

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 353**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61K 31/4192 (2006.01)
A61K 31/4196 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2011 E 11849408 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2651450**

54 Título: **Formulaciones farmacéuticas de azol para administración parenteral y métodos para la preparación y el uso de las mismas como tratamiento de enfermedades sensibles a los compuestos de azol**

30 Prioridad:

16.12.2010 US 423937 P
19.07.2011 US 201161509154 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2016

73 Titular/es:

BORJE S. ANDERSSON (33.3%)
2632 Carolina Way
Houston, TX 77005, US;
JEFFREY TARRAND (33.3%) y
BENIGNO C. VALDEZ (33.3%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 565 353 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones farmacéuticas de azol para administración parenteral y métodos para la preparación y el uso de las mismas como tratamiento de enfermedades sensibles a los compuestos de azol

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a un tratamiento de las infecciones sistémicas causadas por organismos de levaduras y mohos y, específicamente, a una composición y a un método para administración parenteral de la clase general de agentes antiproliferativos (antifúngicos) denominados normalmente azoles, y que contiene el itraconazol, el posaconazol, el voriconazol, el fluconazol, el ketoconazol y compuestos relacionados que incluyen, si bien no se limitan al mismo, el mebendazol, en el tratamiento de tales infecciones que incluyen, si bien no se limitan a las mismas, las infecciones fúngicas, que son sensibles a esta clase general de agentes antiinfecciosos.

Descripción del estado de la técnica

Los agentes antifúngicos de azol itraconazol (ITZA) y posaconazol (POSA), que pertenecen a la clase general de agentes denominados normalmente compuestos de triazol, se han ganado una reputación impresionante por su eficacia tanto frente a las levaduras como a diversos mohos (Ref. 1-28). La introducción de tales azoles en la medicina clínica ha mejorado enormemente el control de las infecciones fúngicas sistémicas en individuos inmunocomprometidos infectados y no infectados con el VIH. Estos compuestos son activos frente a diversas infecciones fúngicas tales como la aspergilosis, la blastomicosis, la histoplasmosis, y la candidiasis, así como frente a infecciones fúngicas localizadas en las uñas de los pies y de las manos (la onicomycosis), y a infecciones de la piel y del tracto reproductivo (denominadas primariamente como "infecciones por levaduras vaginales"). Se usan también para el tratamiento empírico y preventivo de pacientes inmunocomprometidos que tienen fiebre y bajos recuentos de leucocitos quienes es muy probable que desarrollen una infección fúngica tras la radioterapia o la quimioterapia de enfermedades malignas. Para los fines de esta descripción, la mayoría de los datos mostrados y discutidos pertenecen solamente a dos miembros de la familia, puesto que tienen unas limitaciones clínicas similares, concretamente el itraconazol (ITZA) y el posaconazol (POSA). Se denominarán de modo global con la etiqueta ITZA, a menos que se especifique de otro modo.

DOSIFICACIÓN: La dosis normal recomendada varía entre los diferentes miembros de la familia de los azoles en un única dosis o en dos o tres dosis diarias divididas. Las cápsulas se deben tomar con una comida completa ya que los alimentos que contienen lípidos mejoran la absorción.

Se asume que el ITZA y el POSA son absorbidos rápidamente desde el tracto intestinal. El ITZA tiene una biodisponibilidad promedio de aproximadamente el 50 % mientras que el POSA tiene una biodisponibilidad "variable" dependiendo del estado nutricional y de una multitud de otros factores que influyen en la absorción intestinal (Ref. 24, 29). Por tanto, la absorción intestinal es altamente variable y depende del microambiente intestinal, del pH, del contenido de grasa del alimento ingerido, y de varios otros parámetros que se comprenden solamente de modo parcial en este momento (Ref. 30). Desafortunadamente, no se encuentran disponibles unos datos detallados precisos referentes a la absorción intestinal, así como tampoco una comprensión a fondo de los factores que determinan esta absorción variable, ni tampoco datos referentes a posibles variaciones entre individuos del metabolismo hepático de primer paso que influyen adicionalmente en la biodisponibilidad total. La influencia de estos factores no se puede determinar debido a la ausencia de una formulación IV de referencia.

La baja solubilidad y la inestabilidad física del ITZA en solución acuosa han impedido el desarrollo de una formulación parenteral de ITZA útil que se podría usar para la administración clínica rutinaria así como para investigaciones farmacológicas detalladas. Esta falta de (a) una preparación o preparaciones IV solubilizadas ha afectado al desarrollo de pautas óptimas de administración y ha obstaculizado, por tanto, el uso clínico óptimo del ITZA y de análogos del mismo relacionados. Análogamente, la formulación de POSA disponible se limita a una suspensión oral con un espectro relacionado de problemas logísticos que son un reflejo de los del ITZA, principalmente la absorción intestinal errática e impredecible, que depende del pH intestinal y del contenido lipídico intestinal para permitir la absorción óptima, y esto se agrava adicionalmente por los diversos grados de extracción hepática de primer paso (24, 29, 30).

La frustración clínica está aumentando con respecto a los problemas prácticos unidos a estos, por otro lado, excelentes agentes antifúngicos. Por un lado, su amplio espectro antifúngico ha contribuido a un cada vez mejor control de las infecciones causadas por mohos establecidas en pacientes inmunocomprometidos y a una reducción de las infecciones causadas por mohos clínicamente probadas en poblaciones de pacientes de alto riesgo en los que se usa el compuesto o compuestos de un modo preventivo o "profiláctico", mientras que, por otro lado, es problemática la falta de consistencia de la exposición sistémica tras la administración de una dosis oral, especialmente en la fase temprana de tratamiento de una infección fúngica (especialmente causada por mohos) sistémica, en la que es de vital importancia establecer un control rápido de la infección.

Debido a una absorción intestinal poco fiable, el uso de antifúngicos orales es claramente subóptimo en muchas

categorías de pacientes inmunodeficientes, que incluyen aquellos que padecen infecciones por VIH, en pacientes sometidos a quimioterapia frente a enfermedades malignas, y tras el trasplante de células madre hematopoyéticas en el que la aparición de la enfermedad del injerto contra el huésped puede perjudicar adicionalmente la función intestinal e impedir, por tanto, la biodisponibilidad del fármaco. En tales pacientes la administración de medicaciones conjuntas que dan como resultado hipoclorhidria o aclorhidria, y/o diarrea puede influir también en la absorción intestinal de los fármacos orales. Además, es de crucial importancia la capacidad de conseguir rápidamente concentraciones terapéuticas en la sangre y los tejidos de los agentes antifúngicos en pacientes que han adquirido infecciones fúngicas oportunistas. Por todas estas razones, es altamente deseable el desarrollo de formulaciones parenterales de ITZA, POSA y de otras generaciones posteriores de azoles (Ref. 31).

Basándose en un modelo farmacocinético que se desarrolló a partir de datos de voluntarios sanos que recibieron infusiones IV únicas de ITZA seguidas de dosis de fármaco orales y que se validaron después en pacientes infectados con el VIH con infecciones fúngicas oportunistas, se concluyó que una pauta posológica IV de ITZA administrado en una "fase de carga" de 200 mg dos veces al día durante 2 días, seguido de una dosificación diaria de una vez al día de la misma dosis durante otros 5 días produciría concentraciones de ITZA similares a las conseguidas con ITZA oral administrado en forma de cápsulas durante 28 días o bien en forma de solución oral durante 14 días (Ref. 32). Estas deliberaciones llevaron al desarrollo de una suspensión microcristalina de ITZA para administración IV que se introdujo en medicina clínica y fue aprobada por la Administración de Alimentos y Fármacos (AAF) de Estados Unidos para su uso en pacientes con infecciones fúngicas sistémicas. Sin embargo, debido a problemas de estabilidad esta formulación fue retirada voluntariamente del mercado de Estados Unidos por el proveedor a principios de 2009.

Los problemas asociados a la administración oral del ITZA y el POSA siguen inalterados, y aunque la necesidad de formas de administración parenteral de estos azoles constituye clínicamente una necesidad altamente deseable sigue sin poder cumplirse. Los problemas de solubilidad hasta ahora han impedido el desarrollo de formulaciones parenteralmente aceptables de ambos de estos análogos del azol. Asimismo, recientes datos farmacocinéticos obtenidos tanto con el ITZA como con el POSA indican que la administración (oral) con un control cuidadoso de las concentraciones en plasma mejorará el control de las infecciones fúngicas establecidas. Tales descubrimientos deberían motivar adicionalmente el desarrollo de una tecnología de sistemas disolventes parenterales para disolver y solubilizar los fármacos, de modo que estos puedan ser administrados a pacientes de alto riesgo con alta precisión y con garantía de dosis completa, incluso sin la preocupación de la eliminación hepática de primer paso y de una necesidad continua de un estado nutricional establecido óptimo y de una función intestinal intacta de los pacientes para facilitar la absorción intestinal reproducible necesaria que asegure una biodisponibilidad sistémica aceptable del fármaco (Ref. 31). Tales formas de administración parenteral permitirían también una investigación más a fondo de diversas pautas de administración para mejorar adicionalmente el control de las infecciones.

Los planteamientos anteriores para aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles incluyen la adición de tensioactivos. La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0118354 describe una formulación para solubilizar el docetaxel usando uno o más tensioactivos no iónicos, más preferentemente el polisorbato 80. Análogamente, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0253712 divulga un sistema disolvente acuoso para agentes antifúngicos de azol que requiere un tensioactivo, más preferentemente el polisorbato 80. Se ha establecido que los tensioactivos tienen efectos tóxicos en los humanos (Ref. 33, 34, 35). Los tensioactivos no iónicos pueden modificar la actividad enzimática, irritar la piel, y modificar la permeabilidad de las células sanguíneas (33). Se descubrió que el Cremophor EL® (aceite de ricino polioxietilado), un tensioactivo no iónico, causaba reacciones anafilácticas de hipersensibilidad, hiperlipidemia y neurotoxicidad (36). El polisorbato 80 también inducía reacciones anafilácticas graves (37). Así pues, es beneficiosa la formulación de un sistema disolvente que no requiera el uso de tensioactivos no iónicos.

Dada la toxicidad de agentes solubilizantes tales como los tensioactivos no iónicos, los planteamientos anteriores para aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles han incluido también la adición de agua como medio para diluir los tensioactivos tóxicos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2009/0253712, que describe un sistema disolvente para agentes antifúngicos de azol, usa agua en el sistema disolvente (un 60-80 % de agua en volumen en la realización más preferente), que se indica que es para los fines de diluir la toxicidad asociada al tensioactivo (véase, por ejemplo, el párrafo [0034]). Sin embargo, los azoles son altamente lipófilos, y la presencia de agua puede dar como resultado una emulsión lipídica termodinámicamente inestable y reducir aparentemente la estabilidad del fármaco. Además, las emulsiones lipídicas son propensas a la agregación, la floculación y la coalescencia (38). Si la homogeneidad de la emulsión se altera significativamente, la administración del fármaco se ve comprometida. Lo que es más importante aún, una emulsión alterada puede causar serias reacciones adversas que incluyen embolias debidas a grasas derivadas del plasma (39). Así pues, con el interés de conservar y optimizar la seguridad del tratamiento para pacientes graves, existe la necesidad de proporcionar sistemas de administración parenteral del fármaco que carezcan esencialmente de tensioactivos no iónicos y que, además, tengan un contenido mínimo de agua.

Sumario de la invención

La invención se refiere a formulaciones farmacéuticas, y realizaciones más particulares, a formulaciones

parenterales de azol que contienen agentes farmacéuticos tales como el itraconazol (ITZA) y agentes antiinfecciosos relacionados. Las formulaciones parenterales de la invención son útiles para el tratamiento y/o la supresión de infecciones sistémicas causadas por levaduras, mohos y otros organismos que son sensibles a los compuestos que pertenecen a esta clase general de fármacos. Las formulaciones parenterales evitan la biodisponibilidad errática indeseable y la extracción hepática de primer paso impredecible de las preparaciones orales, y debido a que están realmente solubilizados los agentes no presentan ahora las deficiencias experimentadas con la administración intravascular de materia particulada, denominada más comúnmente coloidal, o suspensiones microparticulares, o suspensiones microcristalinas de agentes farmacéuticamente activos.

La presente invención proporciona nuevas formulaciones parenteralmente aceptables y farmacéuticamente estables de compuestos de azol que se pueden usar para el tratamiento intravascular u otro tratamiento sistémico (o tópico) de infecciones causadas por levaduras, mohos y otros agentes infecciosos en el hombre y en animales domésticos. Las formulaciones de la invención se basan en el principio de la cosolencia. Las composiciones codisolventes preferentes de la invención son farmacéuticamente aceptables, no tóxicas, y estables durante muchas horas a temperatura ambiente.

Las formulaciones preferentes de acuerdo con la invención se pueden mezclar con líquidos para infusión parenteral, acuosos y clínicamente aceptables, tales como la solución salina normal o la dextrosa en agua, como diluyente o diluyentes finales. Las formulaciones preferentes de acuerdo con la invención conservan totalmente la actividad *in vitro* en cultivos de tejidos que utilizan como diana diversas cepas de mohos y levaduras que crecen continuamente, demostrando que las formulaciones de los presentes inventores de acuerdo con la invención no pierden actividad cuando se solubilizan. Las formulaciones de la invención se pueden usar intravascularmente, usando la vía intravenosa como forma prototipo de forma de administración, y se han usado con éxito en la administración intravascular en un modelo de ratón para demostrar que a dosis clínicamente relevantes las concentraciones en plasma resultantes están en un intervalo activo basadas en las comparaciones con las concentraciones en plasma obtenidas en la administración clínica rutinaria de formulaciones oralmente disponibles tal y como lo refleja la literatura publicada. La farmacocinética preliminar obtenida en el modelo de ratón con (a) la formulación o formulaciones preferentes de la invención ha dado concentraciones detectables (fungistáticas) durante al menos una hora tras la administración de varios miembros de la familia de los azoles.

De acuerdo con esto, una realización de la invención se dirige a una composición que contiene itraconazol para uso parenteral que comprende itraconazol (ITZA) y un primer disolvente que comprende (un) alcohol, tal como el alcohol bencílico y/o el etanol (EtOH) y un ácido, tal como el HCl o un ácido orgánico, para obtener un pH bajo estable (preferentemente en el intervalo de 1 a 5) y finalmente un polietilenglicol (PEG), preferentemente el polietilenglicol 400 (PEG-400), para proporcionar/simular un medio lipófilo/no polar, en la que la composición carece esencialmente de tensioactivos no iónicos o bien en la que tales tensioactivos están incluidos en cantidades muy bajas que no son tóxicas, y en la que adicionalmente la composición tiene menos de un 5 % de agua, preferentemente menos de un 3 % de agua, y aún más preferentemente menos de un 1 % de agua o, lo más preferente, carece esencialmente de agua. Tensioactivos no iónicos que son particularmente indeseables debido a sus efectos tóxicos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, el Cremophor EL®, el polisorbato 80, el polisorbato 20, el polisorbato 40, el polisorbato 60, el polisorbato 65, el Brij 35, el Brij 58, el Brij 78, el Brij 99, etoxilatos de alcoholes primarios lineales (tal como el NEODOL), el Lubrol PX, el Emulgen 913, el Nonoxinol 9, el Triton X-100, el polioxietilen-10-oleil éter, el polioxietilen-10-dodecil éter, el N-óxido de N,N-dimetildodecilamina, y similares.

El agente de azol farmacéuticamente activo se disuelve en el vehículo disolvente compuesto. Antes de la administración, la composición se diluye preferentemente con un diluyente secundario que comprende un líquido para infusión acuoso fácilmente disponible tal como cloruro sódico (NS) al 0,9 %, o dextrosa en agua al 5 % o al 10 % (D5W y D10W, respectivamente). La formulación de uso final estable resultante contiene el agente farmacéuticamente activo disuelto el cual, disuelto a temperatura ambiente (TA), permanece estable durante muchas horas para facilitar una manipulación y una administración convenientes para los pacientes.

Los nuevos vehículos disolventes de la invención no se limitan al ITZA y al POSA, sino que se pueden usar para facilitar la administración parenteral de otros fármacos insolubles en agua, preferentemente miembros de la familia de los azoles. De acuerdo con esto, otra realización de la invención incluye una composición para uso parenteral que comprende: un agente farmacéuticamente activo lipófilo/ insoluble en agua o poco soluble en agua; y un primer disolvente, comprendiendo el primer disolvente (un) alcohol (tal como el alcohol bencílico y/o EtOH acidificado) y un ácido para proporcionar un medio ácido, y PEG, preferentemente PEG-400, para proporcionar un medio lipófilo no proteico. El agente se disuelve en el primer disolvente. La composición de modo opcional comprende adicionalmente un segundo diluyente que comprende un líquido para infusión acuoso para facilitar la administración sistémica posterior a un mamífero, preferiblemente un humano o un animal doméstico (grande).

La invención incluye también un método para la preparación de un agente farmacéuticamente activo lipófilo/ insoluble en agua o poco soluble en agua para uso parenteral, que comprende las etapas de: proporcionar una solución de un agente farmacéuticamente activo que en sí es virtualmente insoluble en agua, en un disolvente primario ("solución madre"); y diluir el agente farmacéuticamente activo en el líquido para infusión clínicamente aceptable secundario para producir una formulación de uso final clínica. De acuerdo con una realización de la

invención, el disolvente primario se prepara combinando el PEG con un alcohol acidificado tal como el EtOH y/o el alcohol bencílico y el agente, tal como el ITZA o el POSA, se disuelve en el mismo. Tras disolver el agente farmacéuticamente activo en el primer disolvente compuesto, el método puede comprender adicionalmente la etapa de mezclar la formulación madre primaria con un segundo diluyente, tal como un líquido para infusión acuoso para facilitar su administración clínica como método de tratamiento clínico de una enfermedad sistémica (tal como una infección fúngica), que se espera sea sensible a una terapia con azoles. En una realización particularmente preferente, las proporciones de PEG con respecto al alcohol están en el intervalo de 27 a 2, y más preferentemente entre 12 y 8, y con un pH de aproximadamente 1 a 5, más preferentemente de 3 a 4.

La invención incluye también un método para el tratamiento de una enfermedad sensible o que responde a los azoles que comprende: administrar por vía parenteral una cantidad disuelta terapéuticamente eficaz de ITZA, POSA, u otra composición farmacéutica que contiene un azol, al paciente, comprendiendo la composición: un derivado de azol farmacéuticamente activo; un primer disolvente, comprendiendo el primer disolvente un alcohol y un ácido para proporcionar un pH subfisiológico (bajo) estable, y PEG para proporcionar un medio lipófilo, en el que el azol se disuelve en el primer disolvente; y un segundo diluyente, comprendiendo el segundo diluyente un líquido para infusión acuoso clínicamente aceptable y comúnmente disponible.

Otra realización adicional de la invención se refiere a un método para la administración parenteral de un azol a un mamífero que comprende: proporcionar una formulación acuosa en la que el agente farmacéuticamente activo que en sí tiene una solubilidad en agua muy limitada. Mediante el uso de un planteamiento de cosolvenencia el agente farmacéuticamente activo se disuelve de un modo estable a concentraciones clínicamente relevantes para producir un primer disolvente compuesto; disolver el azol en el diluyente primario para producir una formulación madre; mezclar la formulación madre con un segundo diluyente para formar un líquido para infusión clínicamente aceptable; y administrar el líquido para infusión al mamífero. Preferentemente, el alcohol es EtOH o alcohol bencílico y el ácido es HCl y ácido cítrico, ácido acético o ácido glutámico, en el que el medio lipófilo es aportado por un PEG, tal como PEG-100, PEG-200, PEG-300, PEG-400, PEG-800, y similares.

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

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la invención. La invención se puede comprender mejor mediante referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas mostradas en el presente documento.

Las **Figuras 1A-1E** son gráficas que muestran la estabilidad del itraconazol a temperatura ambiente (**Figura 1A**) y a 40 °C (**Figura 1B**) en el disolvente primario preferente - formulación de alcohol bencílico-EtOH acidificado/PEG-400 (es decir, el vehículo disolvente primario prototipo H3) que contiene 4 mg/ml de ITZA. La **Figura 1C** muestra la estabilidad del itraconazol a temperatura ambiente en disolvente H3/solución salina normal (1:1) (concentración final de aproximadamente 2,0 mg/ml) a temperatura ambiente. Se solubilizaron diferentes lotes de itraconazol y se ensayaron en experimentos repetidos cuando fue conveniente. El eje X representa el tiempo en días u horas en las respectivas figuras, el eje Y representa la concentración real de fármaco en mg/ml. Las **Figuras 1D y 1E** muestran la estabilidad del ITZA en las variantes de H3 H3D y H3G con un 11,7 % de EtOH y desprovisto de alcohol bencílico. Las **Figuras 1D y 1E** muestran la estabilidad del ITZA en las variantes de H3 H3D y H3G, respectivamente, en ausencia o en presencia de NS o D5W o D10W como diluyentes finales.

La **Figura 2** es un ejemplo de la curva estándar para la concentración del itraconazol frente al área bajo la curva (ABC) (el área bajo la curva, término usado para denotar el área real medida de un pico en un cromatograma, y también para el área bajo la curva de la concentración en plasma frente al tiempo a lo largo de varias horas después de la administración de un fármaco a un animal o a un humano, para el ensayo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) usado en los ensayos de estabilidad. El eje X muestra la concentración en mg/ml, y el eje Y muestra el ABC. Se prepararon curvas convencionales análogas para los estudios farmacológicos.

Las **Figuras 3A-3D** muestran los cromatogramas obtenidos a partir del ensayo de HPLC en los estudios de solubilidad/estabilidad descritos en el Ejemplo 1. El volumen de muestra inyectada era de 10 µl. La **Figura 3A** para una muestra blanco, solo disolvente, sin fármaco. La **Figura 3B** para una muestra que contiene ITZA que muestra el pico específico del ITZA con un tiempo de retención de aproximadamente 4,7-5,5 min en las condiciones usadas. Las **Figuras 3C y 3D** muestran los datos cromatográficos análogos obtenidos con el POSA, el tiempo de retención para el POSA es de 2,5-3 min.

La **Figura 4** es una gráfica que muestra el potencial hemolítico de la formulación disolvente de uso final (vehículo disolvente prototipo H3 EtOH acidificado ± alcohol bencílico/PEG-400) en NS. Se analizaron varias combinaciones de disolvente:sangre.

La **Figura 5** es una fotografía que muestra la actividad fungistática del ITZA en la formulación de uso final frente a aislados de *Aspergillus fumigatus* y las Tablas que la acompañan demuestran la diferencia entre distintos miembros de la familia de los azoles frente a diversas cepas de levadura y mohos cuando se solubilizan en este sistema de vehículo disolvente.

Las **Figuras 6A-6F** muestran los cromatogramas de muestras de plasma extraídas tal y como se describe en el **Ejemplo 3** y sometidas después a análisis mediante HPLC. La **Figura 6A** muestra una muestra blanco de plasma, la **Figura 6B** muestra una muestra de plasma con adiciones de ITZA en la nueva formulación prototipo, y la **Figura 6C** muestra un cromatograma del estudio de farmacología, en el que se inyectó itraconazol a ratones a un cálculo de 5 mg/kg en un volumen total de aproximadamente 100 µl IV durante 3-4 minutos. La muestra se extrajo 20 minutos después de la administración del fármaco. Las **Figuras 6D-6F** muestran los cromatogramas del estudio de estabilidad *in vitro* y de los experimentos *in vivo* realizados con POSA como azol alternativo.

Las **Figuras 7A y 7B** son gráficas que muestran el cambio de la concentración en plasma a lo largo del tiempo cuando se inyectaron 5 mg/kg de ITZA (**7A**), y 5 mg/kg de POSA (**7B**), respectivamente, a ratones durante 3-4 min. El eje X muestra el tiempo después de la dosis en minutos. El eje Y muestra la concentración de ITZA o POSA, calculada en µg/ml de plasma. La gráfica demuestra que se pueden conseguir concentraciones en plasma clínicamente relevantes con estas formulaciones cuando se inyectan por vía parenteral en la situación descrita.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

La presente invención se refiere a nuevas formulaciones que contienen agentes antiinfecciosos, que pertenecen preferentemente a la clase general de compuestos descritos como azoles, que se puede administrar por vía parenteral. La invención proporciona fármacos realmente solubilizados en vehículos complejos farmacéuticamente aceptables de tal modo que el fármaco o fármacos disueltos permanecen físicamente y químicamente estables durante más de 24 horas a temperatura ambiente (TA). La invención permite la administración parenteral de los fármacos en dosis necesarias para obtener efectos significativos clínicamente relevantes en humanos y animales sin una toxicidad excesiva a partir del vehículo o vehículos disolventes compuestos propuestos. Las realizaciones preferentes de la invención permiten la administración por vía intravascular, intracavitaria o intratecal del ITZA y de agentes de azol relacionados, solubilizados en formulaciones alternativas para aumentar la seguridad clínica y la eficacia de la administración del fármaco, y para permitir la exploración de pautas de administración alternativas adicionales. Como resultado, se puede conseguir un control mejorado de las infecciones que son sensibles a estos agentes.

El ITZA, como ejemplo representativo de los agentes antifúngicos, (tri)azoles, administrados por vía oral, se ha investigado previamente de modo extenso en humanos y animales domésticos (Ref. 1-29, 32, 40-42); el fármaco o fármacos tienen propiedades antiinfecciosas bien documentadas tanto en situaciones experimentales como clínicas. Sin embargo, antes de la presente invención, no ha habido disponible de modo sistemático una formulación o formulaciones parenterales aceptables de ITZA, POSA u otros miembros de esta familia diversa de compuestos químicos denominados triazoles, o bien simplemente compuestos de azol, sino que la administración parenteral se ha conseguido permitiendo el uso de suspensiones microcristalinas de estos azoles. La estabilidad variable y en cierto modo poco fiable de tales formulaciones ha dado resultados variables impredecibles. Así pues, el voriconazol actualmente está disponible en el mercado como tal formulación, mientras que el ITZA fue retirado voluntariamente del mercado de Estados Unidos por el fabricante, y el POSA sigue sin estar disponible a pesar de los repetidos intentos por parte del fabricante de proporcionar una formulación parenteral clínicamente útil.

Las formulaciones parenterales de ITZA y POSA realmente solubilizadas serían útiles como tratamiento de trastornos infecciosos sistémicos en pacientes inmunocomprometidos quienes por una multitud de razones no pueden tomar regularmente preparaciones orales, tales como, por ejemplo, las presentadas normalmente después de quimioterapia convencional (intensiva) para la leucemia aguda y otras enfermedades malignas, y después de un trasplante de células madre hematopoyéticas (allogénicas), en el que en la fase temprana pos-trasplante las náuseas, vómitos, diarreas y mucositis gastrointestinales relacionados con el fármaco, así como la administración conjunta de medicaciones, puede deteriorar la biodisponibilidad del fármaco oral, mientras que posteriormente a la aparición de la enfermedad intestinal del injerto contra el huésped y su terapia puede dar como resultado una situación similar. En tales pacientes, la administración parenteral del fármaco da un control completo de la administración sistémica del fármaco/la farmacocinética del agente administrado con una precisión simplemente no alcanzable con una formulación oral (Ref. 31). Desafortunadamente, el ITZA es un agente poco soluble en agua con una solubilidad extremadamente baja en líquidos para infusión/disolventes acuosos fisiológicamente aceptables que podrían ser compatibles con la administración a humanos. Antes de la invención, la única forma de administración actualmente disponible son las preparaciones orales (cápsulas y una suspensión oral), mientras que la suspensión microcristalina para uso IV previamente disponible fue retirada por su proveedor poco tiempo después de su aprobación por la AAF debido a su comportamiento farmacéutico impredecible. Hasta donde saben los inventores, nunca ha habido disponible una forma de ITZA realmente solubilizada, sino solamente una forma coloidal, o una suspensión microcristalina en hidroxipropil-beta-ciclodextrina (Ref. 42).

La presente invención, basada en el principio de la cosolvencia, usa una nueva serie de vehículos diluyentes compuestos para solubilizar el ITZA y el POSA sin influir en su actividad antiinfecciosa. Asimismo, los disolventes preferentes son, en las concentraciones propuestas y en las dosis totales usadas, no tóxicos y seguros para los humanos y otra administración intravascular en mamíferos, más preferentemente en humanos y animales domésticos.

Tal y como se discute en los Ejemplos que siguen, se han descubierto nuevos vehículos que consiguen la solubilización estable y farmacéuticamente aceptable de azoles clínicamente activos, de tal modo que hace segura la administración intravascular de estos fármacos. Se estableció inicialmente un ensayo de HPLC sensible y específico, que permitió la cuantificación reproducible del ITZA en concentraciones de tan solo 5-10 ng/ml. En paralelo, se desarrolló una técnica de extracción para recuperar el ITZA y el POSA del plasma sanguíneo tras la administración IV. Se iniciaron estudios de estabilidad de los fármacos en los vehículos recién formulados para ayudar a la identificación de la mejor formulación para los estudios *in vitro* del potencial hemolítico y la actividad antiinfecciosa. Finalmente, dos de las nuevas formulaciones de uso final estables (el ITZA y el POSA se disolvieron en el vehículo o vehículos disolventes prototipo y se diluyeron con NS o dextrosa en agua) se inyectaron por vía IV en ratones a 5,0 mg/kg de peso corporal (PC). Los resultados reproducibles ilustran que se pueden obtener concentraciones fungistáticas clínicamente relevantes tras la administración IV de estas nuevas formulaciones de fármaco en estos animales. Adicionalmente, la nueva o nuevas formulaciones daban concentraciones en plasma del fármaco que estaban claramente en el intervalo antiinfeccioso, demostrando que las formulaciones preferentes de la invención se pueden usar para el tratamiento intravascular de trastornos infecciosos en el hombre y en animales domésticos.

Tal y como se muestra en los Ejemplos, se formularon con éxito diversos azoles para uso intravascular, usando sistemas disolventes compuestos no tóxicos. Usando los vehículos disolventes primarios no tóxicos mezclados con los líquidos para infusión clínicamente aceptables solución salina normal (NS), dextrosa en agua al 5 % y al 10 %, respectivamente (D5W y D10W), se produjeron formulaciones que eran estables durante más de 24 horas a temperatura ambiente. Las formulaciones de ITZA (por ejemplo, antes de la adición del diluyente acuoso secundario/final) son estables durante varios días a temperatura ambiente, son sencillas de manipular y proporcionan una administración de la dosis sistémica consistente, fácilmente controlable y fiable, y conservan por definición el 100 % de la biodisponibilidad (Ref. 31).

En una realización preferente de la invención, el ITZA se disuelve usando alcohol bencílico en combinación con etanol acidificado y PEG-400 como disolvente o vehículo primario. Estos disolventes son además miscibles con los diluyentes acuosos secundarios/finales, por ejemplo, los líquidos para infusión acuosos disponibles rutinariamente cloruro sódico (NS) al 0,9 %, D5W y D10W. Tales líquidos para infusión/diluyentes terminales son ejemplos normales de vehículos disponibles rutinariamente en cualquier hospital. Antes de la administración IV, el ITZA y el POSA se disuelven a concentraciones de aproximadamente 3-6 mg/ml y se mezclan después con un diluyente secundario/final hasta una concentración de uso de aproximadamente 1,5-3 mg/ml.

Aunque el ITZA es muy lipófilo, el uso de un vehículo disolvente de alcohol acidificado/PEG-400 lo disuelve rápidamente y estabiliza inmediatamente el agente para una dilución posterior en el diluyente acuoso secundario, que se usará en un volumen similar. La estabilidad de la formulación permite infusiones prolongadas sin pérdida apreciable de la actividad del fármaco debida a la precipitación física o la degradación química, así como proporciona la oportunidad de administrar a los pacientes dosis repetidas las 24 horas del día, independientemente de las limitaciones impuestas por "las horas de funcionamiento de la farmacia", algo no contemplado previamente en el tratamiento de las infecciones fúngicas oportunistas sistémicas. Esto permite una visión muy abierta para investigar nuevas pautas de administración a fin de maximizar el beneficio del paciente a partir del tratamiento con estos agentes, y permite también una "carga" rápida para conseguir concentraciones del fármaco en los tejidos en estado estacionario que contribuirán a optimizar rápidamente el control de la infección.

Tal y como se muestra en los Ejemplos, se usaron con éxito los diversos vehículos disolventes compuestos para disolver el ITZA a concentraciones que variaban desde menos de 2 mg/ml hasta al menos 30 mg/ml. Este amplio intervalo cubre la administración de dosis necesarias para conseguir concentraciones antifúngicas *in vivo* para tratar infecciones sensibles a estos fármacos. Asimismo, este intervalo es suficiente para conseguir concentraciones en plasma eficaces en pacientes aquejados de infecciones sistémicas causadas por mohos y otras infecciones, según se ha documentado en investigaciones previas, usando los equivalentes oralmente disponibles de los fármacos respectivos.

Los datos obtenidos en animales experimentales demuestran que las formulaciones estables de ITZA y POSA permitirán el tratamiento parenteral de las infecciones fúngicas sistémicas. Estas preparaciones por definición proporcionan de modo consistente una biodisponibilidad del fármaco del 100 % (Ref. 31), y permiten eludir tanto la absorción intestinal altamente variable e impredecible como la posible extracción hepática de primer paso que contribuyen a una biodisponibilidad impredecible y a una eficacia subóptima del tratamiento. Tras una inyección IV lenta, las concentraciones en plasma del ITZA alcanzan claramente un intervalo, y permanecen durante un largo tiempo en él, establecido como eficaz en los estudios *in vitro* de su actividad frente a diversos aislados de levaduras y mohos en pacientes humanos así como basado en estudios de pacientes que están siendo tratados para tales

infecciones con los agentes orales equivalentes y que se han sometido a estudios farmacocinéticos del ITZA y el POSA (Ref. 32, 42, 45).

Se usaron varios métodos químicos y biológicos para demostrar que las formulaciones de fármacos de azol preferentes son estables a aproximadamente 4 mg/ml durante varios días a TA. Tal y como se muestra en los Ejemplos, una de tales formulaciones es estable como una concentración de "fórmula madre" de aproximadamente 4 mg/ml durante al menos 7 días, mientras que otra formulación es estable durante al menos 4 días, conservando ambas la actividad antifúngica completa tal y como se ensayó *in vitro* frente a diferentes cepas de levaduras y mohos. En estos ensayos biológicos el ITZA disponible en el mercado se disolvió en DMSO y se usó como referencia positiva para el análisis *in vitro*. Adicionalmente, el vehículo o vehículos disolventes preferentes son no tóxicos cuando se analizan en un ensayo de hemólisis. Dos de las nuevas formulaciones de ITZA se usaron para demostrar que se mantienen las concentraciones antifúngicas clínicamente relevantes durante al menos una hora en plasma en un modelo de ratón tras inyección IV de 5 mg/kg de peso corporal, lo que combinado con la semivida en plasma conocida de aproximadamente 10-11 h para el ITZA y de 25-35 h para el POSA, respectivamente (Ref. 24, 32, 42, 45), debería garantizar el tratamiento seguro y eficaz de las infecciones con estos agentes.

Si bien la realización preferente de la invención usa etanol acidificado y/o alcohol bencílico, y PEG, diluido posteriormente con un diluyente acuoso secundario tal como una solución para infusión, antes de la administración sistémica, se pueden usar otros vehículos disolventes no tóxicos que son seguros para administración en humanos. Un disolvente preferente, el EtOH, que se ha usado previamente para solubilizar diversos agentes farmacológicamente activos para administración en el hombre, se usa rutinariamente como antídoto para el envenenamiento con metanol (Ref. 46). No se han presentado serios efectos adversos derivados del uso de tal disolvente en humanos en las concentraciones y dosis resultantes contempladas. Como alternativa al HCl, se puede usar también como agente de acidificación un ácido orgánico tal como el ácido acético que cambia drásticamente el pH y permite de este modo la solubilización del agente farmacológicamente activo. El uso clínico de la solución salina normal (NS) y de la dextrosa en agua (5-10 % p/v), así como de emulsiones lipídicas acuosas son medios rutinarios establecidos para corregir el equilibrio de líquidos y electrolitos y para suministrar la nutrición parenteral. La solución salina normal y la dextrosa en agua se usan también ampliamente como diluyentes (finales) para diversas medicaciones solubles en agua antes de su uso IV. Puesto que ha habido preocupación respecto al uso del alcohol bencílico como parte de cualquier vehículo disolvente que se pudiera usar en neonatos (Ref. 47-51), los presentes inventores han diseñado vehículos disolventes compuestos alternativos que carecen de alcohol bencílico. Los experimentos de solubilidad-estabilidad prolongada y en animales *in vivo*, así como los ensayos de actividad antifúngica *in vitro*, de los presentes inventores demuestran la utilidad de estos vehículos disolventes alternativos que carecen de alcohol bencílico.

Las composiciones de la invención tienen una serie de usos. Como se ha indicado, las formulaciones preferentes de la invención son particularmente útiles en el tratamiento de las infecciones causadas por hongos, levaduras y mohos en mamíferos, particularmente de las infecciones por *Candida*, *Aspergillus* o *Mucorales*. Determinadas infecciones, más especialmente las causadas por *Histoplasma Spp.* y *Aspergillus Spp.* pueden ser controladas con éxito por el ITZA y, además, el POSA ha sido de particular valor en el tratamiento de la mucormicosis en pacientes inmunocomprometidos. Las formulaciones de ITZA intravasculares, miscibles con agua, farmacéuticamente aceptables, no tóxicas preferentes de la invención eliminan el riesgo de fallo del tratamiento derivado de una absorción intestinal errática e impredecible y de un metabolismo/eliminación hepática de primer paso que en grados variables caracteriza la administración de la preparación o preparaciones orales convencionales. Los beneficios potenciales del uso de la formulación/vía de administración intravascular son más evidentes en pacientes gravemente enfermos que tienen una capacidad deteriorada para tragar y, por tanto, no se pueden beneficiar de la nutrición oral tales como, por ejemplo, los pacientes que padecen mucositis oral y gastrointestinal tras quimioterapia y/o radioterapia contra enfermedades neoplásicas, y aquellos que padecen la enfermedad gastrointestinal del injerto contra el huésped tras un trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas en los que existe un problema clínico similar. Se esperan también que los beneficios incluyan menores efectos clínicos secundarios que los presentados con la formulación oral de fármaco correspondiente, ya que la administración intravascular da un control completo de la biodisponibilidad con una farmacocinética optimizada de los fármacos y, por tanto, minimiza el riesgo de efectos secundarios debidos a interacciones entre fármacos indeseadas y al fallo del tratamiento derivado de una absorción intestinal incompleta, así como de una sobredosis accidental en pacientes que tienen una absorción intestinal inesperadamente elevada junto con una baja eliminación metabólica del fármaco.

El nuevo o nuevos vehículos disolventes compuestos de la invención se pueden usar también para investigar diferentes pautas de administración (por ejemplo, infusiones IV prolongadas y dosificaciones IV repetidas) para optimizar el resultado del tratamiento para una terapia basada en fármacos de azol. Asimismo, la invención hace posible investigar los beneficios de diferentes pautas de dosificación del fármaco de azol frente a diversas enfermedades (infecciosas) sistémicas sin los desconcertantes efectos adversos derivados de una absorción intestinal del fármaco impredecible y los efectos hepáticos de primer paso que influyen de modo arbitrario en el metabolismo de los azoles orales. Finalmente, evita la necesidad de combatir la absorción intestinal altamente variable que se ha comunicado en pacientes con diferentes enfermedades subyacentes así como con diferentes categorías de edad (Ref. 42), y si el paciente está en estado posprandial o en ayunas (Ref. 30, 42, 45), y finalmente alivia también la necesidad de preocuparse de la absorción intestinal "saturable" del fármaco que se ha descrito tras

la administración del POSA (Ref. 29). La disponibilidad de una preparación parenteral es de particular interés cuando se contemplan pautas de dosificación más intensivas para controlar infecciones invasivas en diversos pacientes inmunocomprometidos, tales como, por ejemplo, la aspergilosis seno-pulmonar y la mucormicosis poco tiempo después de un trasplante de células madre hematopoyéticas. En esta situación particular, un control firme tanto de la biodisponibilidad como de la farmacocinética del fármaco es de extrema importancia para garantizar la seguridad del paciente a través del control de los efectos clínicos secundarios del fármaco, mientras que maximiza la oportunidad de controlar una complicación infecciosa rápidamente progresiva y potencialmente mortal en una situación médica muy compleja, en la que es de extrema importancia establecer rápidamente el control de la infección.

Asimismo, la estabilidad de las nuevas formulaciones las hace particularmente adecuadas para evaluar diferentes pautas de administración, que incluyen aquellas de las infusiones prolongadas y las pautas de dosificación múltiples, obteniendo adicionalmente el extraordinario potencial terapéutico de los fármacos de azol, particularmente del ITZA y el POSA. La solubilización estable puede permitir también la aplicación intracavitaria y/o intratecal de los fármacos de azol como tratamiento de la propagación de la infección peritoneal, pleural y leptomeníngea, si bien se ha de tener cierta cautela en cuanto al bajo pH del infundido así como del (posible) contenido de alcohol bencílico que puede contribuir a la inflamación meníngea que pudiera modificar el umbral de crisis de un paciente.

Finalmente, como quedará claro a los expertos en la materia, los vehículos disolventes de la invención no se limitan al uso con el ITZA y el POSA, y se pueden usar de modo análogo para preparar sistemas disolventes parenterales para otros agentes biológicamente activos muy poco solubles en agua, con un énfasis particular en el resto de miembros de la clase general de los compuestos de azol. Azoles antifúngicos ilustrativos incluyen a) imidazoles tales como el miconazol, el ketoconazol, el clotrimazol, el econazol, el omoconazol, el bifonazol, el butoconazol, el fenticonazol, el isoconazol, el oxiconazol, el sertaconazol, el sulconazol y el tioconazol, b) triazoles tales como el fluconazol, el itraconazol, el isavuconazol, el ravuconazol, el posaconazol, el voriconazol, el terconazol y c) tiazoles tales como la abafungina. Estos son ejemplos, si bien no se limitan a los mismos, de algunos antibióticos que contienen azol que se pueden solubilizar con esta técnica. Otros fármacos que se pueden solubilizar con este planteamiento incluyen, si bien no se limitan a los mismos, fármacos para el hipertiroidismo tales como el carabamizol, agentes citotóxicos tales como los derivados de la epipodofilotoxina, taxanos, bleomicina, antraciclinas, así como compuestos de platino y análogos de la camptotecina. Pueden incluir también otros antibióticos antifúngicos, tales como equinocandinas, polienos (por ejemplo, la anfotericina B y la natamicina) así como agentes antibacterianos (por ejemplo, la polimixina B y la colistina), fármacos antivirales y agentes tranquilizantes/anestésicos tales como las benzodiazepinas y los antipsicóticos, poco solubles en agua. Así pues, en un sentido más amplio, la presente invención proporciona un método para solubilizar y administrar de forma segura muchos agentes farmacológicamente activos poco solubles en agua, además del ITZA y del POSA como ejemplos de los diversos miembros de los grupos de compuestos químicos farmacéuticamente activos denominados compuestos de azol o triazol.

De acuerdo con esto, una realización de la invención se refiere a una composición que contiene azol para uso parenteral que comprende el fármaco de azol y un primer disolvente que comprende EtOH acidificado y/o alcohol bencílico así como PEG, tal como PEG-400, estando la composición esencialmente libre de tensioactivos no iónicos y comprendiendo menos de un 5 % de agua. En realizaciones aún más preferentes, las composiciones de azol comprenderán menos de un 3 % de agua, o menos de un 1 % de agua, o lo más preferente, estarán esencialmente libres de agua. El fármaco de azol se disuelve en el primer disolvente compuesto y, antes de su administración, la composición se mezcla preferentemente con un segundo diluyente que comprende un líquido para infusión acuoso que permite la administración clínica conveniente a un mamífero, preferentemente un animal doméstico grande y lo más preferente un humano.

Preferentemente, el alcohol tal como el EtOH o el alcohol bencílico comprende entre un 1 y un 25 % del primer disolvente y el ácido comprende entre un 1 y un 10 % del primer disolvente, de modo que se obtiene un pH subfisiológico en el disolvente, preferentemente un pH inferior a 4; finalmente el PEG comprende más preferentemente entre un 10 y un 90 % (v/v) del primer disolvente compuesto.

La invención no se limita al EtOH acidificado y/o el alcohol bencílico con el PEG. Se pueden usar también otros disolventes, tales como ácidos orgánicos, para modificar sustancialmente el pH. Líquidos para infusión útiles incluyen, si bien no se limitan a los mismos, la solución salina normal y la dextrosa en agua. De modo alternativo, el líquido para infusión puede ser un líquido para infusión en emulsión basado en lípidos tales como los usados en la nutrición parenteral.

Antes de la dilución con el líquido para infusión, la composición comprende preferentemente entre 1 mg/ml y 30 mg/ml de fármaco de azol y, más preferentemente, comprende entre 2 mg/ml y 6 mg/ml del agente. Preferentemente, la composición sin diluir es estable durante al menos 24 horas e, incluso más preferentemente, es estable durante más de 3 días a temperatura ambiente (TA).

En una realización particularmente preferente, el diluyente secundario es un líquido para infusión acuoso, es decir, solución salina normal y la composición final comprende entre 1 mg/ml y 5 mg/ml de ITZA después de la mezcla en

el diluyente secundario terminal. La composición diluida es estable durante al menos 12 horas, pero preferentemente durante más de 24 horas a temperatura ambiente.

Los nuevos vehículos disolventes de la invención no se limitan al ITZA, sino que se pueden usar para facilitar la administración parenteral de otros fármacos con muy poca solubilidad en agua que incluyen, preferentemente, otros miembros de la familia general de los compuestos denominados normalmente compuestos de azol o triazol, si bien incluirán también otros agentes farmacéuticamente activos muy poco solubles en agua. Tal y como se ha indicado, tales fármacos incluyen, si bien no se limitan a los mismos, agentes citotóxicos tales como los derivados de la epipodofilotoxina, taxanos, bleomicina, antraciclinas, así como compuestos de platino. Pueden incluir también antibióticos, tales como polienos poco solubles en agua (por ejemplo, la anfotericina B y la natamicina) y otros agentes antifúngicos tales como los miembros del grupo denominado normalmente equinocandinas, así como agentes antibacterianos (por ejemplo, la polimixina B y la colistina), fármacos antivirales que incluyen, si bien no se limitan a los mismos, análogos de nucleósidos usados habitualmente para tratar infecciones tales como la hepatitis y las infecciones causadas por retrovirus. Asimismo, incluyen fármacos tranquilizantes e hipnóticos/anestésicos tales como las benzodiazepinas, el propofol y agentes antipsicóticos. De acuerdo con esto, otra realización de la invención incluye una composición para uso parenteral que comprende: un agente farmacéuticamente activo lipófilo/ insoluble en agua o poco soluble en agua; y un primer disolvente, comprendiendo el primer disolvente un alcohol acidificado, un agente para disminuir el pH (ácido), así como un polietilenglicol (PEG, preferentemente con un peso molecular promedio de 400 Daltons) que contribuirá a un microambiente lipófilo. El agente farmacéuticamente activo se disuelve en el primer vehículo disolvente compuesto. La composición comprende adicionalmente de modo opcional un diluyente secundario tal como un líquido para infusión acuoso, que favorecerá la administración a un mamífero (preferentemente un humano o un animal doméstico) a través de un catéter permanente.

La invención incluye también un método para la preparación de un agente farmacéuticamente activo lipófilo/poco soluble en agua para uso parenteral, que comprende las etapas de: 1) proporcionar un sistema disolvente compuesto basado en el principio de la cosolencia, y 2) disolver el agente farmacéuticamente activo en el vehículo disolvente primario para producir una formulación madre. Preferentemente, el alcohol primario es el EtOH, el componente para disminuir el pH es (un) ácido tal como el ácido clorhídrico y/o el ácido cítrico, que se mezcla adicionalmente con PEG, y el agente farmacéuticamente activo es el ITZA, el POSA o un representante alternativo de la generación posterior de la familia de los (tri)azoles. El método puede comprender adicionalmente la etapa de mezclar la formulación madre con un segundo diluyente acuoso, tal como el líquido para infusión acuoso, a fin de facilitar una administración clínica del fármaco segura y conveniente. Además del EtOH y del alcohol bencílico, se pueden usar otros alcoholes y ácidos débiles (por ejemplo, orgánicos) tal como el ácido acético, para formar el disolvente primario sin alejarse del espíritu y del alcance de la invención.

La invención incluye también un método para el tratamiento de una enfermedad que es sensible o que responde a un tratamiento antifúngico que contiene azoles (por ejemplo, el ITZA o el POSA) que comprende: administrar por vía parenteral la cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de un fármaco de azol realmente solubilizada de sistémicamente a un mamífero, comprendiendo la composición: un fármaco de azol tal como el ITZA o el POSA; un primer disolvente, comprendiendo el primer disolvente un alcohol acidificado y PEG, en el que el fármaco se disuelve en este vehículo disolvente compuesto; y un diluyente secundario, comprendiendo el segundo diluyente un líquido para infusión acuoso clínicamente aceptable que hará factible la administración segura del fármaco disuelto sistémicamente a un mamífero. Enfermedades que se pueden tratar incluyen, si bien no se limitan a las mismas, infecciones fúngicas que incluyen aquellas causadas por especies bien de levaduras o bien de mohos, *Histoplasma spp.*, y enfermedades neoplásicas tales como la leucemia, el linfoma, la enfermedad de Hodgkin, un trastorno mieloproliferativo o mielodisplásico, o una enfermedad autoinmune y un rechazo a un trasplante de órganos. Preferentemente, la composición se administra por vía intravascular, sin embargo es concebible que el agente se pueda administrar también por vía intratecal, por vía intrapleural o por vía intraperitoneal, entre otras vías. Tras mezclarla con una base de pomada adecuada, o suspenderla en la misma, la composición se puede aplicar por vía tópica, tal como en el tratamiento de una infección dérmica o vaginal (localizada). El paciente puede ser cualquier animal. Más preferentemente, el animal es un mamífero y, lo más preferente, un humano.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en esta solicitud, significa que se añade una cantidad suficiente de la composición para conseguir un efecto terapéutico deseado, preferentemente partiendo de la primera dosis o, de modo alternativo, de modo que se pueda conseguir un efecto terapéuticamente deseado tras una fase adecuada de administraciones (sistémicas) repetidas. La cantidad real usada variará dependiendo de numerosos factores, tales como el tipo de enfermedad, la edad, el sexo, la salud, la especie y el peso del paciente, y el uso y la duración del uso, así como otros factores conocidos por los expertos en la materia.

Otra realización adicional de la invención se refiere a un método para la administración parenteral de un fármaco de azol tal como el ITZA o el POSA a un paciente que comprende: 1) proporcionar un primer disolvente compuesto basado en el principio de la cosolencia; 2) disolver el ITZA o el POSA en el vehículo disolvente primario para producir una formulación madre; 3) mezclar la formulación madre con un segundo diluyente para formar un líquido para infusión; y 4) administrar el líquido para infusión al paciente. Preferentemente, el primer vehículo disolvente compuesto está comprendido por un alcohol acidificado, más preferentemente es EtOH mezclado con HCl y/o ácido cítrico, y el segundo componente es PEG-400. Sin embargo, además del EtOH, del alcohol bencílico y del HCl, se

pueden usar otros alcoholes y ácidos, y otros PEG con pesos moleculares alternativos al descrito en los experimentos de los presentes inventores se pueden sustituir para formar el diluyente primario sin alejarse del espíritu y del alcance de la invención.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferentes de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención y, por tanto, se puede considerar que constituyen modos preferentes para su puesta en práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deberán apreciar, a la luz de la presente divulgación, que se pueden efectuar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin alejarse del espíritu y del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Formulaciones de itraconazol aceptables para administración parenteral

Este ejemplo demuestra el exitoso diseño de formulaciones estables de ITZA que usan vehículos disolventes que son no tóxicos y adecuados para administración parenteral. Se calculó la solubilidad/estabilidad necesaria y se evaluaron las preparaciones mediante la técnica de la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se definió la solubilidad y la estabilidad deseadas del ITZA en diversos disolventes relevantes para la administración intravascular, intracavitaria o intratecal en humanos y animales domésticos, y se mejoró la solubilidad del ITZA en vehículos fisiológicamente aceptables usando el principio racional de la cosolubilidad.

Materiales y métodos

Compuestos químicos

El propilenglicol, el Cremophor EL, el Tween 80, el ácido clorhídrico 6 N, el ácido cítrico 2 M y el alcohol bencílico se obtuvieron en Sigma (St. Louis, MO). El polietilenglicol 400, la 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, la dextrosa y el ácido acético se adquirieron en Fisher (Pittsburgh, PA). El etanol era de Decon Labs. Inc. (King of Prussia, PA) y el Intralipid se adquirió en Fresenius Kabi (Uppsala, Suecia).

Ensayo de HPLC

El sistema de HPLC incluía: una columna analítica (Nova-pak C18 con perlas de 4 µm; 150 mm x 3,9 mm; Waters Corp., Milford, MA), un automuestreador (automuestreador modelo Waters 717 plus, una bomba (controlador del sistema modelo Waters 600E) ajustada para administrar 1 ml/min y un detector de UV (detector de absorbancia ajustable modelo Waters® 486) ajustado a 261 nm para el ITZA y el POSA, a 273 nm para el MBZSA, a 230 nm para el KZSA y a 259 nm para el FZSA. La fase móvil para el ITZA, el KZSA y el MBZSA era una mezcla de un 60 % de acetonitrilo en H₂O más un 0,05 % de dietilamina, rociada al 60 % con helio como agente de desgasificación. La fase móvil para el FZSA era un 30 % de acetonitrilo en H₂O más un 0,05 % de dietilamina. Se inyectó un volumen de 10-30 µl en el sistema de HPLC para la cuantificación del ITZA y sus análogos.

Estudios de solubilidad

Se disolvieron el ITZA y sus análogos en diversos disolventes, se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, se enfriaron hasta temperatura ambiente, se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 1 min. Se analizó el sobrenadante usando el sistema de HPLC para determinar la solubilidad máxima del ITZA y sus análogos de azol.

Estudios de estabilidad

Para determinar su estabilidad a largo plazo, se disolvió ITZA (4 mg/ml) en el disolvente H3 (2,36 mg/ml de ácido cítrico, 3,42 % de alcohol bencílico, 68,5 % de PEG-400, 26,55 % de etanol y ácido clorhídrico 0,059 N), y se almacenó a temperatura ambiente durante 2 meses o bien a 40 °C durante 1 mes. Se incubó el ITZA en el disolvente H3 en tubos sellados.

Para determinar su estabilidad a corto plazo, se incubaron el ITZA y sus análogos en el disolvente H3 o en el disolvente H3/solución salina (1:1) a temperatura ambiente y se analizaron al cabo de 0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas.

Para ambos estudios de estabilidad, a largo plazo y a corto plazo, se analizaron cuantitativamente mediante HPLC las muestras por triplicado en diferentes puntos de tiempo tras las diluciones apropiadas.

Ensayo de pH

Se determinó el pH del disolvente H3/solución salina, con o sin 2 mg/ml de ITZA o sus análogos. Se analizaron las muestras por triplicado del disolvente solo o del disolvente con diversos fármacos.

Experimento en animales

Se usaron ratones Swiss Webster para los estudios farmacocinéticos del ITZA y sus análogos. La dilatación de la vena se consiguió mediante calentamiento de los ratones usando una lámpara de calor. Tras la dilatación, los ratones se encerraron en un retenedor de ratones y se les inyectó IV lentamente una solución de 1,5 mg/ml de ITZA o sus análogos (aproximadamente 100 µl) en la vena lateral de la cola de los ratones durante 3-4 min. Se dejó que los ratones se recuperaran y se obtuvieron muestras de sangre mediante punción cardíaca bajo anestesia general con isoflurano/oxígeno mediante un vaporizador en distintos puntos de tiempo. Se obtuvo el plasma mediante centrifugación de la muestra de sangre a 3.200 r.p.m. durante 5 min a 4 °C. Las proteínas del plasma se precipitaron mediante la adición de acetonitrilo (dos veces el volumen del plasma). La mezcla se agitó con formación de un vórtice durante 30 segundos y se centrifugó durante 5 min a 14.000 r.p.m. Se reservó el sobrenadante y se inyectó en el sistema de HPLC para determinar las concentraciones de fármaco respectivas.

Preparación del vehículo disolvente prototipo y de la solución madre primaria

Se preparó una solución de alcohol bencílico/EtOH/HCl/PEG/ITZA ("solución madre primaria") tal y como se menciona en estos Ejemplos tal como sigue.

En una primera etapa, se determinó la solubilidad máxima del ITZA en diversos disolventes individuales. Para tal fin, se disolvieron el ITZA y sus análogos en diversos disolventes, se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, se enfriaron hasta temperatura ambiente, y se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 1 min. El sobrenadante se analizó usando el sistema de HPLC para determinar la solubilidad máxima del agente respectivo. Los resultados se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1 -solubilidad máxima del itraconazol en diversos disolventes individuales.

	mg/ml
Ácido acético	144,34
Ácido acético al 50 %	12,92
Ácido acético al 25 %	0,30
Ácido acético al 10 %	0,86
Solución salina normal	0,48
Aceite de ricino polioxietilado	0,89
Propilenglicol	0,14
Ácido cítrico 2 M	3,22
Etanol	0,41
HCl 6 N	7,41
PEG-400	2,51
PEG-300	1,81
PEG-200	1,45
Intralipid	0,15
Alcohol bencílico	> 128,26

En una segunda etapa, se determinó la solubilidad del ITZA en un vehículo disolvente compuesto (H3).

Disolvente H3

Componentes	Concentraciones finales
Ácido cítrico	2,36 mg/ml
Alcohol bencílico	3,42 %
PEG-400	68,5 %
EtOH	26,55 %
HCl	0,059 N

Se determinó la solubilidad máxima del ITZA en el solvente H3 que contenía alcohol bencílico a temperatura ambiente y era de aproximadamente 31,4 mg/ml.

En una expansión de esta fase, se determinó la solubilidad máxima del ITZA en diversos disolventes compuestos de acuerdo con el principio de la cosolventia.

Disolvente B

Componentes	Concentraciones finales
Ácido cítrico	2 mg/ml
Alcohol bencílico	2,9 %
Tween 80	8 %
PEG-400	58 %
EtOH	30,5 %
HCl	0,05 N

La solubilidad máxima del itraconazol en el disolvente B fue de 29 mg/ml.

5 Disolvente J

Componentes	Concentraciones finales	J1	J2	J3	J4	J5
Ácido cítrico		2 mg/ml				
Alcohol bencílico		2,9 %				
		7 %	10 %	15 %	20 %	25 %
10 % de hidroxipropil-β-ciclodextrina	(10 % de ciclodextrina, v/v, denominada 100 %)					
PEG-400		58 %				
EtOH		30,5 %	27,5 %	22,5 %	17,5 %	12,5 %
HCl		0,05 N				

Las solubilidades del itraconazol en el disolvente J fueron:

Disolvente	ITZA (mg/ml)
J1	18,13
J2	15,99
J3	10,11
J4	6,09
J5	3,54

10

Disolvente K

Componentes	Concentraciones finales
Alcohol bencílico	1,9 %
Intralipid	4,9 %
PEG-400	39,2 %
EtOH	20,6 %
Ácido acético	33,3 %

15 La solubilidad máxima del itraconazol en el disolvente K a TA fue de 11,1 mg/ml.

Disolvente L

Componentes	Concentraciones finales
HP-beta-ciclodextrina	32 %
PEG-400	60 %
H ₂ O	8 %
HCl	0,05 N

20 La solubilidad máxima del itraconazol en el disolvente L fue de 5 mg/ml.

Las solubilidades de los azoles en los vehículos de la variante H3 sin alcohol bencílico (H3D y H3G) se llevaron a cabo y los resultados se recogen en la Tabla 2. Las formulaciones del H3D y del H3G fueron las siguientes:

25 Disolvente H3D y H3G

Composición del disolvente	H3D	H3G
Ácido cítrico (mg/ml)	2,36	2,36
Etanol (%)	17,7	11,8

HCl	0,059	0,059
PEG-400	80,7	86,6

Tabla 2

Condiciones de la HPLC

Flujo ml/min, rociado al 60 %.

5 10 µl inyectados al sistema de HPLC

Disolvente	Fármaco	^	TA	ABC	[Fármaco] mg/ml	Promedio mg/ml
H3D	ITZA	261 nm	4,737	9580865	19,1	19,0
			4,737	9472072	18,9	
H3G			4,738	9631929	19,2	19,3
			4,739	9718954	19,4	
H3D	KZSA	230 nm	2,627	5138394	15,4	15,3
			2,631	5082173	15,2	
H3G			2,634	4954869	14,8	14,9
			2,632	5034867	15,1	
H3D	MBZSA	273 nm	1,286	3368622	6,4	6,4
			1,287	3381501	6,5	
H3G			1,287	3105982	5,9	5,9
			1,286	3110974	5,9	
H3D	FZSA	259 nm	1,842	774441	38,6	36,1
			1,846	673647	33,5	
H3G			1,846	569780	28,4	30,3
			1,849	647381	32,2	
H3D	POSA	261 nm	2,489	3399423	33,8	35,34
			2,491	3527182	35,08	
			2,493	3733502	37,14	
H3G			2,494	3080892	30,62	32,17
			2,496	3405758	33,86	
			2,496	3222914	32,04	

FZSA; Fluconazol, ITZA; Itraconazol, MBZSA; Mebendazol,
KZSA; Ketoconazol, POSA; Posaconazol.

Conclusiones:

10 Basándose en estos experimentos en condiciones estandarizadas se concluyó que:

- 1) La solubilidad y la estabilidad consistentes más altas del ITZA a TA se encontraron en las variantes del sistema H3, en el que
- 2) El itraconazol se disolvió preferentemente en un disolvente compuesto a un pH subfisiológico bajo, que necesitaba la inclusión de un componente de alcohol ácido en el vehículo disolvente.
- 3) El equilibrio hasta el 100 % v/v se beneficiaría de la inclusión de un alcohol fisiológicamente aceptable tal como el EtOH, y
- 4) Con la inclusión del alcohol bencílico en el vehículo se consiguió una solubilidad estable más alta.
- 5) Después, el vehículo disolvente se beneficiaría de la inclusión de PEG-400 para imitar un medio lipófilo como excipiente,
- 6) Finalmente los vehículos disolventes compuestos preferentes deben permitir una etapa de dilución final con un líquido para infusión clínicamente aceptable que incluye, si bien no se limitan a las mismas, la solución salina normal o la dextrosa en agua.

25 Investigaciones de estabilidad

En la siguiente etapa se determinó a temperatura ambiente la estabilidad del ITZA (a aproximadamente 4 mg/ml) en un disolvente compuesto preferente a una concentración madre clínicamente relevante por sí misma, y tras dilución con un volumen similar de líquido para infusión clínicamente aceptable.

30 La Tabla 3A que sigue expone los resultados de los estudios de estabilidad a temperatura ambiente, y la Tabla 3B lista los resultados de la estabilidad a 40 °C.

Tabla 3A**Estabilidad del ITZA (a aproximadamente 4 mg/ml) en el disolvente base H3 a temperatura ambiente.**

Tiempo	ITZA (mg/ml)	Estabilidad (%)
0	3,84	100
24 h	3,81	99
48 h	3,69	96
72 h	3,66	95
96 h	3,38	88
7 días (1 semana)	3,48	91
9 días	3,22	84
11 días	2,97	77
14 (2 semanas)	3,18	83
18 días	3,05	80
21 (3 semanas)	3,05	79
28 (4 semanas)	2,89	75
35 (5 semanas)	2,96	77
49 (7 semanas)	3,02	79
63 (9 semanas)	2,89	75

5

Tabla 3B**Estabilidad acelerada del ITZA (aproximadamente 4 mg/ml) en disolvente H3 a 40 °C**

Tiempo	ITZA (mg/ml)	Estabilidad (%)
0	3,84	100
3 h	3,98	104
6 h	3,76	98
24 h	3,52	92
30 h	3,43	89
48 h	3,23	84
54 h	3,04	79
72 h	2,91	76
78 h	3,05	80
4 días	2,99	78
7 días	2,68	70
8 días	2,68	70
9 días	2,23	58
10 días	2,28	59
11 días	2,21	58
14 días	2,16	56
16 días	2,10	55
18 días	2,09	54
21 días	1,74	45
25 días	1,43	37
28 días	1,15	30
32 días	0,93	24

Los datos anteriores se recogen y se muestran gráficamente en las Figuras 1A y 1B, respectivamente.

10

La Tabla 4 siguiente muestra los resultados obtenidos para la estabilidad del itraconazol en el disolvente H3/solución salina normal (1:1) (concentración final de aproximadamente 2,0 mg/ml) a temperatura ambiente (TA) y, nuevamente, los datos se muestran gráficamente en la Figura 1C.

15

Tabla 4

Tiempo (horas)	ITZA (2,0 mg/ml)	Estabilidad (%)
0	2,04	100
2	1,97	97
4	1,97	97
6	2,06	101
8	2,07	102

14	2,25	109
24	1,92	93

Conclusión: Usando solución salina normal como solución de dilución final, el ITZA a 2 mg/ml es estable hasta más de un 90 % durante al menos 24 horas a TA.

- 5 La Tabla 5 muestra las composiciones de diferentes variantes del disolvente H3.

Tabla 5

Disolventes H3	H3	H3A	H3B	H3C	H3D	H3G
Ácido cítrico (mg/ml)	2,36	2,36	2,36	2,36	2,36	2,36
Alcohol bencílico (%)	3,42	0	0	0	0	0
PEG-400 (%)	68,50	71,8	74,8	77,7	80,7	86,6
EtOH (%)	26,55	26,55	23,6	20,6	17,7	11,8
HCl (N)	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059

- 10 La Tabla 6 muestra los estudios de estabilidad y los resultados del ITZA en diversos vehículos disolventes H3.

Tabla 6

H3D 4 mg/ml		TA	ABC	mg/ml	promedio	Estabilidad %
	0 h	4,479	449672	3,67	3,53	100
		4,785	402066	3,29		
		4,79	445398	3,64		
	2 h	4,796	456125	3,72	3,62	102
		4,795	438574	3,58		
		4,793	434752	3,55		
	4 h	4,826	425075	3,47	3,55	101
		4,827	443570	3,62		
		4,836	436146	3,56		
	6 h	4,855	420642	3,44	3,50	99
		4,855	448469	3,66		
		4,883	414950	3,39		
	8 h	4,904	431148	3,52	3,49	99
		4,899	410046	3,35		
		4,906	439278	3,59		
	24 h	5,025	421172	3,44	3,44	97
		5,028	428925	3,50		
		5,031	412739	3,37		
Disolvente H3G	Tiempo, horas	TA*, min	ABC	[ITZA] mg/ml	[Promedio ITZA] mg/ml	Estabilidad (%)
	0	4,934	436392	3,56	3,50	100
		4,926	427328	3,49		
		4,928	422232	3,45		
	2	4,955	469614	3,83	3,77	108
		4,957	451645	3,69		
		4,959	463700	3,78		
	4	4,974	449754	3,67	3,65	104
		4,975	442904	3,62		
		4,982	446950	3,65		
	6	5,008	428473	3,50	3,52	101
		5,007	421334	3,44		
		5,014	443857	3,62		
	8	5,061	441077	3,60	3,42	98
		5,06	398111	3,26		
		5,065	416459	3,40		
	24	4,754	450275	3,68	3,59	103
		4,755	427042	3,49		
		4,761	443023	3,62		

TR*, Tiempo de retención

- 15 Análisis de los diluyentes finales alternativos (NS, D5W, D10W) sobre la estabilidad del ITZA en solución. La Tabla 7A siguiente expone la solubilidad del azol y la estabilidad en variantes de H3, es decir, diferentes vehículos disolventes compuestos con cantidades variables de EtOH, en ausencia de alcohol bencílico. La Figura 7A muestra

la estabilidad del ITZA en H3D con un 17,7 % de EtOH en ausencia de alcohol bencílico y la Tabla 7B muestra la estabilidad del ITZA en la variante de H3 el H3G, con un 11,7 % de EtOH, y carente de alcohol bencílico. Las Tablas 7A y 7B muestran los datos recogidos gráficamente en las Figuras 1D y 1E.

5

Tabla 7A

ITZA Tiempo Días	H3D	H3D/sol. sal.	H3D/dext. 5 %	H3D/dext. 10 %
0	100	100	100	100
1	94	107	100	98
2	95	107	103	98
3	93	110	108	102
4	94	102	99	99
5	98	90	93	105

Tabla 7B

ITZA Tiempo Días	H3G	H3G.	H3G/dext. 5 %	H3G/dext. 10 %
0	100	100	100	100
1	103	95	102	102
2	100	94	109	102
3	89	80	94	98
4	103	70	99	107
5	106	38	42	31

- 10 La Tabla 8 siguiente muestra el análisis de una curva estándar para el ITZA para los experimentos de estabilidad anteriores, y los datos se exponen gráficamente en la Figura 2.

Tabla 8

11.8.2010 estándar	[ITZA]	TA	ABC	Promedio
	20 mg/ml	4,879 4,883 4,886	2577682 2551820 2383477	2504326
	10 mg/ml	4,883 4,888 4,886	13356911 1197158 1302151	1285407
	5 mg/ml	4,839 4,846 4,846	598440 619476 551207	589708
	1 mg/ml	4,853 4,857 4,892	118515 116128 142795	125813

15

Cálculo de la solubilidad final deseada

- Se calculó un intervalo de solubilidad clínicamente y farmacéuticamente relevante para el ITZA mediante extrapolación a partir de dosis conocidas por tener una eficacia antifúngica significativa en el hombre. Tales estudios clínicos se realizaron usando la preparación oral aprobada por la AAF. Las pautas de tratamiento con el ITZA usadas normalmente prescriben una dosis oral en el intervalo de 200-500 mg una o dos veces al día hasta que se obtiene el efecto antifúngico deseado. Normalmente se puede administrar una dosis de carga inicial, o pulsaciones, de dosis más altas dos o tres veces al día durante varios días, seguido de una dosis de mantenimiento diaria menor (Ref. 29, 42). La pauta de dosis del ITZA clínicamente más eficaz/óptima no se conoce, pero basándose en la semivida terminal aparente de aproximadamente 10-12 horas se ha venido asumiendo normalmente que la administración de una dosis una o dos veces al día (mantenimiento) es suficiente para conseguir los efectos antifúngicos deseados. Es probable que, análogamente a otros agentes antimicrobianos y, en particular al POSA, 1) haya una relación dosis/concentración en plasma/tejido-efecto para obtener una actividad antigúngica (antiinfecciosa) óptima, y 2) haya una dependencia dosis-pauta relativa tanto a los efectos adversos como a la

eficacia antiinfecciosa. Con referencia al POSA y la necesidad de "dosis de carga" repetidas durante 2-3 días (o aproximadamente 60 horas) para conseguir un intervalo de dosis terapéuticas, es preocupante cuando se convierte en la necesidad de un control rápido de infecciones por mohos sistémicas en pacientes inmunocomprometidos y subraya la necesidad de una formulación de dosis solubilizada fiable (Ref. 10, 32). Asimismo, cualquier intento por

5 acelerar la saturación de los niveles tisulares de POSA mediante el aumento de la intensidad de la dosis solo tendrá un éxito parcial debido a su biodisponibilidad impredecible, en el intervalo del 50-60 %, y a una saturación aparente de la absorción intestinal del fármaco con un aumento de la intensidad de la dosis (Ref. 29).

Se descubrió un sistema disolvente que proporciona una formulación madre que a 2-6 mg/ml, es estable (≥ 90 %) durante al menos tres días (72 horas) a TA, y que cuando se diluye con una cantidad igual de un diluyente acuoso secundario, tal como solución salina normal o dextrosa en agua como diluyentes finales preferentes, la formulación de uso resultante es estable a 2 mg/ml durante al menos 24 horas a TA.

Las cifras anteriores demuestran la estabilidad del ITZA solubilizado a TA, tanto en la formulación madre como en la formulación de uso final, basándose en los sistemas disolventes compuestos H3 preferentes que contienen ITZA a aproximadamente 4 mg/ml y, cuando están diluidos con NS o dextrosa en agua, a aproximadamente 2 mg/ml, respectivamente. Específicamente, el ITZA se disolvió en las variantes de los vehículos disolventes compuestos de H3, y después se diluyó hasta concentraciones apropiadas con NS o con dextrosa al 5 % o al 10 % en agua. Tales sistemas solventes compuestos no solo son adecuados para la exploración de tiempos de infusión prolongados (12 $\pm$ horas), sino que permiten también una manipulación farmacéutica conveniente cuando se desean infusiones repetidas. Tal estabilidad prolongada deja un amplio margen de tiempo para la preparación y la manipulación en la farmacia y por el equipo médico antes de la administración real al paciente. Específicamente, si se desea una dosis de tratamiento de 2-5 mg/kg de peso corporal, se podría diluir una formulación madre de ITZA en el intervalo de 2-10 mg/ml en los vehículos disolventes compuestos preferentes H3 de los presentes inventores, cuyas variantes se describen, de modo apropiado en un volumen similar de NS u otro líquido para infusión disponible rutinariamente para conseguir la concentración de uso final deseada. El médico clínico podría elegir infundir el ITZA durante períodos de tiempo bien cortos o bien largos sin tener que cambiar las bolsas de infundido que pudiera ser necesario si la formulación tuviera una estabilidad física más limitada y/o estuviera sujeta a una degradación química. Adicionalmente, no debería haber preocupación si las "horas de servicio" de la farmacia se limitan al servicio diurno normal, ya que la formulación de uso final se puede preparar durante el turno de día, y debido a su estabilidad prolongada en solución aún permitiría de modo conveniente su administración nocturna.

Solubilidad mejorada en disolventes fisiológicamente aceptables

Se determinó la solubilidad del ITZA en diversos vehículos individuales. Brevemente, se equilibró una cantidad conocida del fármaco ITZA, formulado en forma de polvo (Sigma Inc., St Louis, MO), en el disolvente respectivo a TA durante 1-4 horas. Se separó una alícuota, se filtró y se preparó para análisis HPLC a fin de determinar la solubilidad máxima a temperatura ambiente. Basándose en la solubilidad del ITZA en cada vehículo, se mezclaron diferentes disolventes de acuerdo con el principio de la cosolubilidad en un intento por llegar a una solubilidad estable mejorada. Basándose parcialmente en la capacidad de los disolventes individuales para solubilizar el fármaco, se evaluaron entonces diferentes sistemas disolventes compuestos con respecto a los cálculos para llegar a una formulación madre estable que se podría mezclar con un líquido para infusión disponible rutinariamente, tal como la solución salina normal (NS; NaCl al 0,9 % o dextrosa al 5-10 % en agua) y que podría ser útil en la situación clínica. Los presentes inventores asumieron que, bien una administración intermitente, o bien en casos poco frecuentes, una infusión prolongada, serían los modos preferentes de administración, es decir, la elección de una pauta de infusión que requiriera que el vehículo disolvente aceptara una concentración de fármaco disuelto que se podría infundir en un volumen clínicamente aceptable (preferentemente menos de 1.000 ml de volumen total o aproximadamente 500 ml/m² de área de superficie corporal [ASC] y que sería estable durante al menos (8-) 12 horas a TA. La formulación madre fose diluyó después con un diluyente final, es decir, NS o D5W o D10W, para dar una formulación de uso estable. El intervalo deseado de la formulación de uso final era de entre 1 y 5 mg/ml, ya que daría como resultado un volumen final que se podría infundir por vía intravascular de un modo conveniente y seguro.

Se examinaron diversos vehículos fisiológicamente aceptables miscibles con agua que serían compatibles con la administración a humanos (Tabla 1). Los disolventes candidatos incluían el ácido acético, la solución salina normal, la dextrosa en agua, el aceite de ricino polioxietilado, el propilenglicol, el ácido cítrico, el etanol, el HCl, el PEG-400, el alcohol bencílico y, por último, el DMSO. El alcohol bencílico y el ácido acético eran los mejores disolventes primarios, mientras que el ITZA era muy poco soluble en los disolventes acuosos. Por último, existiría, sin embargo, la necesidad de usar un diluyente acuoso segundo/terminal para hacer compatible el infundido con la manipulación clínica rutinaria. Se diseñaron y examinaron diversos vehículos disolventes compuestos; Se prepararon los vehículos disolventes preferentes, denominados en conjunto "H3", basándose en un alcohol acidificado y PEG-400. La adición del alcohol acidificado pretendía conseguir una reducción significativa del pH por debajo de los niveles fisiológicos normales, contribuyendo a mantener el fármaco solubilizado en un infundido lipófilo acidificado (éste último representado adicionalmente mediante la adición de PEG-400). Estos vehículos disolventes compuestos permitían una solubilidad estable del ITZA a concentraciones fácilmente aceptables para la infusión de dosis conocidas previamente por tener una actividad antifúngica/antimicrobiana significativa cuando se administraban dosis repetidas en humanos y animales domésticos (Ref. 10, 27, 29, 40-42, 45), y se demostró que el fármaco permanecía estable

en solución durante al menos 24 horas a TA (Fig. 1).

Ensayo de HPLC

- 5 El sistema de HPLC se modificó a partir de Woestenberghs et al. (Ref. 52). Brevemente, se usó una columna analítica C18 Nova-Pak con un tamaño promedio de perlas de 4 µm; 150 mm x 3,9 mm (Waters, Milford, MA), equipado con un automuestreador Waters 717 plus, un controlador del sistema de bomba modelo 600E (Waters), ajustado para una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. El detector era un detector de fluorescencia ajustable modelo Waters 486 en secuencia con un paquete de software Waters Millennium® para HPLC (Waters, Milford, MA). Se
- 10 ajustó a 261 nm para el itraconazol (ITZA) a 273 nm para el mebendazol (MBZSA), a 230 nm para el ketoconazol (KZSA) y a 259 nm para el fluconazol (FZSA). La fase móvil isocrática para el ITZA, el KZSA y el MBZSA era una mezcla de un 60 % de acetonitrilo en H₂O más un 0,05 % de dietilamina. La fase móvil isocrática para el FZSA era un 30 % de acetonitrilo en H₂O más un 0,05 % de dietilamina. Se inyectó un volumen estandarizado de 10-30 µl en la columna de HPLC para la cuantificación de los respectivos análogos de azol. La Tabla 9 resume los parámetros
- 15 usados para el análisis de HPLC.

Tabla 9. Parámetros de HPLC

Fármaco	Fase móvil*	Velocidad de flujo (ml/min)	Longitud de onda (nm)
Itraconazol	A	1,0	261
Posaconazol	A	1,0	261
Fluconazol	B	1,0	259
Mebendazol	A	1,0	273
Ketaconazol	A	1,0	230
*A - Acetonitrilo:agua 60:40 + 0,05 % dietilamina			
B - Acetonitrilo:agua 30:70 + 0,05 dietilamina			

- 20 El tiempo de retención previsto para el ITZA era de 4,7-5,5 min y, tal y como se esperaba, varió un poco con respecto al compuesto azol particular que se ensayó, tal y como se muestra en la Tabla 8. El tiempo de retención para el POSA fue de 2,5-3 min.

- 25 El ensayo de HPLC proporciona un sistema de detección sensible y preciso para concentraciones bajas de ITZA (compuestos de azol) en solución, tanto mezclas carentes de proteínas como líquidos que contienen proteínas (tales como las muestras clínicamente obtenidas, por ejemplo, plasma sanguíneo), utilizando la detección de fluorescencia en el espectro de UV. Para la detección del ITZA y el POSA, se seleccionó una longitud de onda de 261, basándose en los valores máximos inherentes de absorción y emisión de la molécula de ITZA. Esto se varió según qué análogo de azol particular se examinó (Tabla 9).

- 30 Todos los compuestos químicos eran de calidad HPLC, a menos que se indique lo contrario. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1,0 ml/min. El sistema analítico se basó en la extracción previamente establecida y en la experiencia HPLC con el ITZA tal y como se describió (Ref. 52).

- 35 Para evitar interferencias analíticas en el cromatograma derivadas de las proteínas plasmáticas endógenas cuando se ensaya el ITZA en muestras de plasma, se llevó a cabo una etapa de extracción/purificación, utilizando la precipitación del material proteico con acetonitrilo. Brevemente, se precipitaron las proteínas del plasma mediante la adición de acetonitrilo hasta una proporción de volumen final de plasma:acetonitrilo de 1:2. La mezcla se agitó con formación de un vórtice durante 30 segundos y se centrifugó durante 5 min a 14.000 r.p.m. en una microcentrífuga Eppendorff. El sobrenadante desproteinizado, que contenía el ITZA, se inyectó en el sistema HPLC para determinar la concentración de fármaco.

- Los ejemplos de cromatogramas del ITZA auténticos del ensayo de HPLC se muestran en las Figuras 3A y 3B. La Figura 3 representa dos cromatogramas obtenidos del ensayo de HPLC en los estudios de estabilidad (sin proteínas). El volumen de muestra inyectada era de 10 µl. Las condiciones del ensayo HPLC eran las descritas anteriormente. En estos paneles el fármaco analizado provenía del estudio de estabilidad, en el que el ITZA se disolvió en vehículos disolventes H3 prototipo (a), y se diluyó después usando NS como diluyente final (b). El tiempo de retención de la HPLC en las condiciones anteriores utilizando una columna C18 Nova-Pak fue de 4,7-5,5 min. El ensayo fue lineal desde 0,1 µg/ml hasta 100 µg/ml en las soluciones carentes de proteína, es decir, en los diversos
- 50 sistemas disolventes usados en los estudios de viabilidad y estabilidad de la formulación (Fig. 2). La Figura 2 es la curva estándar de la concentración del ITZA frente al área bajo la curva (ABC) (el área bajo la curva, término usado para denotar el área real medida de un pico en un cromatograma, y también para el área bajo la curva de la concentración en plasma frente al tiempo a lo largo de varias horas después de la administración de un fármaco a un animal o a un humano), para el ensayo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) usado en los estudios de
- 55 estabilidad. El eje X muestra la concentración en µg/ml, y el eje Y muestra el ABC. Se preparó una curva estándar análoga para el estudio farmacológico, véase también a continuación. Los cromatogramas correspondientes

obtenidos con el POSA en el estudio de estabilidad se muestran en la Fig. 3d, cuando se usa el vehículo disolvente compuesto H3G.

Este ensayo de HPLC proporcionó de modo consistente una alta recuperación y exactitud y un menor límite de sensibilidad de aproximadamente 10-20 ng/ml, suficiente para los experimentos planeados. La técnica de HPLC se estandarizó y se usó para todos los estudios de estabilidad sin modificaciones adicionales, excepto si se necesitó al ensayar los diferentes análogos de azol (Tabla 9). Para el estudio farmacológico del plasma *in vivo*, la aparición de picos derivados de proteínas plasmáticas endógenas en el cromatograma exigió la adición de la etapa de extracción/purificación descrita, basada en la precipitación de las proteínas con acetonitrilo. Para el análisis de las concentraciones en plasma del ITZA y del POSA ("soluciones que contienen proteínas"), véase el ejemplo 3 anterior.

Ejemplo 2 - Demostración de la estabilidad *in vitro* y otras propiedades de algunos de los nuevos vehículos disolventes compuestos

En este ejemplo, se evaluaron formulaciones estables de ITZA y POSA, que son adecuadas para administración en humanos. Se estableció la estabilidad química y física del ITZA en vehículos disolventes compuestos. Adicionalmente, se estableció la solubilidad del ITZA en estos vehículos disolventes compuestos, cuando los diluyentes acuosos de uso final fueron la NS y la dextrosa al 5 % y al 10 % en agua, como representativos de soluciones para infusión fácilmente disponibles. Este ejemplo investigó también las propiedades *in vitro* prolongadas de una de estas formulaciones, que incluyen su pH, potencial hemolítico y actividad citotóxica frente a una pluralidad de levaduras, y otras cepas de mohos/hongos, conocidas por ser patógenas en animales domésticos y humanos inmunocomprometidos, a fin de establecer si este sistema o sistemas disolventes prototipo son apropiados para administración sistémica (es decir, intravascular) como terapia de las infecciones sensibles a los compuestos de azol en humanos y otros mamíferos.

Estudios de solubilidad

Se añadió un exceso de ITZA en forma de polvo a una pluralidad de disolventes químicos (Tabla 1) a TA. Cada mezcla se agitó con formación de un vórtice de modo intermitente, se colocó en un ambiente oscuro y se controló visualmente durante hasta 4 horas para comprobar la solubilización. Después de una centrifugación para eliminar las partículas sólidas, se retiraron pequeñas muestras tras intervalos consecutivos de tiempo y se determinó la concentración de ITZA mediante HPLC, tal y como se ha descrito.

Se consiguió una solubilidad máxima en equilibrio de ITZA > 100 mg/ml en ácido acético puro y alcohol bencílico al cabo de 1 hora a TA.

La solubilidad del ITZA fue insignificante en ácido acético diluido, H₂O, solución salina normal, dextrosa al 5 %, aceite de ricino polioxiethylado, polipropilenglicol, ácido cítrico 2 M, etanol, HCl, PEG-400, y en una emulsión lipídica de soja al 20 % (Intralipid®) (Tabla 1). Estos últimos disolventes individuales no se consideraron para el estudio adicional.

En una segunda etapa, se investigó la solubilidad en vehículos disolventes compuestos, basándose en el principio de cosolubilidad. Basándose en estos experimentos, se concluyó que la base disolvente preferentemente podía contener hasta un 5 % de alcohol bencílico, y que el medio lipófilo no acuoso acidificado se puede crear óptimamente usando los codisolventes (clínicamente aceptables) EtOH y PG(-400) mezclados con ácido cítrico y HCl para crear un pH subfisiológico bajo, necesario para mantener el ITZA en solución cuando se añade el diluyente acuoso secundario. Así pues, un vehículo disolvente primario preferente para las investigaciones continuadas estaba compuesto por EtOH (6-27 %, v/v), HCl (0,059 N), y ácido cítrico (1-5 %) ± alcohol bencílico (0-5 %, v/v), con PEG400, (10-90 %, v/v).

A una concentración de ITZA de 2-6 mg/ml en los vehículos disolventes compuestos descritos anteriormente (vehículos disolventes prototipo), el ITZA era estable (más del 90 %) durante más de tres días o 72 horas a TA. Cuando se diluyó la solución madre primaria de disolvente/ITZA con NS o dextrosa en agua hasta 1 - 3 mg/ml respectivamente, el ITZA permanecía estable con > 95 % recuperado durante más de 12 horas (Fig. 1, Fig. 3). Basándose en estos descubrimientos, se determinó que el ITZA solubilizado es suficientemente estable para permitir la manipulación y administración clínica rutinaria en estos vehículos disolventes prototipo. Para los fines de esta solicitud, se contemplaron y estudiaron adicionalmente los dos vehículos disolventes compuestos preferentes; En primer lugar, uno basado en aproximadamente un 2-4 % (v/v) de alcohol bencílico, y en segundo lugar, debido a la preocupación sobre la toxicidad comunicada referente a la exposición al alcohol bencílico en bebés humanos prematuros (Ref. 47-51), una formulación que carecía de alcohol bencílico y basada, en cambio, completamente en una mezcla de EtOH acidificado en PEG-400, usando dextrosa al 10 % en agua como diluyente secundario preferido.

Estabilidad de diversas formulaciones de azol

Se estudió la estabilidad física y química de diversas formulaciones tal como sigue, usando algunas de las

formulaciones preferentes anteriormente descritas como ejemplos:

Se disolvió el ITZA a una concentración madre final de 2-6 mg/ml en alcohol bencílico con EtOH acidificado/PEG-400 (vehículo disolvente madre prototipo para el ITZA) y se incubó a TA y a 40 °C. Se midieron las concentraciones de ITZA resultantes mediante HPLC en muestras tomadas inmediatamente después de la solubilización, y después cada hora durante 8 horas, y después aumentando gradualmente los intervalos de tiempo durante hasta varios días (semanas), dependiendo de la velocidad inicial de solubilización/degradación en el respectivo sistema disolvente.

La solubilidad del ITZA difería notablemente entre diferentes disolventes primarios. Se alcanzó una solubilidad de más de 100 mg/ml usando alcohol bencílico y ácido acético glacial. El etanol acidificado/PEG-400, que fue contribuyó a una dilución posterior en un diluyente acuoso terminal, la NS, de modo que el fármaco o fármacos se pueden administrar de modo conveniente y seguro en una situación clínica sin precipitación inmediata cuando se administran en la circulación sanguínea sistémica (los disolventes prototipo de ITZA/EtOH acidificado-PEG). Se investigaron adicionalmente estos vehículos disolventes madre primarios en los estudios prolongados, ya que estas formulaciones no tenían una degradación registrada del ITZA significativa, incluso durante un periodo prolongado de tiempo (al menos tres días o 72 horas) a TA. En cambio, si bien el ácido acético glacial y el HCl proporcionaban una excelente solubilidad del ITZA, el fármaco comenzó a precipitar en cuanto se usó cualquier diluyente/codisolvente acuoso secundario. Se supuso que, debido a que el ITZA es lipófilo, el alcohol bencílico con EtOH acidificado/PEG-400 podría hacer posible la dilución posterior en un vehículo puramente acuoso (NS o dextrosa al 5 %) sin una precipitación significativa o una degradación química rápida. La concentración "madre" del ITZA en estos disolventes compuestos se mantendría en un mínimo de 2-6 mg/ml, manteniendo la estabilidad y permitiendo la administración de dosis de fármaco clínicamente activo sin dar como resultado altas dosis de EtOH, PEG-400 o alcohol bencílico tras la dilución hasta una concentración de uso final deseada de 1,5-3 mg/ml (Fig. 1, Fig. 3). El potencial hemolítico para la formulación de uso final sería mínimo, si bien debe proporcionar también cantidades despreciables de EtOH al receptor. Así pues, incluso a dosis clínicas hipotéticas de ITZA de 200-500 mg cada 8-12 horas, las dosis totales del paciente de los diversos codisolventes estarían claramente dentro de límites aceptables.

En resumen, la estabilidad del ITZA en el sistema disolvente preferente EtOH acidificado ± alcohol bencílico - PEG-400 era excelente: después de más de 3 días a TA al menos un 90 % del fármaco estaba intacto, aún en disolución, cuando se ensayó mediante HPLC.

Estudios de hemólisis *in vitro*

Se usó un procedimiento simplificado a partir de Parthasarathy et al. para examinar el potencial hemolítico de unas pocas formulaciones seleccionadas, y se infirieron los valores de DL₅₀ de la mayoría de estas formulaciones optimizadas, tal y como se ha descrito previamente (Ref. 53). Brevemente, se mezcló sangre heparinizada con un volumen igual de solución de Alsever. La mezcla se lavó dos veces en PBS, y se preparó después una solución del 10 % (volumen a volumen v/v) de eritrocitos/PBS y se mezcló con cantidades crecientes del disolvente preferente (vehículo disolvente prototipo de EtOH acidificado ± alcohol bencílico con PEG-400 ± NS) sin ITZA. Las mezclas resultantes se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Al final de la incubación, las células se granularon a 10.000 x g en una microcentrífuga Eppendorf, y después de lavar dos veces en NS, los gránulos se resuspendieron y se lisaron usando agua destilada. Se determinó la liberación de hemoglobina en el sobrenadante (es decir, la hemólisis) mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm. Se midió la lisis máxima frente a una solución de eritrocitos de referencia que se había lisado mediante choque hipotónico. Se evaluó después el potencial hemolítico de la formulación madre y de la de uso final preferentes, tal y como se ha descrito. Los resultados se representaron como la fracción de eritrocitos intactos frente a la concentración (porcentaje de volumen total) del vehículo disolvente. El porcentaje de volumen total se definió como el porcentaje en volumen del sistema disolvente en la mezcla tras la adición de la suspensión de eritrocitos. Esto se efectuó para simular la dilución de la formulación de fármaco en el torrente sanguíneo tras la administración parenteral. Se definieron como eritrocitos intactos sanos aquellos que eran capaces de conservar su hemoglobina intracelularmente tras la mezcla con el vehículo disolvente (Ref. 53).

Como puede observarse en la Fig. 4, las formulaciones madre preferentes mostraban un potencial de inducción de la hemólisis muy bajo cuando se usó el vehículo completo en una fracción que era relevante para la administración clínica.

Los datos derivados de experimentos repetidos con el vehículo completo (vehículo disolvente prototipo de EtOH acidificado/PEG-400 y NS) se resumen en la Fig. 4. La Fig. 4 es una gráfica que muestra el potencial hemolítico de la formulación de uso final (-■-). El eje X muestra el sistema disolvente como una fracción del volumen total ensayado. El eje Y muestra el porcentaje de hemólisis. En conclusión, el disolvente H3 preferente que usa el vehículo EtOH acidificado ± alcohol bencílico con PEG-400/NS completo (uso final) tiene un potencial hemolítico muy bajo y debe ser completamente seguro para administración intravascular (e intracavitaria, por ejemplo, intraperitoneal o intrapleural, e intratecal) en mamíferos (preferentemente humanos).

Citotoxicidad *in vitro* del ITZA

Se determinó el potencial antimicrobiano/antifúngico de los sistemas disolventes seleccionados con y sin ITZA frente a diversos aislados tanto de levaduras como de diferentes especies de moho. Los descubrimientos confirman que el ITZA, el POSA, el KTZA y el FZSA conservan la actividad antifúngica, mientras que el MBZSA, como se esperaba, no tenía tal actividad (Tablas siguientes). Los sistemas disolventes variantes no tienen por sí mismos efecto alguno sobre la proliferación de levaduras y mohos.

Tabla 10**A. Levaduras**

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

<i>Candida cruzei</i> (cepa ATCC 6258)		<i>Candida parapsilosis</i>	
Fármaco	CIM	Fármaco	CIM
ITZA	0,07	ITZA	0,03
MBZSA	todas crecidas (ningún efecto del fármaco)	MBZSA	todas crecidas
FZSA	todas crecidas	FZSA	1,2
ITZA (Ref. 2)	0,3	ITZA (Ref. 2)	0,15
KZSA	0,15	KZSA	0,03
ITZA* 0,15		ITZA* 0,07	
ITZA (Ref. 2) es un segundo lote de ITZA disuelto en el vehículo básico de ensayo, ITZA* es un lote de control de ITZA disuelto en DMSO como control positivo			

Los controles de crecimiento (controles negativos, crecimiento de hongos en medio solamente) mostraban un crecimiento excelente. El crecimiento de *Candida* en medio con vehículo disolvente sin fármaco también mostraba un crecimiento excelente.

B. Mohos

Se ensayaron dos mohos hialinos con un estándar leído a las 48 h:

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

Aspergillus fumigatus (cepa ATCC 90906) *Aspergillus fumigatus* (aislado de Lab Clínico)

Fármaco	CIM	Fármaco	CIM
ITZA	1,2	ITZA	0,6
MBZSA	todas crecidas (ningún efecto del fármaco)	MBZSA	5
FZSA	todas crecidas	FZSA	todas crecidas
ITZA (Ref. 2)	0,6	ITZA (Ref. 2)	0,3
KZSA	20	KZSA	20
ITZA* 0,6		ITZA* 0,3	

Para la descripción de ITZA (Ref. 2) y ITZA*, véase más arriba.

A. Ensayo prolongado de mohos

Para determinar adicionalmente la actividad antifúngica de los compuestos en los nuevos sistemas de formulación, los presentes inventores investigaron la eficacia de diversos agentes frente a cepas adicionales de *Mucor* y *Aspergillus* (9/-16 -9/20/2010) (El *Rhizomucor* era un aislado clínico de un aislado de paciente) y el *Aspergillus fumigatus* (cepa ATCC 90906) usado era una repetición del experimento previamente descrito. Nuevamente, se establecieron estudios de susceptibilidad usando el método de ensayo estandarizado (CLSI M38A). Los fármacos usados se proporcionaron en la formulación de uso final H3 descrita que se ha descrito previamente. Todos los fármacos se diluyeron en medio RPMI-Mops (YeastOne, Lote 151416SA Sensititer, fecha de caducidad: enero de 2011).

Como antes, se ensayaron dos mohos diferentes con un estándar leído a las 48 h:

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

Aspergillus fumigatus (cepa ATCC 90906) *Zygomycete* (aislado de Lab Clínico, MDACC)

Fármaco	CIM	Fármaco	CIM
ITZA	1,2	ITZA	2,5

MBZSA	todas crecidas (sin inhibición)	MBZSA	todas crecidas
FZSA	todas crecidas	FZSA	todas crecidas
ITZA (Ref. 2)	0,3	ITZA (Ref. 2)	2,5
KZSA	10	KZSA	38
ITZA*	0,3	ITZA*	2,5

Todos los controles de crecimiento de moho, que incluían los controles con vehículo o vehículos disolventes sin fármaco de azol añadido, crecieron sin inhibición, tal y como se ha descrito anteriormente.

5 Para la descripción de ITZA (Ref. 2) y ITZA*, véase más arriba.

10 Brevemente, se establecieron estudios de susceptibilidad usando una metodología estandarizada (estándar CLSI M38A). Los fármacos se diluyeron en medio RPMI-Mops (Yeast One Broth (Sensititer, producto Y3462, Trek Diagnostic Systems, Cleveland, OH) Sensititer número de lote 151416SA, fecha de caducidad: enero de 2011). Se ensayaron dos cepas diferentes de levaduras, la evaluación estandarizada/leída se realizó 24 horas después del inicio de cada cultivo. Los ensayos se repitieron dos veces y se dieron todos los valores de la CIM (concentración inhibitoria mínima) como un promedio de los tres experimentos.

Tabla 11. Estabilidad del POSA en los disolventes de variante H3

15

POSA en H3D				POSA					
	TR	ABC	Promedio	mg/ml	% de 0	hen H3D/Dext.	TR	ABC	% de 0
					5 %				
0 h	2,554	400826	3,82	3,78	100	0 h	2,564	193985	1,75
	2,554	393993	3,75				2,565	196323	1,77
	2,558	397597	3,78				2,564	199974	1,81
2 h	2,571	385911	3,67	3,79	100	2 h	2,58	196729	1,77
	2,571	400438	3,81				2,581	192890	1,74
	2,575	408252	3,89				2,583	201970	1,83
4 h	2,608	419180	4,00	4,24	112	4 h	2,618	207424	1,88
	2,609	433947	4,15				2,62	200171	1,81
	2,613	475363	4,56				2,621	238841	2,20
6 h	2,631	438783	4,20	4,45	118	6 h	2,643	213853	1,95
	2,632	451738	4,32				2,645	212355	1,93
	2,635	501635	4,82				2,648	213037	1,94
8 h	2,678	437332	4,18	3,99	106	8 h	2,696	205638	1,86
	2,682	395893	3,77				2,701	187614	1,68
	2,687	421950	4,03				2,703	209511	1,90
24 h	2,932	400269	3,81	3,83	101	24 h	2,909	196815	1,78
	2,932	393804	3,75				2,912	198214	1,79
	2,934	411463	3,92				2,92	211982	1,93
POSA en H3G				POSA en H3G/Dext					
	TR	ABC	Promedio	mg/ml	% de 0	5 % 0	TR	ABC	% de 0
0 h	2,558	395039	3,76	3,70	100	0 h	2,564	195301	1,76
	2,558	388090	3,69				2,567	194992	1,76
	2,558	385218	3,66				2,565	187523	1,68
2 h	2,574	412117	3,93	3,78	102	2 h	2,583	202858	1,84
	2,578	392475	3,73				2,584	200590	1,81
	2,577	386425	3,67				2,586	220873	2,02
4 h	2,613	416905	3,98	4,23	114	4 h	2,622	211448	1,92
	2,612	452197	4,33				2,625	210197	1,91
	2,616	456664	4,37				2,627	222523	2,03
6 h	2,637	430900	3,98	4,23	114	6 h	2,65	194434	1,75
	2,638	418489	4,33				2,654	212007	1,93
	2,641	459396	4,37				2,653	220443	2,01
8 h	2,688	387222	3,68	3,57	97	8 h	2,706	189940	1,71
	2,691	365952	3,47				2,711	208630	1,89
	2,691	376511	3,57				2,715	211696	1,92
24 h	2,929	392249	3,73	3,65	99	24 h	2,919	197453	1,78
	2,929	371428	3,52				2,924	199459	1,80
	2,933	388985	3,70				2,927	205780	1,87

Ejemplo 3 - Análisis cuantitativo de ITZA y POSA en plasma y farmacología después de la administración IV

Este ejemplo demuestra que el ITZA en un vehículo disolvente compuesto de variante H3 preferido y mezclado con sangre o plasma se puede recuperar como fármaco nativo usando la tecnología de extracción cuantitativa y el ensayo de HPLC, y que las concentraciones de ITZA y POSA permanecen en el intervalo fungitóxico durante más de una hora tras la administración IV de una dosis de 5 mg/kg. Indica además que la farmacocinética en plasma tras la administración parenteral del ITZA y el POSA en una formulación preferida en ratones se ajusta a lo que se puede esperar basándose en la farmacología publicada del ITZA y el POSA oral. La semivida estimada de aproximadamente 30 min del ITZA en los experimentos *in vivo* preliminares de los presentes inventores aparece significativamente más corta que la de 10+ horas comunicada para el uso del ITZA oral (Ref. 42, 45). Sin embargo, es muy probable que la semivida de 30 min tras una dosis IV única refleje la semivida de distribución inicial de sangre a tejido, que es significativamente más corta que la semivida de eliminación terminal esperada (Ref. 52). Además, la administración oral del fármaco puede llevar a una absorción intestinal lenta durante muchas horas, de modo que la curva de eliminación de concentración-plasma/semivida resultante observada refleje los efectos netos de la absorción desde el intestino a la sangre más la distribución de la sangre a los tejidos y, finalmente, la degradación metabólica, todo lo cual se confunde adicionalmente con la eliminación de primer paso del fármaco que pasa a través de la vena porta al hígado antes de alcanzar la circulación sistémica.

Por tanto, estos conjuntos de datos diferentes no se pueden comparar directamente, sino que la semivida de eliminación de 30 min después de una corta inyección IV coincide con muchos otros fármacos administrados del mismo modo. De modo interesante, el POSA muestra un patrón diferente; Tras una inyección IV de 5 mg/kg durante 4 min la concentración máxima alcanzada era de aproximadamente 3,2-3,3 µg/ml, con una semivida de 6-7 h, a diferencia de la semivida estimada de 15-30 horas tras la administración oral. De nuevo, no hay una comparación directa entre la dosificación oral repetida en humanos y una dosis parenteral única administrada a ratones, sino que los datos demuestran claramente que tras una inyección única se alcanzan las concentraciones en plasma resultantes y permanecen durante un tiempo prolongado en un intervalo de concentraciones que se ha demostrado previamente como fungistático.

Extracción cuantitativa del ITZA en plasma

Se mezclaron 1 mililitro de plasma sanguíneo humano y sangre entera con diversas cantidades del ITZA reformulado (formulación de uso final, es decir, formulación madre mezclada 1:1 con solución salina normal), con sangre o plasma humano, con el fármaco reformulado que constituye menos de un 3 % del volumen total final, para dar una concentración fármaco de 0,2-3,0 µg/ml. El fármaco se extrajo después de las muestras de plasma y se analizó mediante HPLC tal y como se describe en el Ejemplo 1. Brevemente, 1 ml de plasma se mezcló con 1-2 volúmenes de acetónitrilo para precipitar las abundantes proteínas plasmáticas y, tras la centrifugación para eliminar las proteínas, se analizó el fármaco mediante HPLC con el ITZA (frente a un compuesto de azol alternativo) detectado mediante espectrofotometría a las respectivas longitudes de onda descritas anteriormente. La recuperación del ITZA/POSA del plasma humano con adiciones hasta 9 µg/ml se calculó en aproximadamente un 90 %. Tal y como se ha indicado previamente, el ensayo de HPLC fue lineal en el intervalo de aproximadamente 0,1 µg/ml hasta 100 µg/ml.

ITZA y POSA parenterales: Protocolo experimental en ratones Swiss Webster

A menos que se especifique, se realizaron los experimentos análogos usando POSA como una alternativa al ITZA; Se usaron ratones Swiss Webster de ambos sexos con un peso corporal de 25-30 g para los experimentos farmacológicos *in vivo* (HarlanSprague-Dawley, Houston, TX). Se dejó que los animales se adaptaran a su nuevo entorno durante un mínimo de 7 días tras su llegada y se les dejó libre acceso al alimento comercial y al agua corriente antes y durante el periodo de experimentación. Los animales se estabularon en una instalación aprobada por la Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC por sus siglas en inglés) que cumple los requerimientos del USDA, el NHI y el DHHS.

La dosis de ITZA de 5 mg/kg PC se determinó que era una dosis de ensayo adecuada que se podía administrar a los ratones en forma de una inyección IV en embolada lenta (3-4 min) sin requerir sedación, sino que se podía realizar con solo el control físico de los animales en una jaula de tipo embudo convencional.

El ITZA se formuló en el sistema disolvente H3 descrito anteriormente como el disolvente preferente a una concentración madre de 4-5 mg/ml y se diluyó después con NS (proporción 1:1) de modo que la dosis prevista (5,0 mg/kg PC) se pudo inyectar en una vena de la cola en un volumen total de aproximadamente 100 µl. Las concentraciones de ITZA de la formulación de uso final se confirmaron mediante HPLC antes de todas las administraciones de fármaco. No se usó premedicación sedativa para los ratones en este experimento para evitar la posible inducción de las enzimas hepáticas microsomaes que podrían modificar el metabolismo del ITZA. Por tanto, los animales estaban sin anestesiarse, estando solamente controlados físicamente durante e inmediatamente después de la inyección del fármaco.

Se extrajeron muestras de sangre (0,5-1,0 ml) mediante punción cardíaca en tubos heparinizados en puntos de

tiempo seleccionados antes de la infusión del fármaco ("blanco"), y de 5 min a 1 hora después de la inyección del fármaco para la determinación de las concentraciones de ITZA, y durante 5 min a aproximadamente 7 h en el experimento del POSA. Los ratones se expusieron a un 2-4 % de isoflurano para anestesia general. Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción cardíaca y se depositaron inmediatamente en tubos de microcentrífuga heparinizados. La sangre se centrifugó a 2.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, el plasma se separó tal y como se ha descrito y se almacenó a -80 °C hasta que se extrajo y se ensayó mediante HPLC, en un periodo de 24 horas.

ITZA en plasma y resultados farmacológicos del fármaco IV

La extracción del fármaco del plasma usando la precipitación con acetonitrilo de las proteínas plasmáticas era esencial para evitar las interferencias con los componentes de proteínas plasmáticas endógenas y para recuperar la máxima cantidad de fármaco. Los cromatogramas auténticos del plasma blanco (a), el plasma con adiciones de ITZA (b), y una muestra de plasma obtenida del estudio farmacocinético actual (c) se muestran en la Fig. 6. Esta figura muestra los cromatogramas de muestras de plasma extraídas tal y como se describe en el Ejemplo 3 y sometidas después a HPLC. La Figura 6a muestra una muestra blanco de plasma, la Figura 6b muestra una muestra de plasma con adiciones de ITZA en la formulación de disolvente compuesto preferente (H3) hasta 9 µg/ml, y la Figura 6c muestra un cromatograma del estudio farmacológico, en el que se inyectó a un ratón 5 mg/kg de ITZA. El cromatograma era de una muestra extraída 20 minutos después de la inyección del fármaco. Adicionalmente, la Figura 6d muestra una muestra blanco de plasma, la Figura 6e muestra una muestra de plasma con adiciones de POSA en el vehículo disolvente compuesto preferente H3G a 5 µg/ml, y la Figura 6f muestra un cromatograma real de una muestra de plasma de ratón extraída 20 min después de la inyección de POSA a 5 mg/kg en el experimento *in vivo* descrito anteriormente.

El tiempo de retención del ITZA en este sistema fue de 4,7-5,5 min, y el tiempo de retención del POSA fue de 2,4-3 min cuando se usó una columna C18 Nova-Pak (véase el Ejemplo 1). La recuperación del ITZA con la técnica descrita fue de aproximadamente un 90 % del plasma humano con adiciones *in vitro* con 9 µg/ml fármaco. El ensayo fue lineal tras la extracción del fármaco de muestras de plasma humano con adiciones en el intervalo de concentraciones de 0,1 µg/ml 100 µg/ml. La sensibilidad de limitación fue de aproximadamente 10 20 ng/ml cuando se inyectaron 10-30 µl en el cromatógrafo. Se ha de reconocer que el factor limitante aquí es el tamaño de la muestra de partida, ya que técnicamente es muy difícil obtener más de 500 µl de sangre de un solo ratón. Los datos documentados de los inventores pretenden demostrar el hecho de que la inyección IV del ITZA solubilizado da un patrón de eliminación del fármaco en plasma que es análogo al que puede esperarse cuando se administra un fármaco farmacéuticamente activo por vía parenteral, y de que el ITZA intacto se puede recuperar de muestras de sangre obtenidas durante al menos una hora después de la administración del fármaco. Si fuera deseable optimizar la terapia con azoles en una situación clínica cuando se trata una infección en un humano o un animal doméstico, es bastante concebible que la precisión y la exactitud reproducibles del método de HPLC se pudieran mejorar significativamente mediante la extracción y el análisis de mayores volúmenes de muestra, y mediante el uso de una parte mayor del bucle de inyección de 2 ml en el sistema de HPLC. Finalmente, es posible obtener una concentración real de ITZA mayor en la muestra inyectada mediante evaporación/reconstitución de una muestra eluída en un volumen menor antes de su inyección en el sistema de HPLC. Se preparó una curva estándar en el intervalo de 10 ng/ml a 50 µg/ml para el experimento de farmacología (no mostrado), y se obtuvo una buena correlación lineal ($r = 0.9999$) entre las concentraciones en plasma reales de ITZA y los valores del ABC de los picos cromatográficos medidos.

Los datos resultantes ilustran que la nueva formulación de ITZA (azol) utilizada da concentraciones en plasma de ITZA fungistáticas detectables tras la inyección de 5 mg/kg PC de ITZA o POSA en ratones (Fig. 7A y 7B). Las Figuras 7A y 7B son gráficas que muestran el cambio de la concentración en plasma en el transcurso del tiempo, de hasta una hora, cuando se inyectaron 5 mg/kg de ITZA y POSA en ratones. El eje X muestra el tiempo después de la dosis en minutos. El eje Y muestra la concentración de azol por µg/ml de plasma. Las semividas aparentes del ITZA y del POSA están en el intervalo de 30 minutos y 6-7 horas, respectivamente, en las condiciones usadas con esta formulación.

Las inyecciones se toleraron bien, los azoles se inyectaron lentamente, durante 3-4 min, para evitar posibles acontecimientos adversos tales como arritmias cardíacas o eventos hemolíticos agudos significativos, ninguno de los cuales se documentaron en estos experimentos.

En resumen, los datos prueban que las nuevas formulaciones estables, farmacéuticamente aceptables de ITZA, POSA, y otros azoles químicamente relacionados, se pueden usar para administración intravascular en el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos que son sensibles a estos agentes. Los azoles reformulados conservan su actividad antimicrobiana, que se ejemplifica mediante las cepas de levaduras y varios mohos que se usaron en los experimentos *in vitro*, y demuestran que tiene su crecimiento inhibido cuando se exponen al ITZA (azol) formulado en los nuevos vehículos disolventes prototipo. Un vehículo disolvente preferente es fisiológicamente compatible con la administración intravascular y se usó como ilustración para demostrar en el modelo de ratón que la inyección de ITZA y POSA en este sistema disolvente era bien aceptado y confería una toxicidad aguda insignificante del sistema disolvente. La inyección de esta formulación en ratones (5,0 mg/kg PC) dio

concentraciones en plasma de ITZA/POSA que permanecía en el intervalo fungistático durante mucho más de una hora, extrapoladas de la pendiente de la curva de eliminación a lo largo de la primera hora después de la inyección.

Los datos para las formulaciones de uso final de variantes de H3 preferentes, prueban de modo concluyente que ahora es factible reintroducir el ITZA, e introducir el POSA, para administración parenteral en terapia clínica de infecciones sensibles a estos agentes, y demuestran que también el POSA se puede disolver e introducir de modo seguro y completo en la circulación sistémica mediante administración intravascular. Esto cabe esperar que dé como resultado un logro reproducible y predecible de una actividad antifúngica ampliamente mejorada. Estos resultados dan también una expectativa razonable de una toxicidad para los órganos normal insignificante de los vehículos disolventes compuestos. En particular, es posible que se puedan evitar completamente reacciones de hipersensibilidad serias con estas formulaciones, y si estos vehículos compuestos H3D y H3G son seleccionados, no debería haber ningún motivo de preocupación incluso si los fármacos se administran a bebés prematuros o a adultos gravemente enfermos con actividad metabólica hepática subóptima que puede deteriorar la capacidad individual para metabolizar adecuadamente el alcohol bencílico.

Los nuevos sistemas disolventes mejoran no solo la seguridad clínica de la terapia antimicrobiana (antiinfecciosa) basada en los azoles, sino también hacen posible optimizar adicionalmente el uso de estos importantes fármacos en el tratamiento de las infecciones fúngicas y otras infecciones en clientes inmunocomprometidos que pueden tener una biodisponibilidad subóptima de fármacos administrados por vía oral debido al compromiso intestinal y la incapacidad relacionada para mantener una nutrición oral adecuada. Se pueden usar también realizaciones de la invención cuando se tratan pacientes con quimioterapia anticancerosa que tienen alto riesgo de sufrir infecciones fúngicas sistémicas, tales como las presentadas en el tratamiento de acondicionamiento que precede al trasplante de células madre hematopoyéticas.

Referencias

1. Baddley JW, Marr KA, Andes DR, Walsh TJ, Kauffman CA, Kontoyiannis DP, Ito JI, Balajee SA, Pappas PG, Moser SA. "Patterns of susceptibility of *Aspergillus* isolates recovered from patients enrolled in the Transplant-Associated Infection Surveillance Network". *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3271-3275.
2. Campo M, Lewis RE, Kontoyiannis DP. "Invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies at a cancer center: 1998-2009". *J Infect. Dis* 2010;60(5):331-337.
3. Chen SC, Playford EG, Sorrell TC. "Antifungal therapy in invasive fungal infections". *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10(5):522-530.
4. Dutkiewicz R, Hage CA. *Aspergillus* infections in the critically ill". *Proc Am Thorac Soc.* 2010;7(3):204-209.
5. Evans SE. "Coping with *Candida* infections". *Proc Am Thorac Soc.* 2010;7(3):197-203.
6. Glockner A, Karthaus M. "Current aspects of invasive candidiasis and aspergillosis in adult intensive care patients". *Mycoses.* 2010; publicación electrónica.
7. Hicheri Y, Toma A, Maury S, Pautas C, Mallek-Kaci H, Cordonnier C. "Updated guidelines for managing fungal diseases in hematology patients". *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(9):1049-1060.
8. Hsu LY, Ng ES, Koh LP. "Common and emerging fungal pulmonary infections". *Infect Dis Clin North Am.* 2010;24(3):557-577.
9. Ito JI, Kriengkaukyiat J, Dadwal SS, Arfons LM, Lazarus HM. "Approaches to the early treatment of invasive fungal infection". *Leuk Lymphoma.* 2010;51 (9):1623-1631.
10. Jang SH, Colangelo PM, Gobburu JV. "Exposure-response of posaconazole used for prophylaxis against invasive fungal infections: evaluating the need to adjust doses based on drug concentrations in plasma". *Clin Pharmacol Ther.* 2010;88(1):115-119.
11. Kim A, Nicolau DP, Kuti JL. "Hospital costs and outcomes among intravenous antifungal therapies for patients with invasive aspergillosis in the United States". *Mycoses.* 2010; publicación electrónica.
12. Lehrnbecher T, Attarbaschi A, Duerken M, Garbino J, Gruhn B, Kontny U, Luer S, Phillips R, Scholz J, Wagner HJ, Wiesel T, Groll AH. "Posaconazole salvage treatment in paediatric patients: a multicentre survey". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29:1043-1045.
13. Lewis RE, Kontoyiannis DP. "Invasive aspergillosis in glucocorticoid-treated patients". *Med Mycol.* 2009;47 Suppl 1:S271-281.

14. Lortholary O, Obenga G, Biswas P, Caillot D, Chachaty E, Bienvenu AL, Cornet M, Greene J, Herbrecht R, Lacroix C, Grenouillet F, Raad I, Sitbon K, Troke P. "International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole". *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4446-4450.

15. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, Anaissie EJ, Brumble LM, Herwaldt L, Ito J, Kontoyiannis DP, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA, Park BJ, Patterson TF, Perl TM, Oster RA, Schuster MG, Walker R, Walsh TJ, Wannemuehler KA, Chiller TM. "Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET)". *Clin Infect Dis*. 2010;15;50(8):1101-1111. .

16. Person AK, Kontoyiannis DP, Alexander BD. "Fungal infections in transplant and oncology patients". *Infect Dis Clin North Am*. 2010;24(2):439-459.

17. Singh N, Limaye AP, Forrest G, Safdar N, Munoz P, Pursell K, Houston S, Rosso F, Montoya JG, Patton P, Del Busto R, Aguado JM, Fisher RA, Klintmalm GB, Miller R, Wagener MM, Lewis RE, Kontoyiannis DP, Husain S. "Combination of voriconazole and caspofungin as primary therapy for invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients: a prospective, multicenter, observational study". *Transplantation*. 2006;81(3):320-326.

18. Torres HA, Hachem RY, Chemaly RF, Kontoyiannis DP, Raad, II. "Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal". *Lancet Infect Dis*. Dec 2005;5(12):775-785.

19. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, Tarantolo SR, Greinix H, Morais de Azevedo W, Reddy V, Boparai N, Pedicone L, Patino H, Durrant S. "Posaconazole or Fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease" *N Engl J Med*. 2007;356(4):335-347.

20. Vehreschild JJ, Ruping MJ, Wisplinghoff H, Farowski F, Steinbach A, Sims R, Stollorz A, Kreuzer KA, Hallek M, Bangard C, Cornely OA. "Clinical effectiveness of posaconazole prophylaxis in patients with acute myelogenous leukaemia (AML): a 6 year experience of the Cologne AML cohort". *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(7):1466-1471.

21. Walsh TJ, Driscoll T, Milligan PA, Wood ND, Schlamm H, Groll AH, Jafri H, Arrieta AC, Klein NJ, Lutsar I. "Pharmacokinetics, safety, and tolerability of voriconazole in immunocompromised children". *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4116-4123.

22. Wingard JR, Carter SL, Walsh TJ, et al. "Randomized double-blind trial of fluconazole versus voriconazole for prevention of invasive fungal infection (IFI) after allo hematopoietic cell transplantation (HCT)". *Blood*. Sep 8.

23. Winston DJ, Barton K, Territo MC, Schiller GJ. "Efficacy, Safety, and Breakthrough Infections Associated with Standard Long-Term Posaconazole Antifungal Prophylaxis in Allogeneic Stem-Cell Transplant Recipients". *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010, publicación electrónica.

24. Greer ND. "Posaconazole (Noxafil): a new triazole antifungal agent". *Baylor Univ Med Center Proc*. 2007;20:188-196.

25. Carrillo-Munoz AJ, Quindos G, Ruesga M, et al. "Antifungal activity of posaconazole compared with fluconazole and amphotericin B against yeasts from oropharyngeal candidiasis and other infections". *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2005;55(3):317-9.

26. Dodds Ashley ES, Alexander BD "Posaconazole". *Drugs of today* 2005;41(6):393-400.

27. Groll AH, Walsh TJ "Antifungal efficacy and pharmacodynamics of posaconazole in experimental models of invasive fungal infections". *Mycoses* 2006;49 Suppl 1:7-16.

28. Notheis G, Tarani L, Costantino F, et al. "Posaconazole for treatment of refractory invasive fungal disease". *Mycoses* 2006;49 Suppl 1:37-41.

29. Courtney R, Pai S, Laughlin M, Lim J, Batra V. "Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47(9):2788-95.

30. Dodds-Ashley E. "Management of drug and food interactions with azole antifungal agents in transplant recipients". *Pharmacotherapy*. 2010;30(8):842-854.

31. Benet LZ, Sheiner LB. "Pharmacokinetics: The dynamics of drug absorption, distribution, and elimination". En: Goodman Gilman A, Goodman LS, Rall TW, Murad F. (Eds.). Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7th Edition. MacMillan Publishing Co. Nueva York, NY. 1985; P. 8.

32. Zhou H, Goldman M, Wu J, Woestenborghs R, Hassell AE, Lee P, Baruch A, Pesco-Koplowitz L, Borum J, Wheat LJ. "A pharmacokinetic study of intravenous itraconazole followed by oral administration of itraconazole capsules in patients with advanced human immunodeficiency virus infection". *Clin Pharmacol*. 1998;38(7):593-602.
33. Cserháti T. "Alky ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: interaction with bioactive compounds and biological effects". *Environ Health Perspec*. 1995;103(4):358-364.
34. Dimitrijevic D, Shaw AJ, Florence AT. "Effects of some non-ionic surfactants on transepithelial permeability in Caco-2 cells". *J Pharm Pharmacol*. 2000;52(5):157-162.
35. Warisnoicharoen W, Lansley AB, Lawrence MJ. "Toxicological evaluation of mixtures of nonionic surfactants, alone and in combination with oil". *J Pharm Sci*. 2003;92(4):850-868.
36. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. "Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation". *Eur J Cancer*. 2001;37(13):1590-1598.
37. Coors EA, Seybold H, Merk HF, Mahler V. "Polysorbate 80 in medical products and nonimmunologic anaphylactic reactions". *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;95(6):593-599.
38. Tamilvanan, S. "Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems". *Prog Lipid Res*. 2004;43(6):489-533.
39. Driscoll, D. "Safety of parenteral infusions in the critical care setting". *Advanced Studies in Medicine*. 2002;2(9):338-342.
40. Boothe DM, Herring I, Calvin J, Way N, Dvorak J. "Itraconazole disposition after single oral and intravenous and multiple oral dosing in healthy cats". *Am J Vet Res*. 1997;58(8):872-77.
41. Davis JL, Salmon JH, Papich MG. "Pharmacokinetics and tissue distribution of itraconazole after oral and intravenous administration to horses". *Am J Vet Res* 2005;66(10):1694-1701.
42. Willems L, Van der Geest R, de Beule K. "Itraconazole oral solutions and intravenous formulations; a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics". *J Clin Pharm Ther*. 2001;26(3):159-169.
43. Spiegel A.J. Noseworthy M.N. "Use of nonaqueous solvents in parenteral products". *J Pharm. Sci*. 1963;52:917-927.
44. Yalkowsky S.H., Roseman T.J. "Solubilization of drugs by cosolvents". En: Yalkowsky S.H. (Ed.): *Techniques of solubilization of drugs*. 1981; Págs. 91-134. Marcel Dekker Inc., Nueva York, NY.
45. Van de Velde VJ, Van Peer AP, Heykants JJ, Woestenborghs RJ, Van Rooy P, De Beule KL, Cauwenbergh GF. "Effect of food on the pharmacokinetics of a new hydroxypropyl-beta-cyclodextrin formulation of itraconazole". *Pharmacotherapy* 1996;16(3):424-428.
46. Robertson R: "Common poisonings". En: Wyngarden JB, and Smith LH (Eds.) Cecil. *Textbook of Medicine*. WB Saunders Company, Filadelfia, PA. 1988. Págs. 140-145.
47. "Neonatal deaths associated with use of benzyl alcohol". *MMWR Weekly Report* 1982;31:290-91.
48. American Academy of Pediatrics Committee on Fetus and Newborn. "Benzyl alcohol: toxic agent in neonatal units". *Pediatrics* 1983;72:356-58.
49. Brown WJ, Bulst NR, Gipson H, Huston RK, Kennaway NG. "Fatal benzyl alcohol poisoning in a neonatal intensive care unit". *Lancet* 1982;1(8283):1250.
50. Menon PA, Thach BT, Smith CH, Landt M, Roberts JL, Hillman RE, Hillman LS. "Benzyl alcohol toxicity in a neonatal intensive care unit". *Am J Perinatol* 1984;1(4):288-92.
51. LeBel M, Ferron L, Masson M, Pichette J, Carrier C. "Benzyl alcohol metabolism and elimination in neonates" *Dev Pharmacol Ther*. 1988;11(6):347-56.
52. Woestenborghs R, Lorreyne W, Heykants J. "Determination of itraconazole in plasma and animal tissues by high-performance liquid chromatography". *J Chromatogr*. 1987;413:332-337.

53. Parthasarathy R, Sacks PG, Harris D, Brock H, Mehta K. "Interaction of liposome-associated all-trans-retinoic acid with squamous carcinoma cells". *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1994;34(3):527-34.

54. Gibaldi M, Perrier D. Noncompartmental Analysis based on statistical moment theory. In: *Pharmacokinetics*, 2d Ed, Rev. and expanded, Nueva York, NY, Marcel Dekker, 1982;409-416.

ABREVIATURAS USADAS EN ESTA SOLICITUD

AAALAC - Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio

ATCC - Colección americana de cultivos tipo, Rockville, MD

ABC - Área bajo la curva, término usado para denotar el área de superficie real medida de un pico en un cromatograma, y también para el área bajo la curva de la concentración en plasma frente al tiempo a lo largo de varias horas después de la administración de un fármaco a un animal o a un humano, siendo una medida de la exposición sistémica total del fármaco.

ASC - Área de superficie corporal

PC - peso corporal

CLSI - Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (aquí, proporciona los estándares para el ensayo de susceptibilidad microbiana en laboratorio)

D₅W - dextrosa al 5 % en agua

D₁₀W - dextrosa al 10 % en agua

DMSO - Dimetilsulfóxido

ADN - Ácido desoxirribonucleico

DHHS - Departamento de Salud y Servicios Humanos.

EtOH - Etanol.

AAF - Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos.

FZSA - Fluconazol

HCl - Ácido clorhídrico

HPLC - Cromatografía líquida de alta presión.

Intralípid® - Marca de una emulsión lipídica acuosa preparada principalmente a partir de aceite de soja y comercializada para nutrición parenteral disponible en. La emulsión de lípidos de soja se liofilizó antes de su uso como disolvente en los estudios subsiguientes y se denomina "lípidos" en el presente texto.

ITZA - Itraconazol

KZSA - Ketoconazol

Liposyn® - Marca de una emulsión lipídica acuosa preparada principalmente a partir de aceite de soja y comercializada para nutrición parenteral disponible en Abbott (Abbott Park, IL). La emulsión de lípidos de soja se liofilizó antes de su uso como disolvente en los estudios subsiguientes y se denomina "lípidos" en el presente texto.

MBZA - Mebendazol

CIM - Concentración Inhibitoria Mínima.

NCI - Instituto Nacional del Cáncer.

NIH - Instituto Nacional de la Salud.

nm- nanómetro.

NS - Solución salina normal (NaCl 150 mM en agua).

PBS - solución salina tamponada con fosfato (formulación de Dulbecco, pH 7,4).

5

PEG - y **PEG-400 /PEG400** - Polietilenglicol-400 (es decir, con un peso molecular promedio de 400 Daltons)

PG - Propilenglicol.

10

POSA - Posaconazol

RPMI-Mops - Medio de cultivo de tejidos estandarizado tamponado con tampón Mops (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico, pH 7,2).

15

TA - Temperatura ambiente (22 °C).

TR - Tiempo de retención en el ensayo de HPLC; usado de modo separado cuando se indique.

USDA - Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral, que comprende un agente farmacéutico de azol y un primer disolvente, comprendiendo dicho primer disolvente a) un componente de alcohol seleccionado entre alcohol bencílico y/o etanol acidificado, y b) polietilenglicol (PEG), en donde el agente de azol se disuelve en dicho primer disolvente, estando la composición esencialmente libre de tensioactivos no iónicos y comprendiendo menos de un 5 % de agua.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho primer disolvente comprende tanto etanol como alcohol bencílico, o en la que el primer disolvente comprende etanol acidificado.
3. La composición de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el etanol acidificado se define adicionalmente como una combinación de etanol y un ácido, y el primer disolvente tiene un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, preferentemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 4, y en donde el ácido es preferentemente HCl, ácido cítrico, ácido acético o ácido glutámico.
4. La composición de la reivindicación 1, en la que la proporción de PEG con respecto al alcohol es de 27 a 2, preferentemente de 12 a 8.
5. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho PEG se selecciona de entre el grupo que consiste en PEG-100, PEG-200, PEG-300, PEG-400 y PEG-800, en donde el polietilenglicol es preferentemente PEG-400.
6. La composición de la reivindicación 1, en la que el primer disolvente comprende de un 10 % a un 90 % (v/v) de PEG, preferentemente de un 30 % a un 90 % (v/v) de PEG, más preferentemente de un 40 % a un 80 % (v/v) de PEG.
7. La composición de la reivindicación 1, en la que el componente de alcohol es de un 1 % a un 99 % del primer disolvente, preferentemente de un 5 % a un 60 % del primer disolvente, más preferentemente de un 10 % a un 40 % del primer disolvente.
8. La composición de la reivindicación 1, en la que el agente farmacéutico de azol es un imidazol, un triazol o un tiazol, preferentemente miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, omoconazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, fluconazol, itraconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, terconazol o abafungina, siendo particularmente preferente el itraconazol o el posaconazol.
9. La composición de la reivindicación 1, comprendiendo dicha composición entre 3 mg/ml y 25 mg/ml del agente farmacéutico de azol.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el primer disolvente se diluye con líquido para infusión seleccionado de entre el grupo que consiste en solución salina normal, dextrosa en agua y un líquido para infusión en emulsión basado en lípidos, en donde dicho líquido para infusión es de modo particular preferentemente dextrosa en agua.
11. La composición de la reivindicación 10, comprendiendo dicha composición entre 1 mg/ml y 5 mg/ml del agente de azol después de la dilución en dicho líquido para infusión.
12. La composición de la reivindicación 10, siendo estable dicha composición durante al menos 12 horas a temperatura ambiente.
13. La composición de la reivindicación 1, definida adicionalmente por comprender menos de un 3 % de agua, preferentemente menos de un 1 % de agua, más preferentemente por estar esencialmente libre de agua.
14. Un método para preparar la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende mezclar a) un componente de alcohol seleccionado entre alcohol bencílico y/o etanol acidificado, con b) polietilenglicol (PEG), para formar un primer disolvente y disolver el agente de azol en dicho primer disolvente, comprendiendo preferentemente de modo adicional diluir el primer disolvente con un líquido para infusión seleccionado de entre el grupo que consiste en solución salina normal, dextrosa en agua y un líquido para infusión en emulsión basado en lípidos.
15. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, o una composición preparada de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de una enfermedad causada por hongos, levaduras o mohos en un paciente, en donde el paciente es preferentemente un ser humano, en donde la enfermedad es preferentemente una infección por *Candida*, *Aspergillus* o *Mucorales*, y en donde la composición es preferentemente adecuada para administración por vía intravascular, intratecal, subcutánea, intramuscular o tópica.

Figura 1A. Estudio de estabilidad de 4 mg/ml de ITZA a temp. ambiente

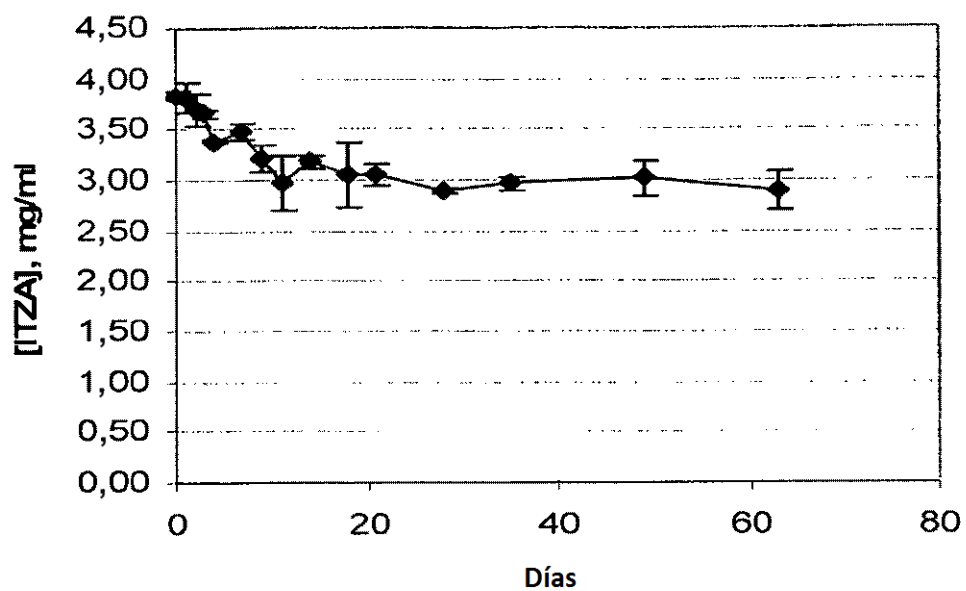


Figura 1B. Estudio de estabilidad de 4 mg/ml de ITZA a 40 °C.

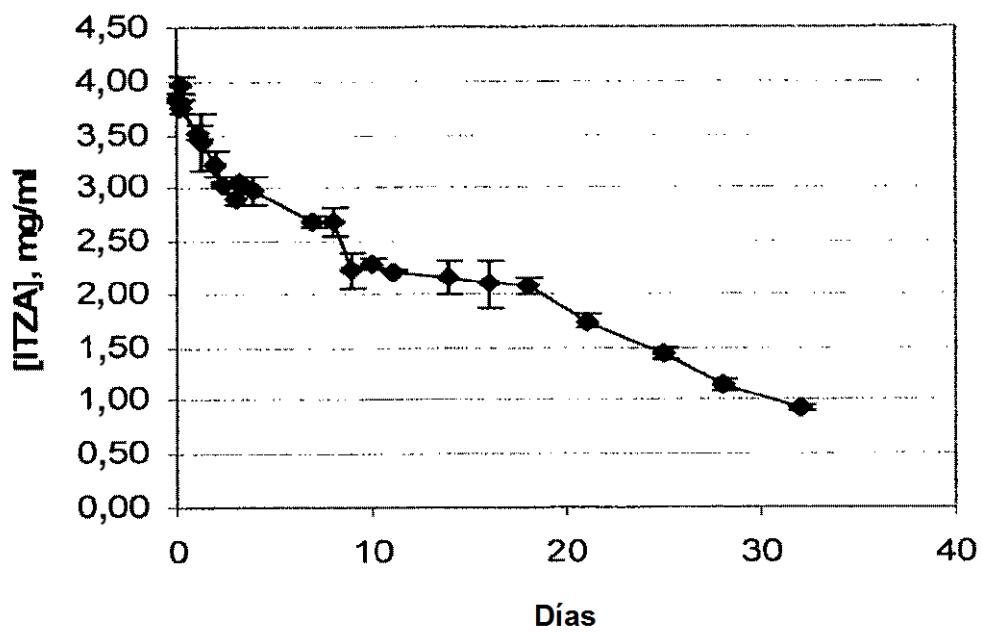
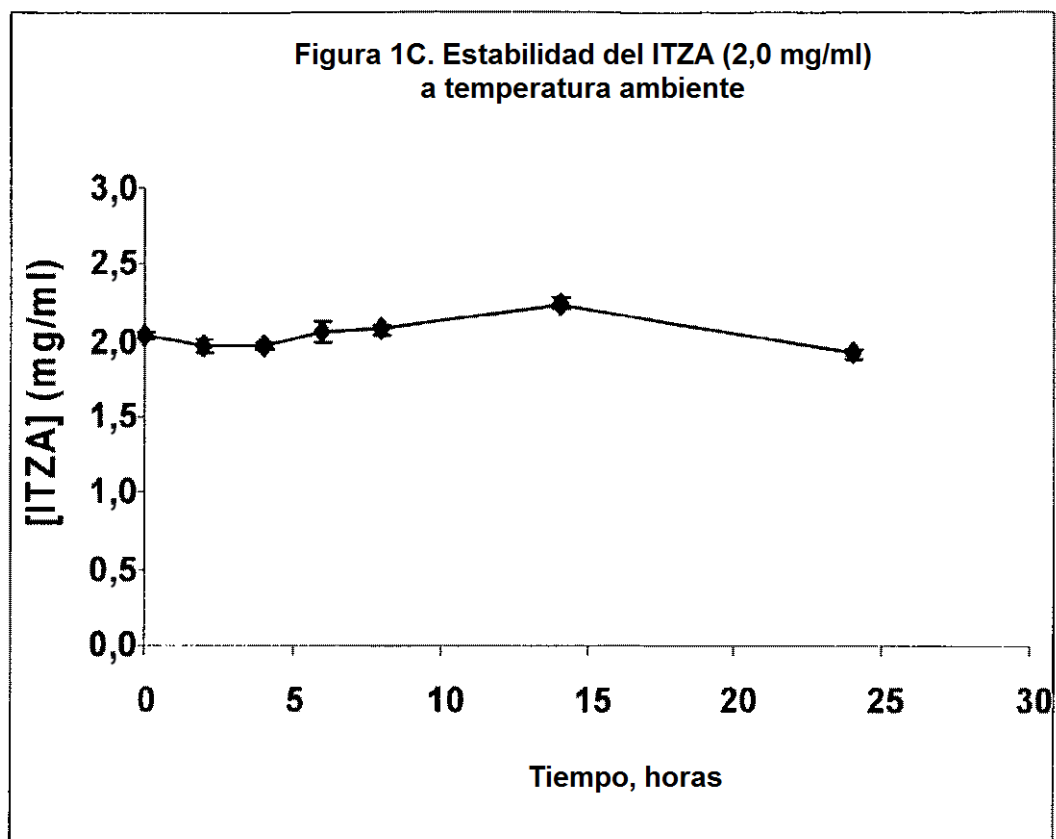


Figura 1C



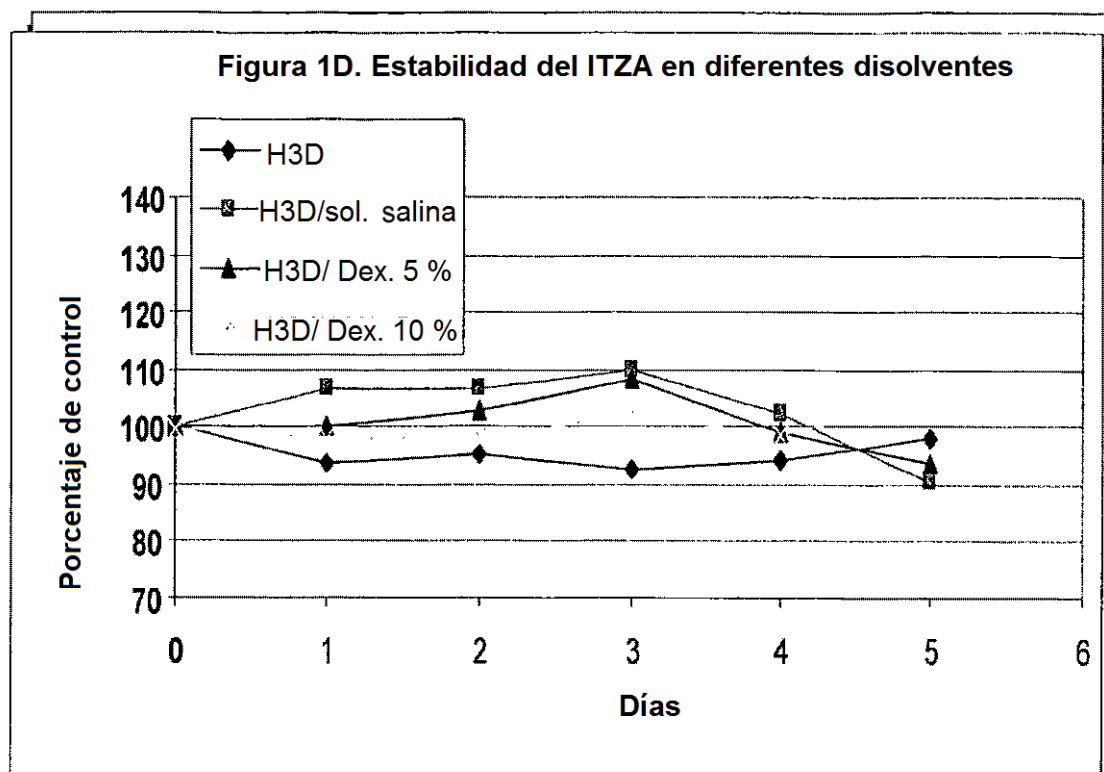
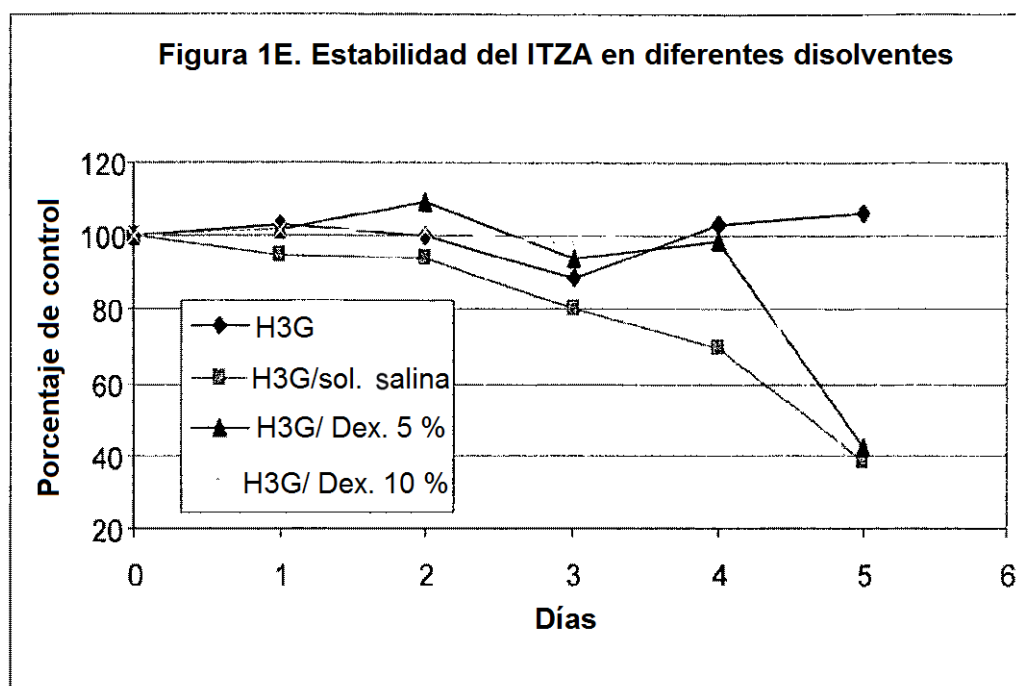
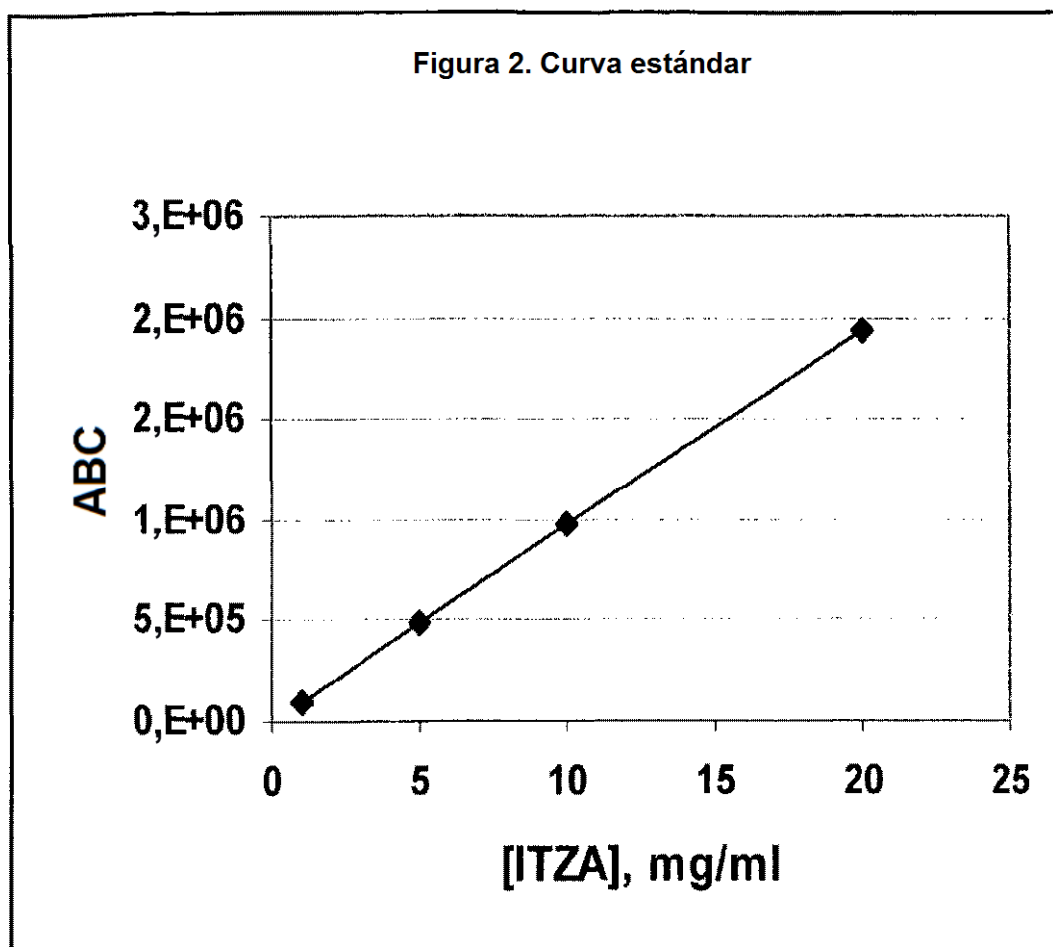


Figura 1E





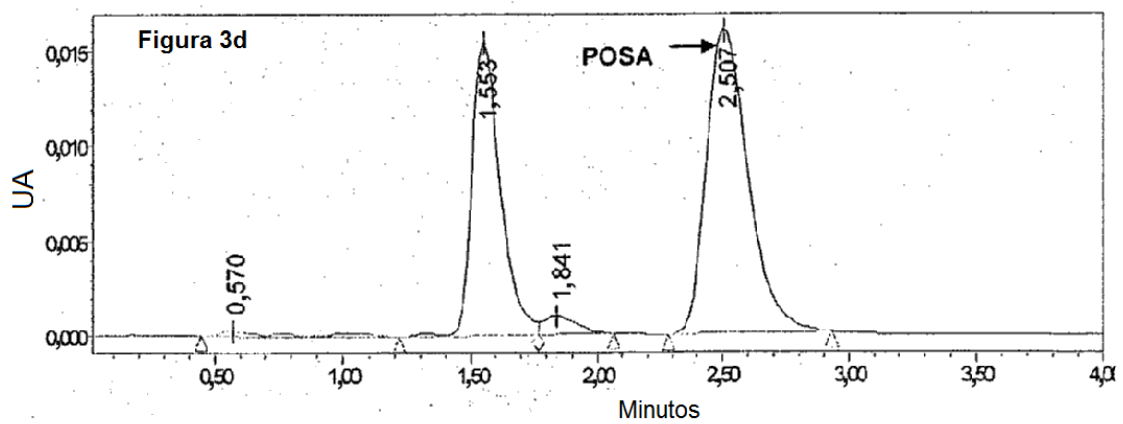
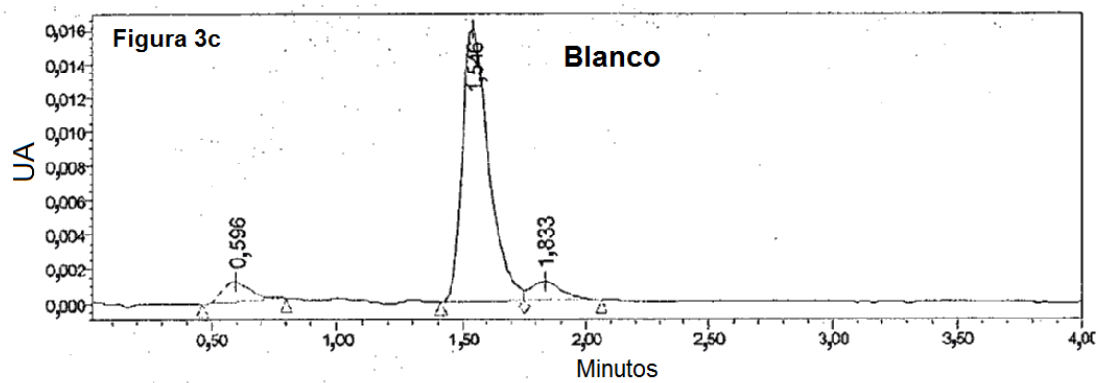
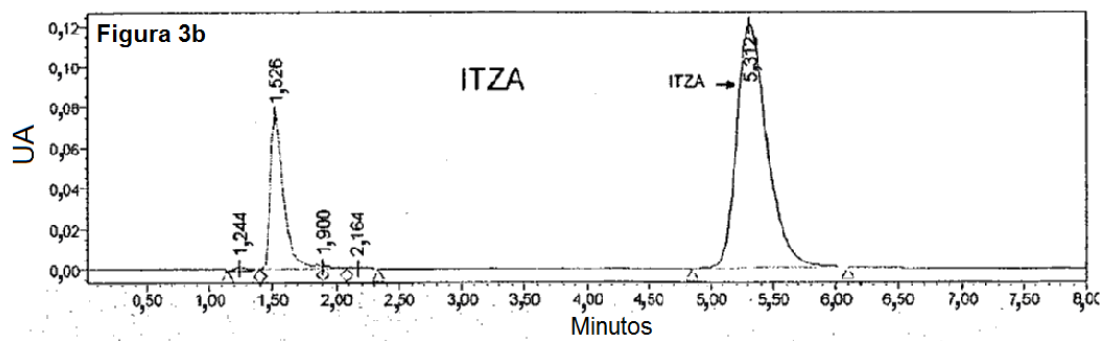
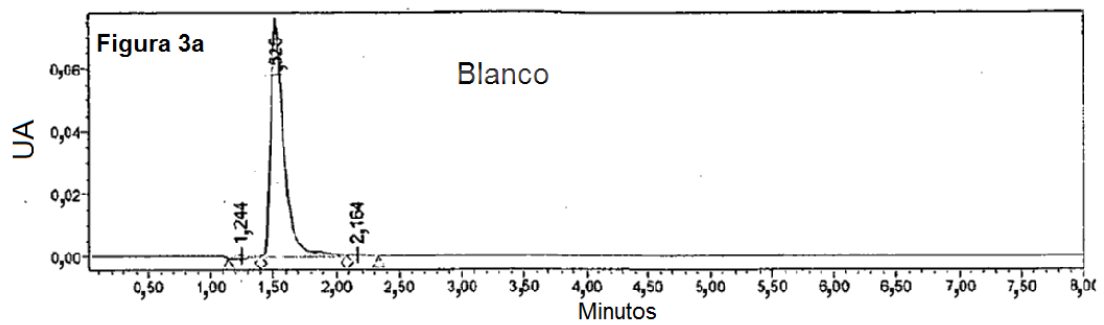


Figura 4A y B

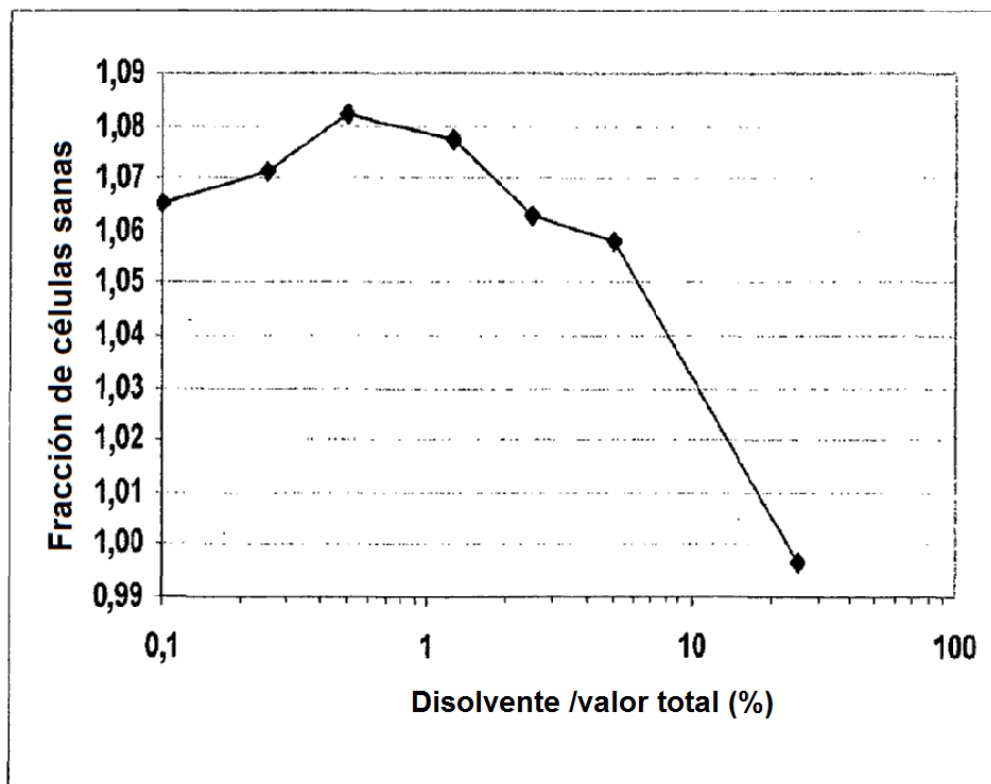
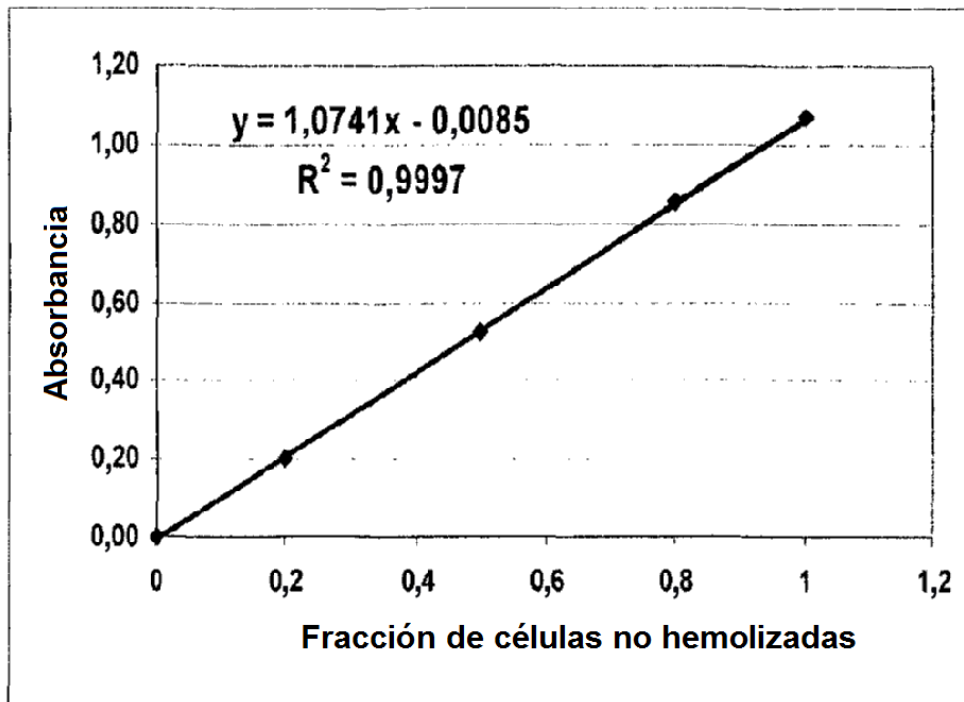
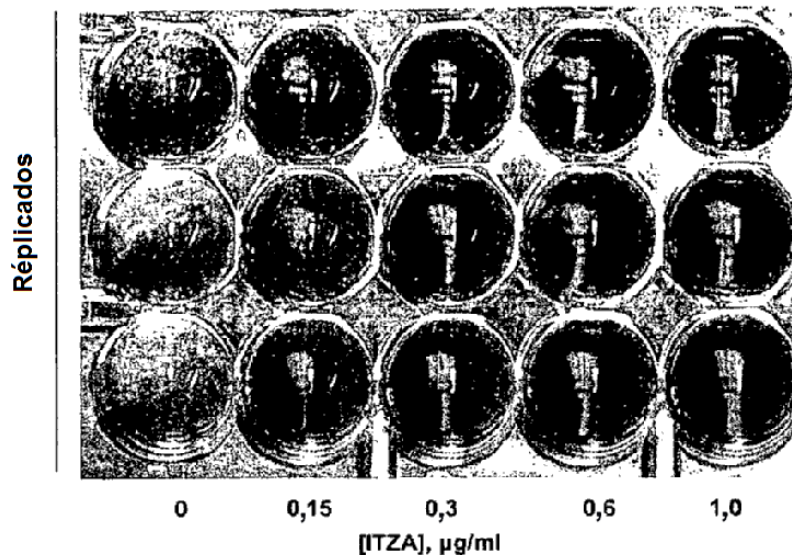


Figura 5. Efectos del ITZA sobre el crecimiento de *A. fumigatus* tras 72 h de incubación



Levaduras

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

<i>Candida cruzi</i> (Cepa ATCC 6258)		<i>Candida parapsilosis</i>	
Fármaco	CIM	Fármaco	CIM
ITZA	0,07	ITZA	0,03
MBZSA	todas crecidas	MBZSA	todas crecidas
FZSA	todas crecidas	FZSA	1,2
KZSA	0,15	KZSA	0,03
ITZA*	0,15	ITZA*	0,07

ITZA * es un lote de control de ITZA disuelto en DMSO como control positivo

Los controles de crecimiento (controles negativos, crecimiento de hongos en medio solamente) mostraban un crecimiento excelente
El crecimiento de *Candida* en medio con vehículo disolvente sin fármaco también mostraba un crecimiento excelente

Mohos

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

<i>Aspergillus fumigatus</i> (CEPA ATCC 90906)		<i>Aspergillus fumigatus</i> (Clinical Lab isolate)	
Fármaco	CIM	Fármaco	CIM
ITZA	1,2	ITZA	0,6
MBZSA	todas crecidas	MBZSA	5
FZSA	todas crecidas	FZSA	todas crecidas
KZSA	20	KZSA	20
ITZA*	0,6	ITZA*	0,3

ITZA * es un lote de control de ITZA disuelto en DMSO como control positivo

Figura 6

Cromatogramas de plasma que contiene ITZA (6 B, C) y POSA (6 E, F), respectivamente

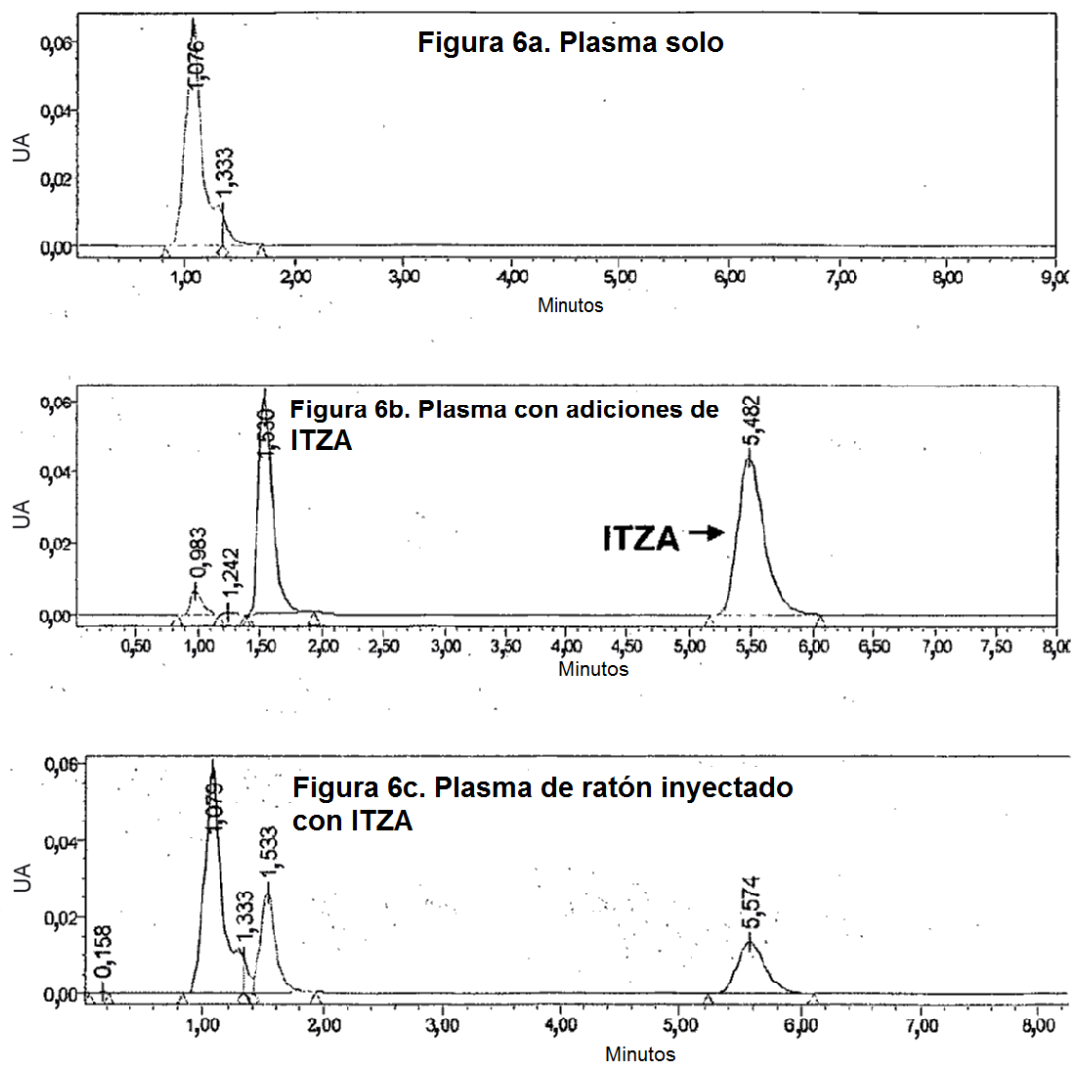


Figura 6D Plasma solo

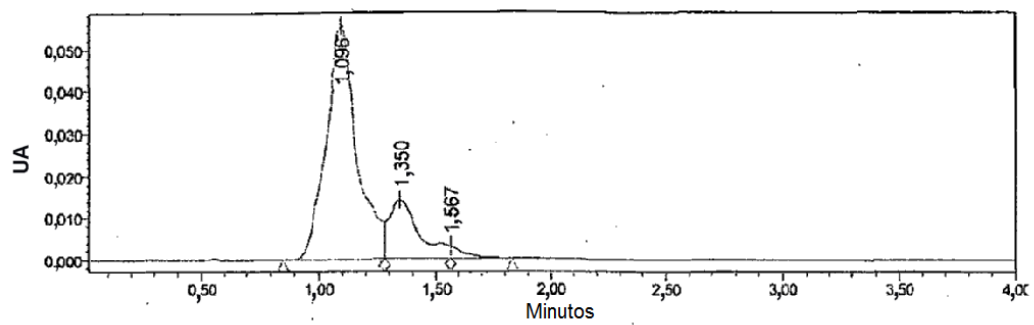


Figura 6E Plasma con adiciones de POSA (adición de POSA a los 2,502 min)

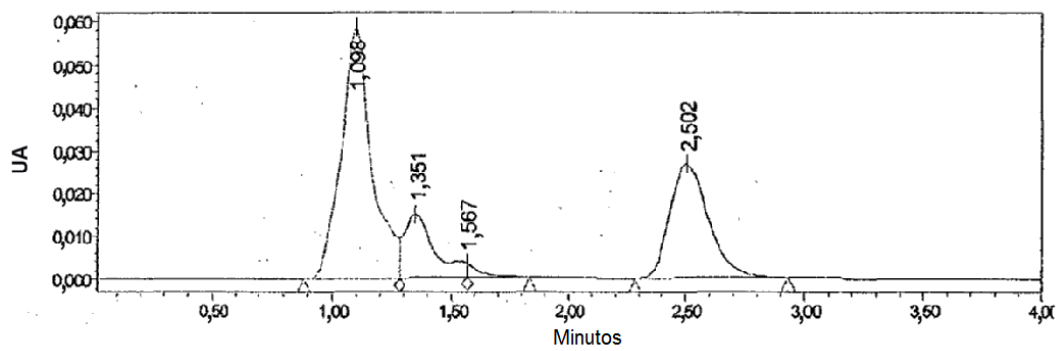


Figura 6F Plasma de ratón inyectado con POSA a 5 mg/kg (POSA a los 2,457 min)

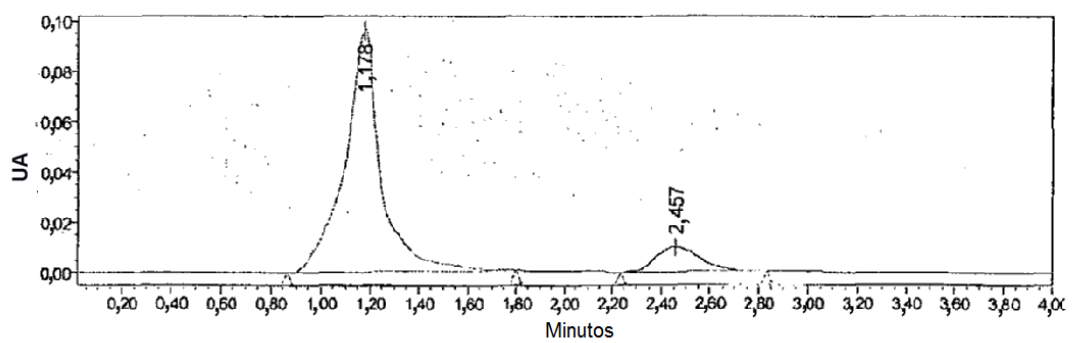


Figura 7A ITZA en disolvente H3G, eliminación tras inyecciones en ratones a 5 mg/kg

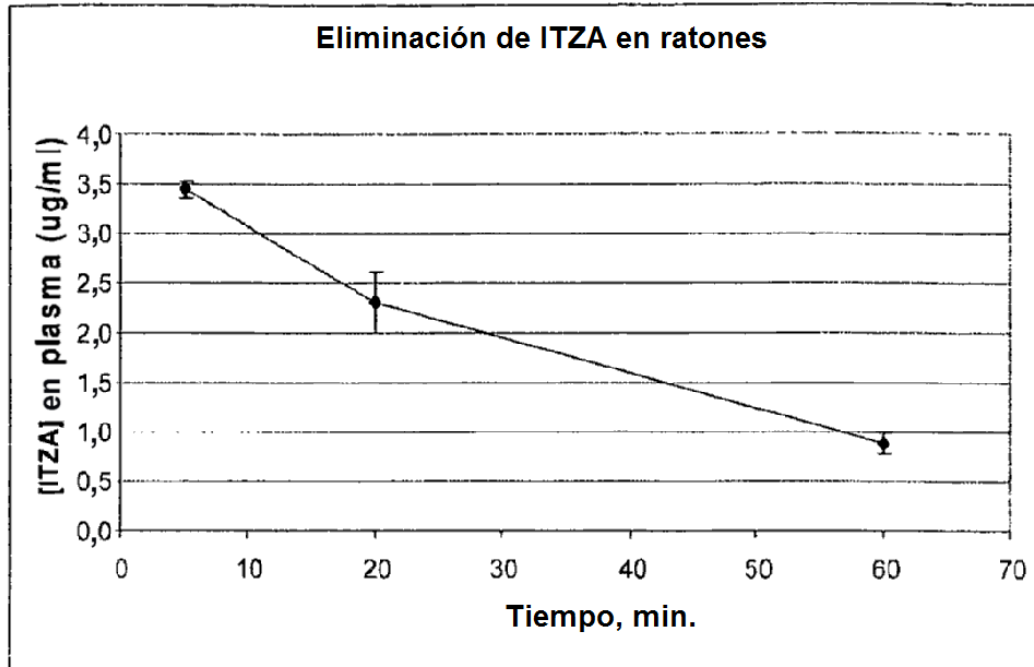


Figura 7B. Eliminación de POSA en ratones tras inyección de 5 mg/kg i.v.

