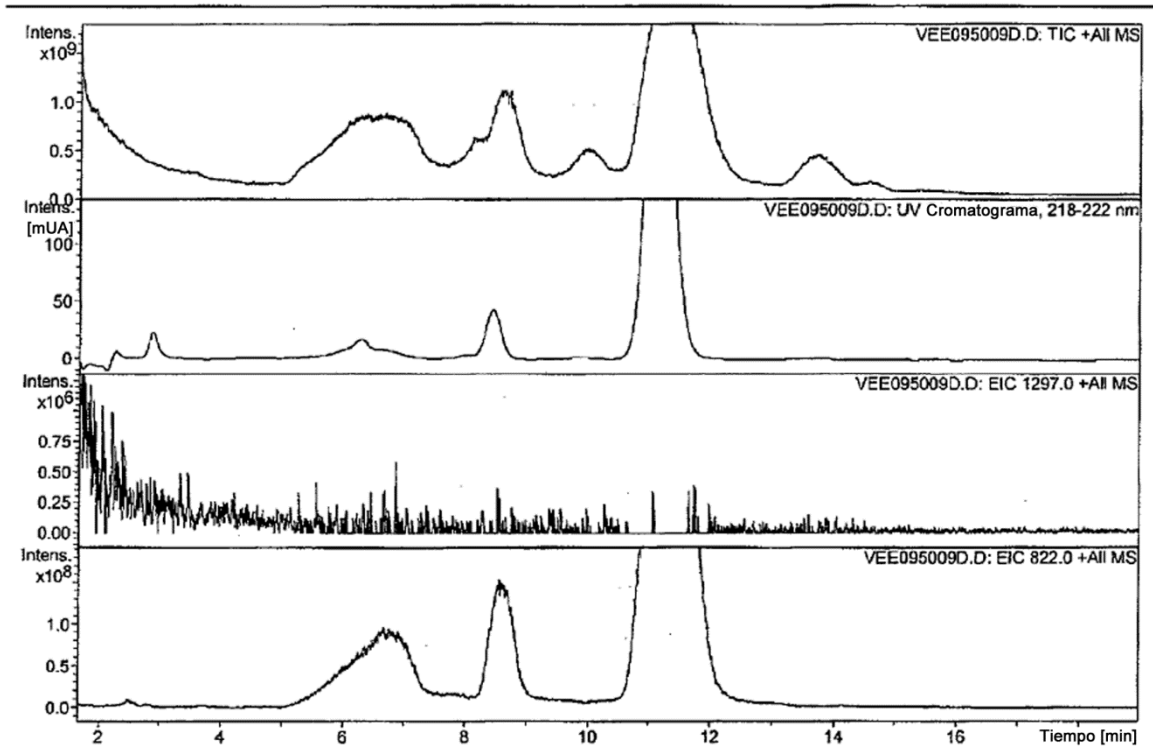


Figura 8

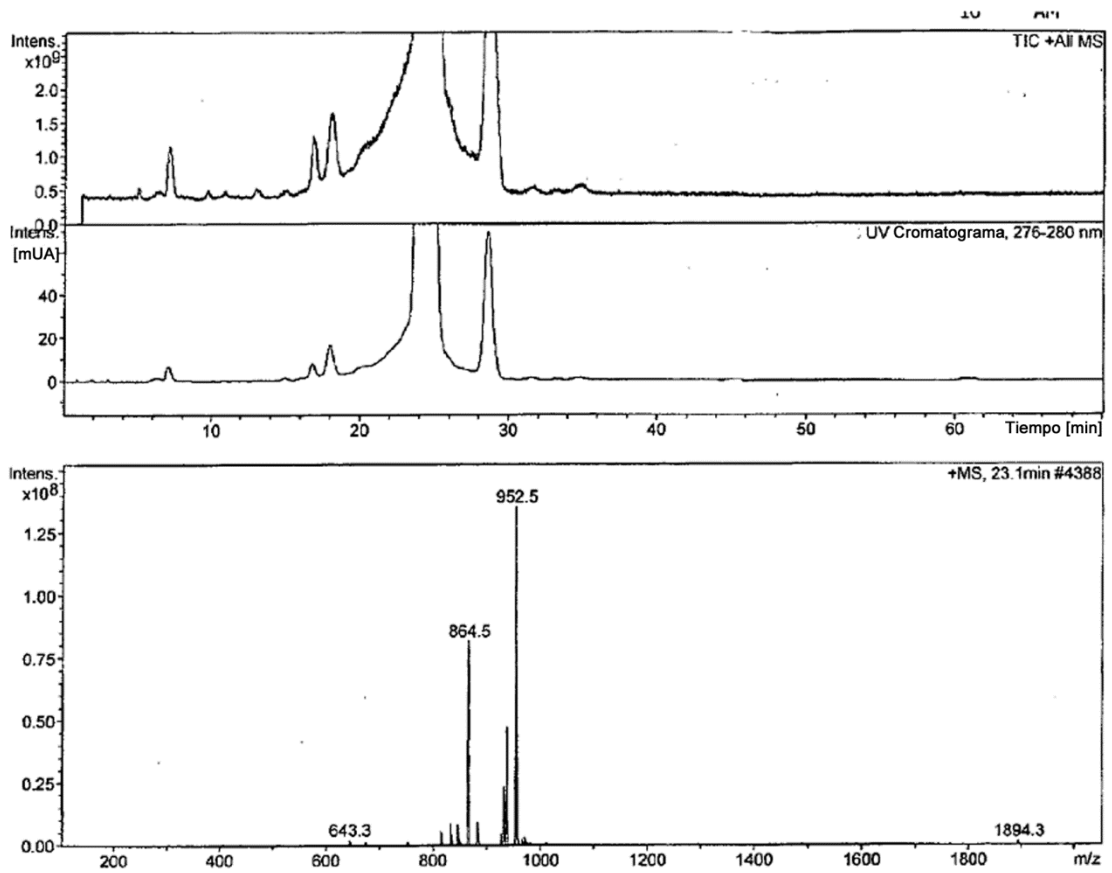


Figura 9

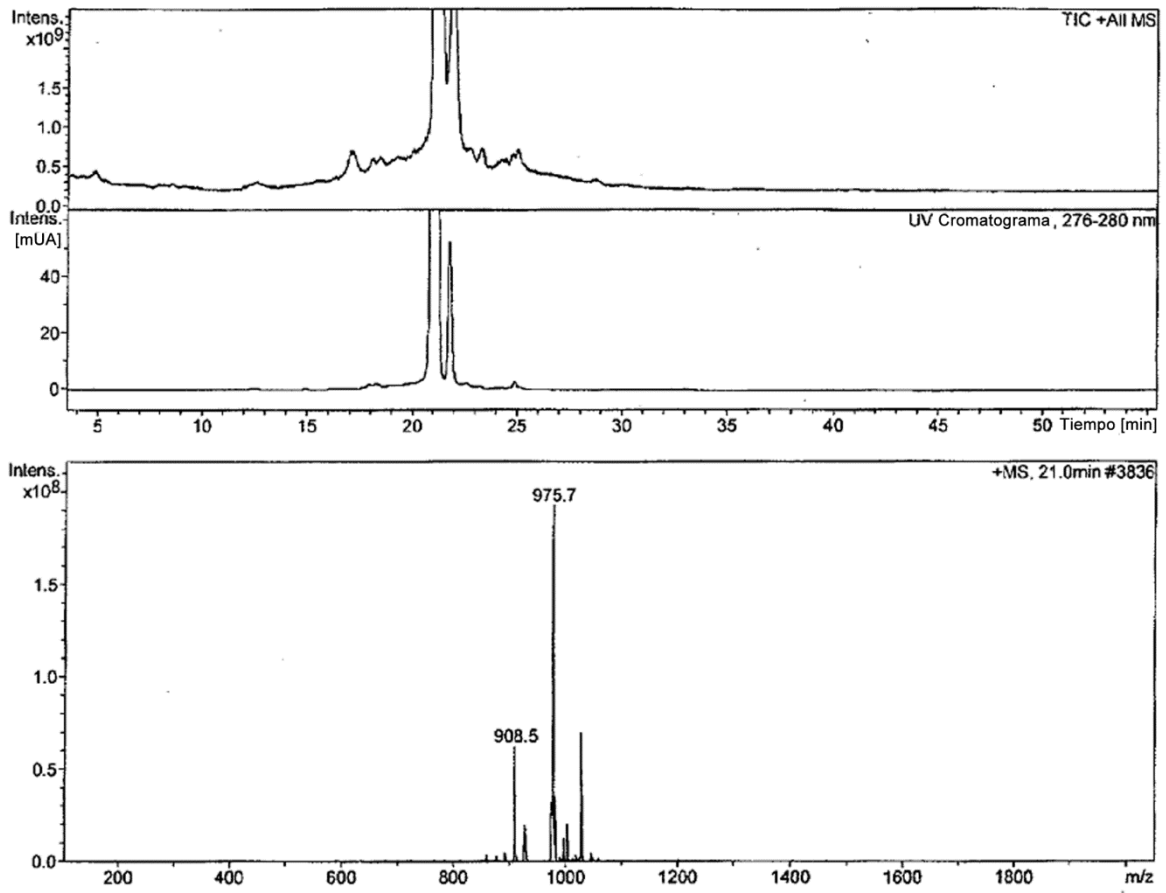


Figura 10

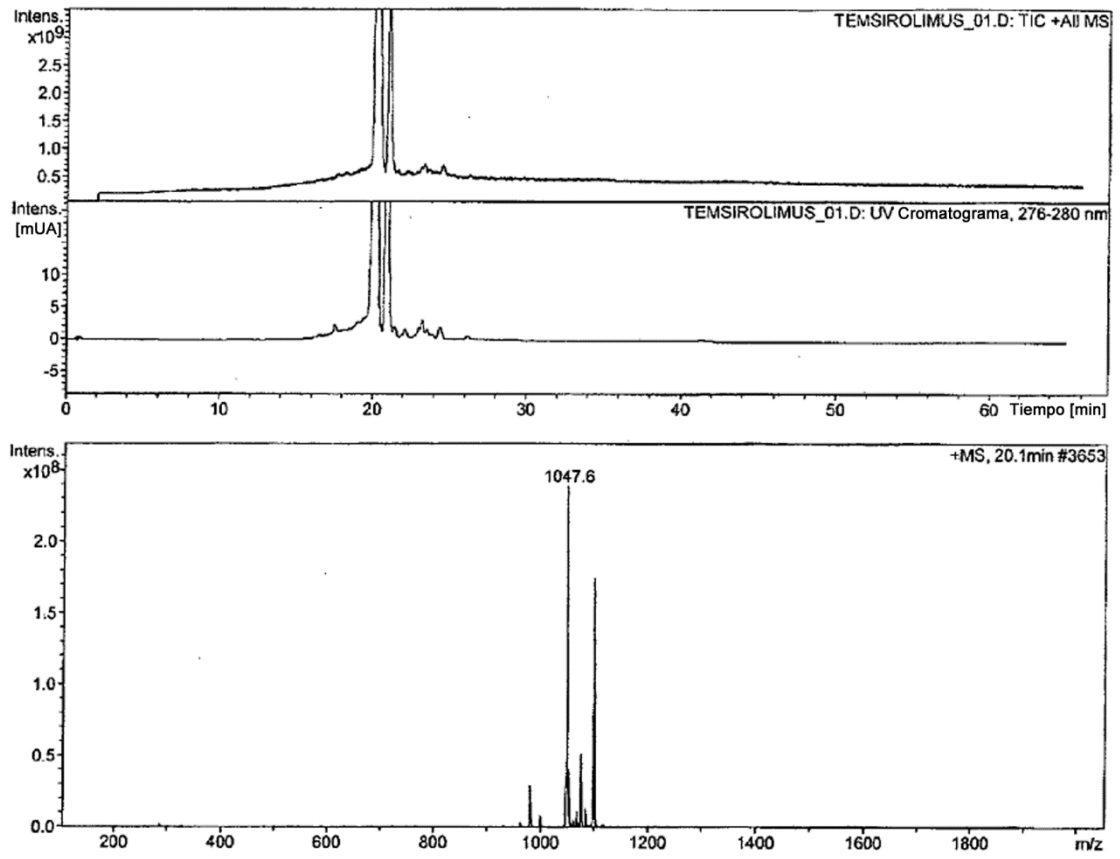


Figura 11

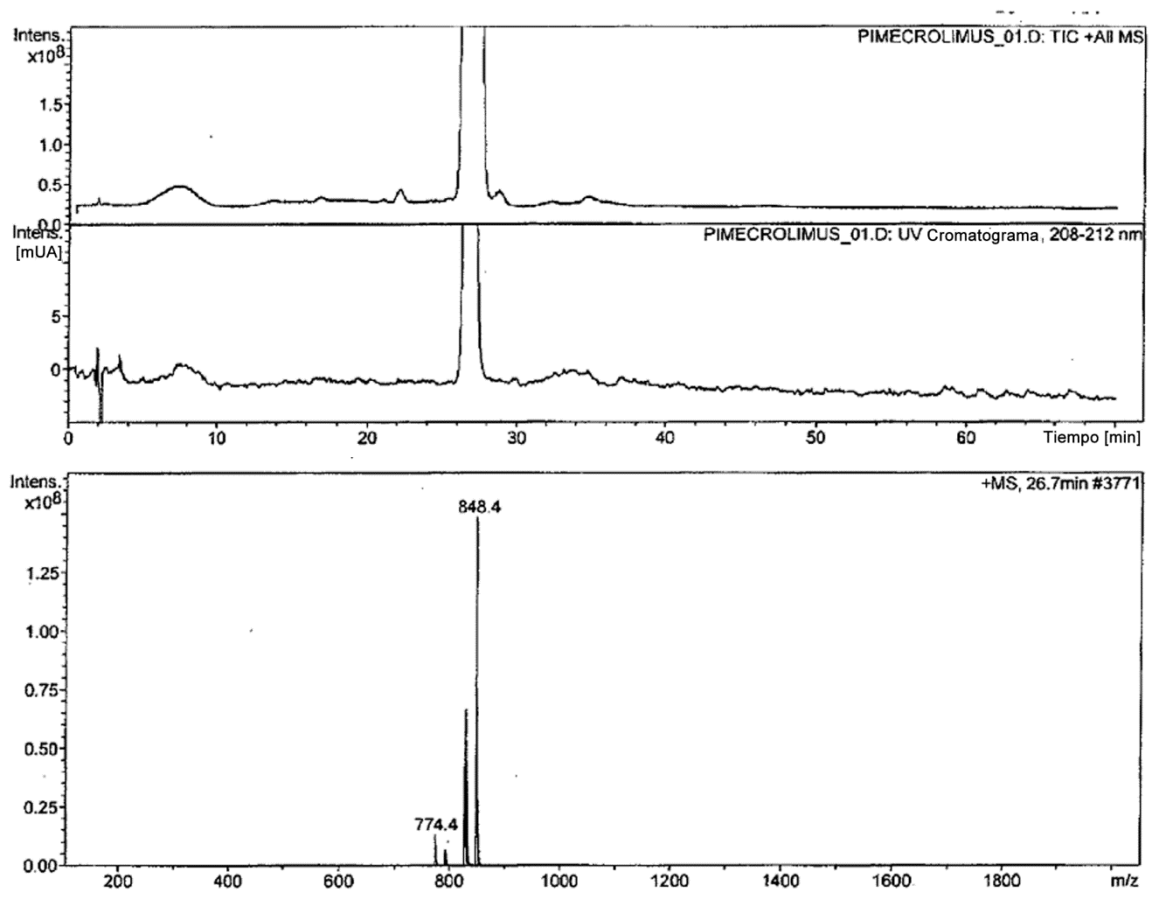


Figura 12

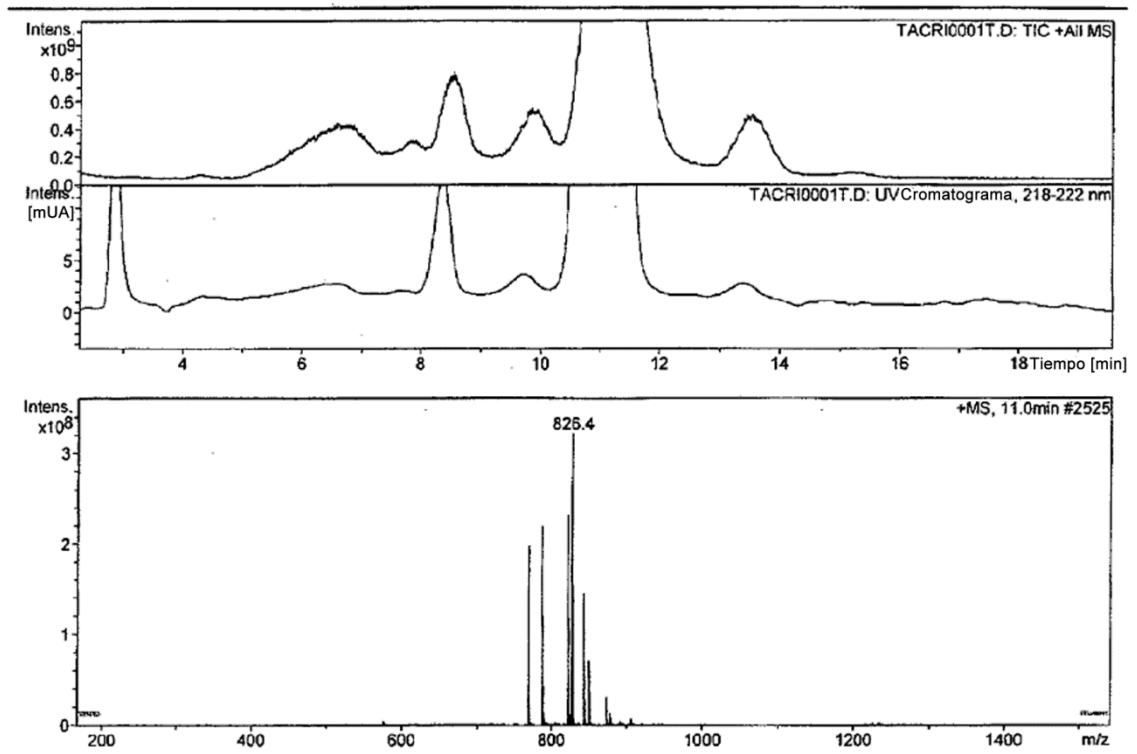


Figura 13

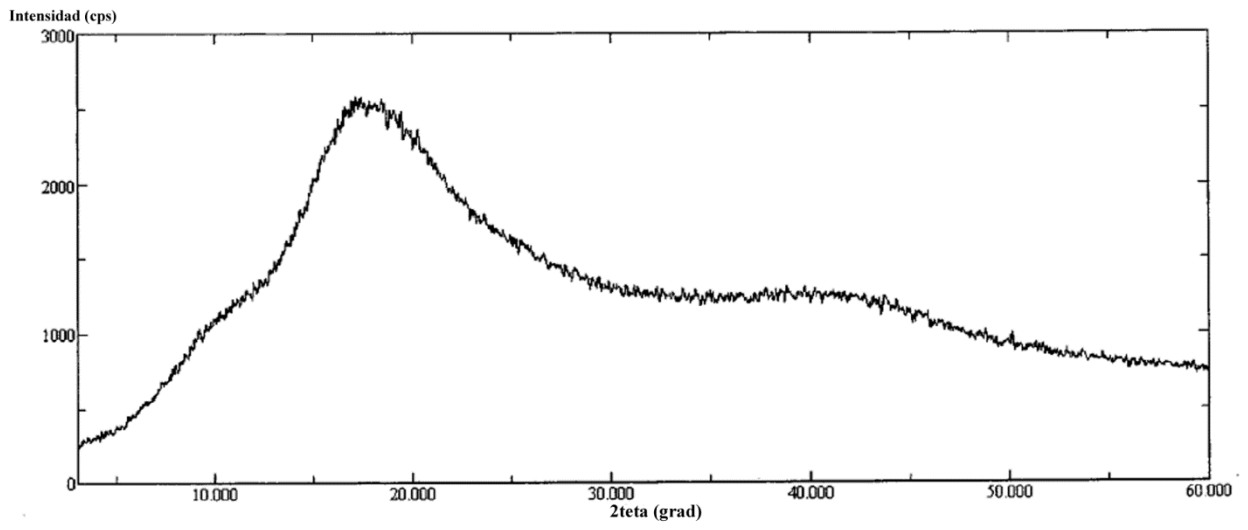


Figura 14

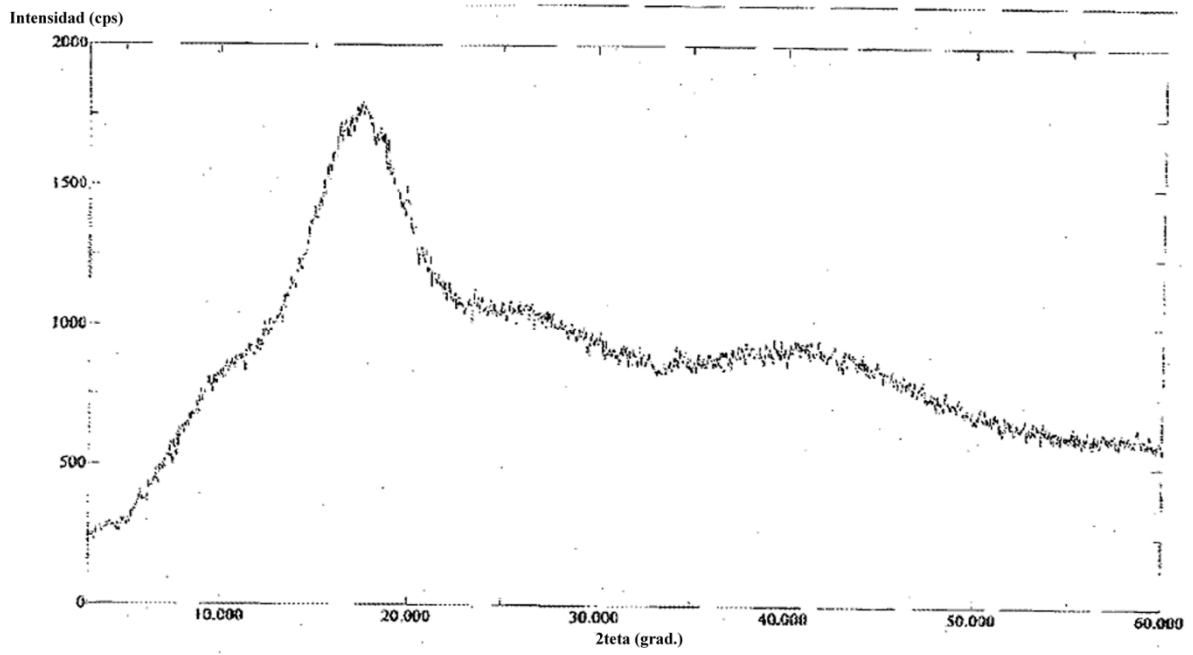


Figura 15

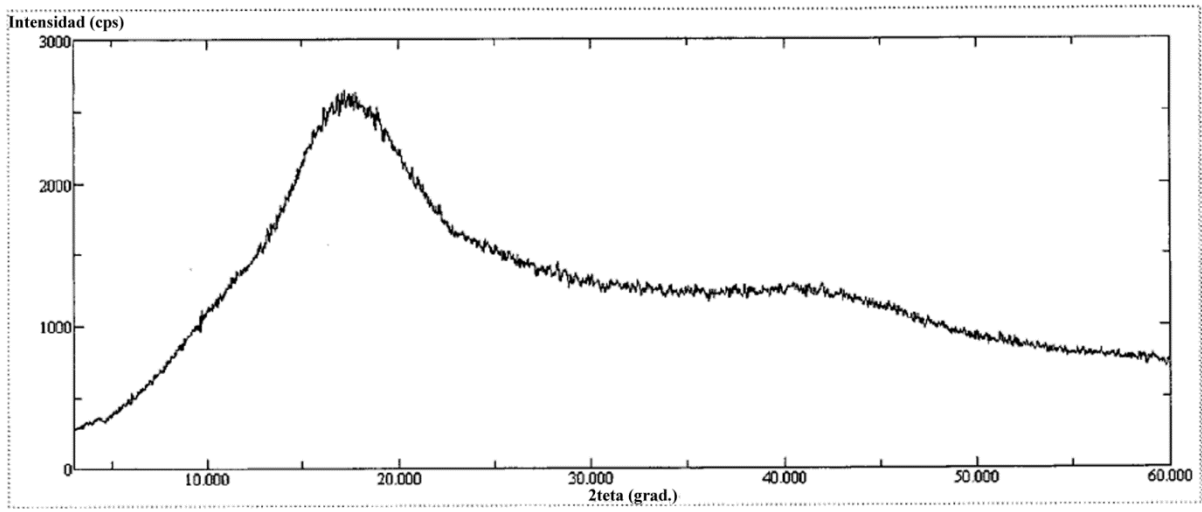


Figura 16

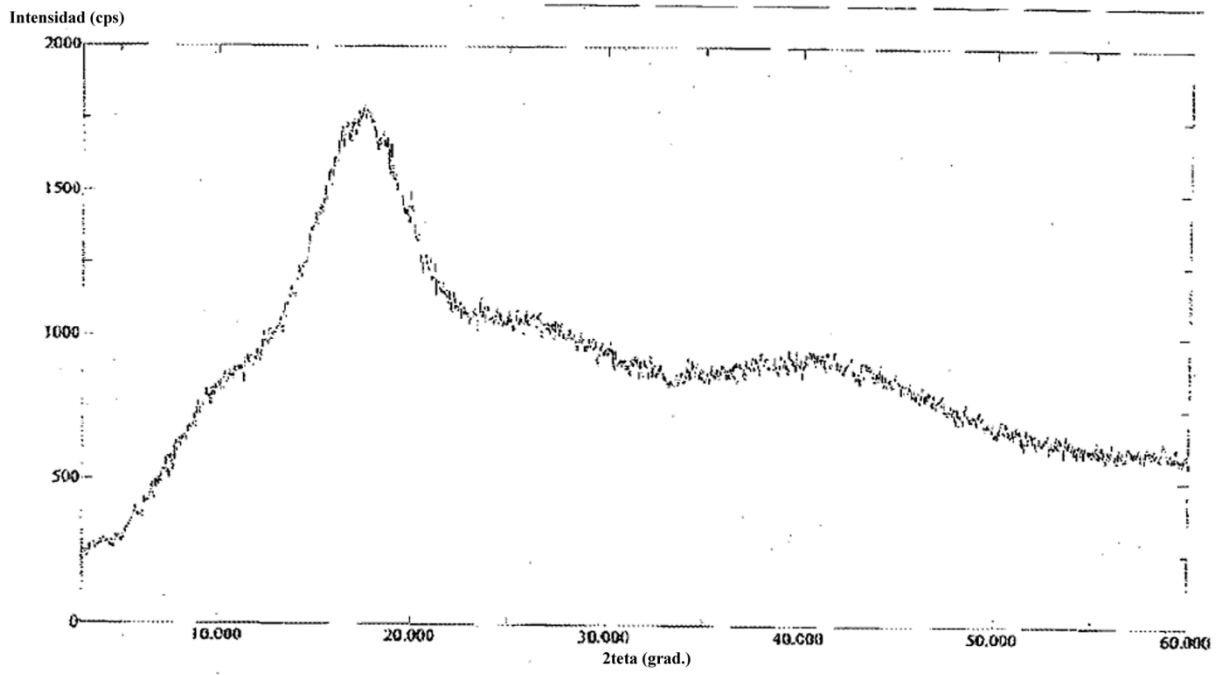


Figura 17

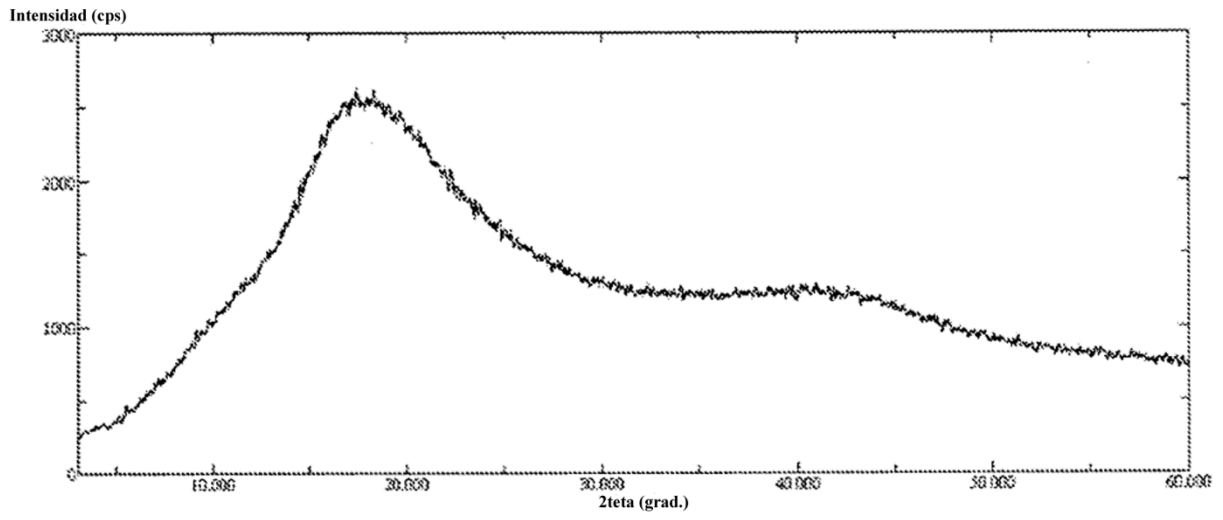


Figura 18

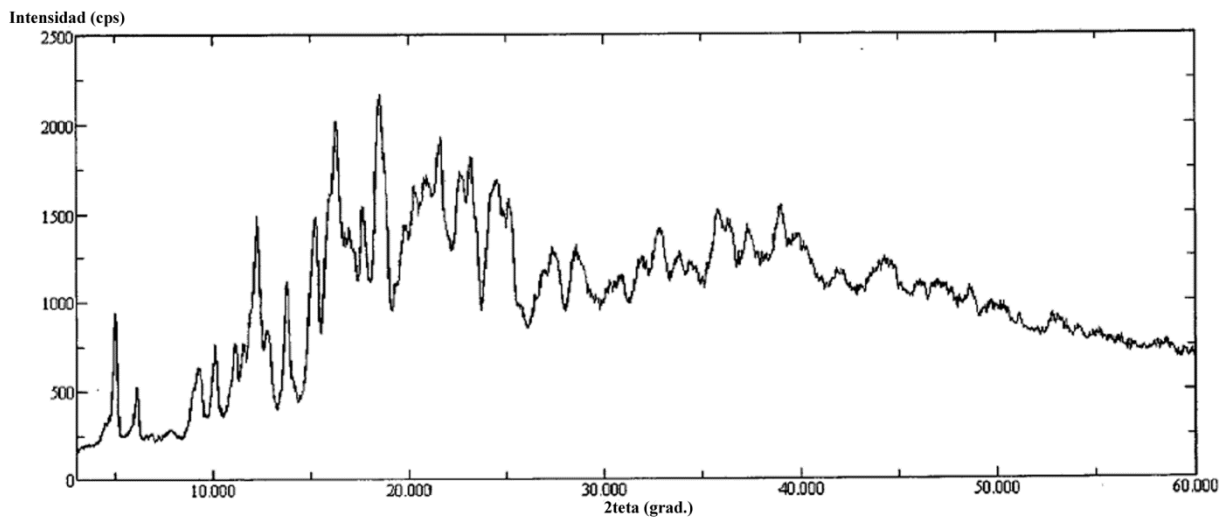


Figura 19

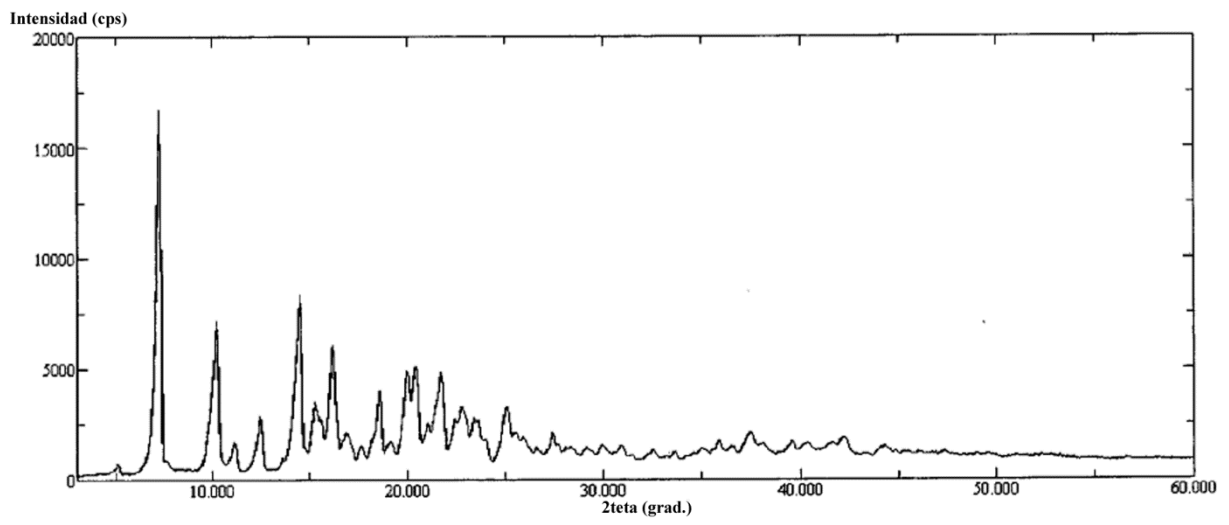


Figura 20

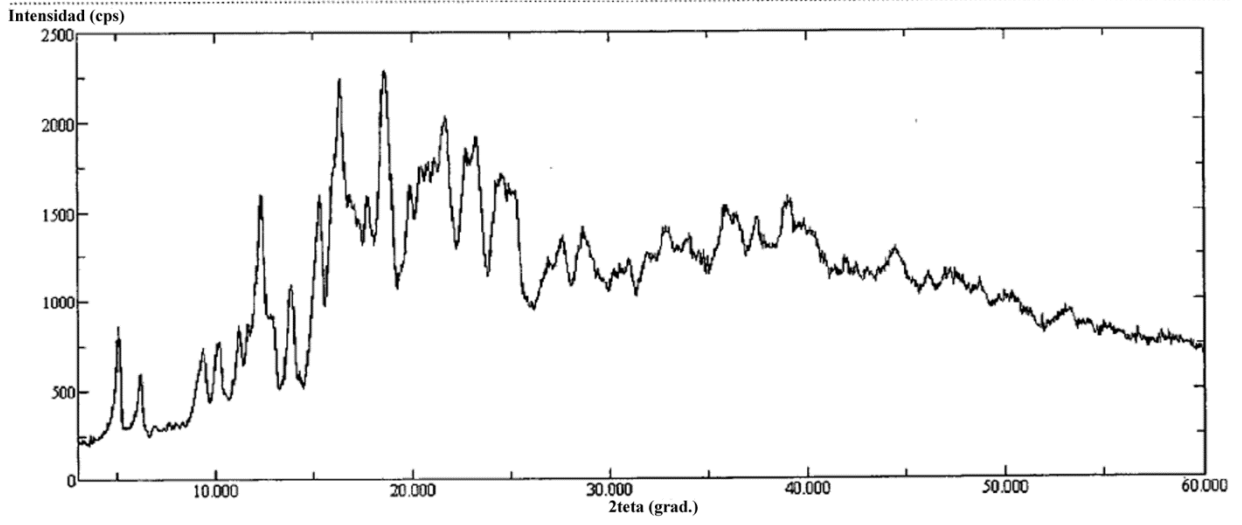


Figura 21

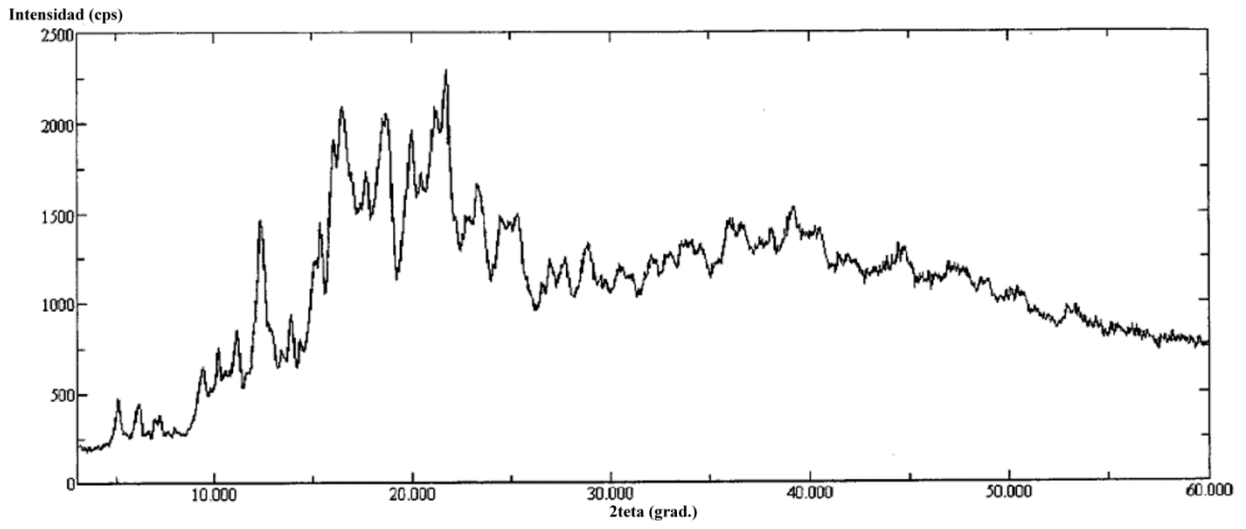


Figura 22

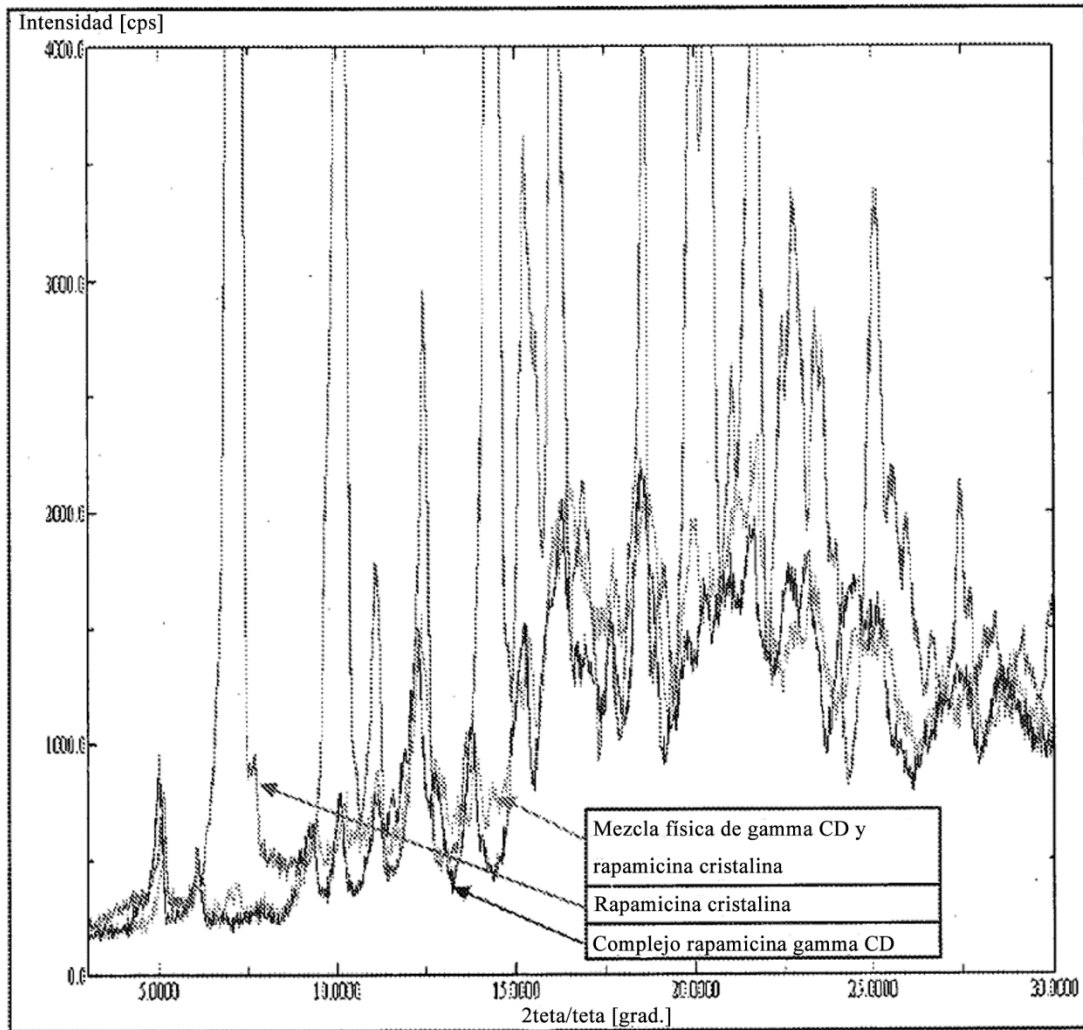


Figura 23