(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 743 740**

(51) Int. CI.:

A61K 47/69 (2007.01)
A61K 47/40 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2017 PCT/EP2017/057472**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.10.2017 WO17167837**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2017 E 17715654 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3347055**

(54) Título: **Aducto de ciclodextrina-panobinostat**

(30) Prioridad:

31.03.2016 GB 201605406
15.06.2016 GB 201610440

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2020

(73) Titular/es:

MIDATECH LTD. (100.0%)
65 Innovation Drive, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire OX14 4RQ, GB

(72) Inventor/es:

COULTER, TOM;
DAMMENT, STEPHEN;
PACE, ALESSANDRO y
PALMER, DANIEL

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Aducto de ciclodextrina-panobinostat

Campo de la invención

La presente invención corresponde a formulaciones farmacéuticas de un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC, por sus siglas en inglés) y a métodos para la producción de tales formulaciones.

Antecedentes de la invención

La presente invención se dirige a composiciones y formulaciones farmacéuticas y a métodos de fabricación de dichas composiciones y productos, para su uso en el tratamiento de tumores cerebrales, incluyendo glioma tales como el glioma pontino intrínseco difuso (GPID).

Los inhibidores de histona desacetilasa (HDAC) muestran un potencial significativo para el tratamiento de diversos cánceres. El panobinostat (Farydak®, LBH-589, 2-(E)-*N*-hidroxi-3-[4 [[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)etil]amino] metil]fenil]-2-propenamida) es un inhibidor de HDAC no selectivo que se usa en el tratamiento de mieloma múltiple. Se ha propuesto una terapia combinada con panobinostat y con radiación para el tratamiento de tumores sólidos (documento WO2007/050655). Sin embargo, los compuestos de hidroxamato, incluyendo el panobinostat, exhiben una escasa solubilidad acuosa y estabilidad (documento WO2009/039226). Se han propuesto formulaciones de panobinostat que emplean al menos un alcohol para reducir la oxidación y la hidrólisis (documento WO2008/086330).

Wehrmann *et al.*, *PLOS ONE*, 2012, Vol. 7, Artículo 10, e48561, describen una disminución de los niveles de colesterol intracelular en fibroblastos de Niemann-Pick tipo C por medio de vorinostat, panobinostat, beta-ciclodextrina y combinaciones de los mismos.

Grasso *et al.*, *Nature Medicine*, 2015, Vol. 21, N.º 6, pp. 555-559, informan que el inhibidor múltiple de histona desacetilasa, panobinostat, demostró ser terapéuticamente eficaz tanto *in vitro* como en modelos de xenoinjerto ortotópicos de GPID. Sin embargo, el panobinostat se formuló en dimetil sulfóxido (DMSO) para la administración mejorada por convección (CED, por sus siglas en inglés) en los ratones portadores de xenoinjertos tumorales. El DMSO es un agente oxidante suave y tiene una serie de deficiencias para su uso clínico en seres humanos.

El documento WO2015/191931 describe composiciones farmacéuticas que contienen un fármaco hidrofóbo (que puede ser un inhibidor de HDAC), un profármaco del mismo, una sal del mismo, una isoforma del mismo o una combinación de los mismos; ciclodextrina, un profármaco de la misma, una sal de la misma o una combinación de las mismas; polietilenglicol, propilenglicol o una combinación de los mismos; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como usos médicos de los mismos, incluyendo el tratamiento de una enfermedad cerebral.

El documento WO2008/090585 describe formas solubles de complejos de inclusión de inhibidores de histona desacetilasa y ciclodextrinas, sus procesos de preparación y los usos en el campo farmacéutico.

El documento WO2008/002862 describe composiciones farmacéuticas que contienen inhibidores de histona desacetilasa y vitaminas B y usos médicos de las mismas, incluyendo el tratamiento de trastornos proliferativos.

Hockly *et al.*, PNAS, 2003, Vol. 100(4), pág. 2041-2046, describe el tratamiento de un modelo de ratón de la enfermedad de Huntington usando el inhibidor de HDAC ácido suberoilanidido hidroxámico (SAHA, por sus siglas en inglés), administrado por vía oral.

El documento US2013177499 propone el uso de minicélulas derivadas de bacterias como vehículos de administración para agentes activos contra tumores cerebrales.

El documento WO2013/135727 describe un método para el tratamiento del glioma por administración mejorada por convección (CED) usando una composición de carboplatino en líquido cefalorraquídeo artificial (LCR).

Existe una necesidad que no se ha cubierto de formulaciones farmacéuticas que sean estables y favorables a una administración centralizada (por ejemplo, a través de CED) para el tratamiento de tumores cerebrales, incluyendo glioma. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

Breve descripción de la invención

En términos generales, la presente invención se refiere a composiciones y formulaciones del inhibidor de HDAC, panobinostat, que son adecuadas para su administración al cerebro a través de administración mejorada por convección (CED). Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que un método “por formación de puentes de pH” proporciona una vía conveniente para producir un complejo estable y soluble en agua o un aducto de 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina y panobinostat. Se ha descubierto a su vez, que el aducto de 2-hidroxipropil-β-

ciclodextrina-panobinostat es soluble en líquido cefalorraquídeo artificial (LCR). Como se describe en los ejemplos del presente documento, el aducto de ciclodextrina-panobinostat exhibe una excelente actividad inhibidora de HDAC, erradicación de actividad en células tumorales *in vitro* y, en términos de estudios clínicos preliminares en humanos, exhibe una potencial actividad terapéutica *in vivo* contra glioma pontino intrínseco difuso (GPID). Una ventaja particular del método de producción y del aducto de ciclodextrina-panobinostat de la presente invención es que evitan usar agentes indeseables tales como dimetil sulfóxido (DMSO). El DMSO, especialmente a altas concentraciones, no es recomendable en productos farmacéuticos para uso humano y es un agente oxidante moderado que podría afectar negativamente la estabilidad del panobinostat.

Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención proporciona un método para producir un aducto de ciclodextrina-panobinostat, que comprende:

a) proporcionar una primera solución acuosa que comprende un agente tampón; teniendo la solución un pH en el intervalo de 2,0 a 4,0;
b) disolver el panobinostat en dicha primera solución acuosa para generar una segunda solución acuosa; y
c) mezclar dicha segunda solución acuosa que comprende panobinostat con una tercera solución acuosa que comprende una ciclodextrina para formar una cuarta solución que comprende un aducto de ciclodextrina-panobinostat.

La ciclodextrina puede ser cualquier ciclodextrina adecuada para uso farmacéutico, por ejemplo, una ciclodextrina alfa, beta o gamma. En casos particulares, la ciclodextrina es una beta-ciclodextrina. Preferentemente, la ciclodextrina es 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

El agente tampón puede comprender cualquier ácido farmacéuticamente aceptable (y su base conjugada). Preferentemente, el agente tampón comprende ácido cítrico y citrato, por ejemplo, ácido cítrico y citrato de sodio. La concentración del agente tampón puede estar en el intervalo de 0,01 M a 1 M, por ejemplo, 0,1 M.

El pH de la primera solución acuosa está en el intervalo de 2,0 a 4,0, por ejemplo 2,5 a 3,5. Preferentemente, el pH de la primera solución acuosa es de aproximadamente 3,0. A este pH, la base libre de panobinostat presenta una buena solubilidad acuosa. De hecho, la concentración de panobinostat en la segunda solución acuosa está en el intervalo de 1 mM a 20 mM. Por ejemplo, la base libre de panobinostat es soluble a una concentración 10 mM en tampón de citrato a pH 3,0. La etapa de disolución de panobinostat en la primera solución acuosa puede implicar la agitación o mezcla durante un período de entre 1 y 20 minutos, por ejemplo, durante 10 minutos.

En algunos casos, la concentración de la ciclodextrina (por ejemplo, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina) en dicha tercera solución acuosa puede estar en el intervalo de 10 mg/ml a 200 mg/ml. Por ejemplo, la tercera solución puede ser de 100 mg/ml de 2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina en agua.

En algunos casos, el método del primer aspecto de la invención comprende además:
d) añadir una cantidad suficiente de base a dicha cuarta solución acuosa que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat para proporcionar una quinta solución acuosa con un pH en el intervalo de 6,0 a 8,0.

En algunos casos, el método del primer aspecto de la invención comprende además el secado de dicha quinta solución acuosa para formar un sólido que comprende dicho aducto de ciclodextrina-panobinostat. De esta forma, el sólido seco (por ejemplo, una torta liofilizada) tiene un pH cercano a la neutralidad para preparar la reconstitución a un pH neutro o cercano a neutro.

En algunos casos, el método del primer aspecto de la invención comprende además secar dicha cuarta solución acuosa mencionada para formar un sólido que comprende dicho aducto de ciclodextrina-panobinostat. De esta manera, el sólido seco (por ejemplo, una masa liofilizada) tiene un pH relativamente ácido, que puede o no ajustarse, por ejemplo, hacia un pH neutro o cercano al neutro (aproximadamente 7) antes, durante o después de cualquier reconstitución, rehidratación o etapa de disolución.

En cualquier caso (es decir, secando la quinta o la cuarta solución acuosa), dicho secado puede comprender liofilización (liofilización) a presión reducida para formar un sólido liofilizado que comprende dicho aducto de ciclodextrina-panobinostat. Las condiciones de liofilización adecuadas incluyen: enfriamiento a -52 °C al vacío (0,053 mbar) durante aproximadamente 2 horas. Sin embargo, se apreciará que se conoce una gran diversidad de técnicas y condiciones para la criodesecación/liofilización, las cuales se podrían utilizar fácilmente en la etapa o etapas de secado contempladas en el presente documento. En términos generales, la liofilización comprende una etapa de congelación, en la que la solución se enfría hasta que todos los componentes de la solución se congelan. Esto puede comprender reducir la temperatura por debajo de -40 °C, tal como por debajo de -50 °C. Después de la congelación hay una etapa de secado primario. Durante la etapa de secado primario, se retira el hielo formado durante la congelación por medio de sublimación. La etapa de secado primario se puede llevar a cabo a una presión reducida, tal como <10 mbar (1 kPa) o <0,1 mbar (10 Pa). La etapa de secado primario puede llevarse a cabo a una temperatura mayor a la temperatura usada para la etapa de congelación. La etapa de secado primario puede seguirse por una etapa de secado secundario. La temperatura de la etapa de secado secundario puede ser más alta que la temperatura

de la etapa de secado primario. En algunos casos la liofilización puede durar más de 1 hora, por ejemplo, 2 o 3 horas o incluso más.

En algunos casos la solución se seca hasta obtener un sólido liofilizado, por ejemplo, una torta, polvo o masa granular con un contenido de agua menor del 10 % p/p, opcionalmente, menor del 5 % p/p. El sólido liofilizado puede ser un sólido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una torta farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos, el método de este aspecto de la invención comprende además reconstituir del sólido seco, por ejemplo, un sólido liofilizado, que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat disolviendo en una solución de reconstitución. La solución de reconstitución es preferentemente una solución farmacéuticamente aceptable en la que el aducto de ciclodextrina-panobinostat es soluble. En particular, la solución de reconstitución puede seleccionarse del grupo que consiste en: líquido cefalorraquídeo artificial (LCR), solución de Ringer, agua esterilizada para inyección (WFI, por sus siglas en inglés) y una solución salina tamponada. En ciertos casos, por ejemplo, cuando se pretende una administración al sistema nervioso central (SNC), la solución de reconstitución puede comprender LCR.

En algunos casos, puede haber un retraso considerable entre la etapa de liofilización y la etapa de reconstitución posterior. El sólido liofilizado compuesto por el aducto de ciclodextrina-panobinostat puede exhibir una buena estabilidad, lo que derivaría en un periodo de caducidad prolongado. La estabilidad y/o el tamaño compacto relativo del sólido liofilizado en comparación con la solución acuosa correspondiente hacen que el sólido liofilizado sea atractivo para su almacenamiento y/o envío. La etapa de reconstitución puede llevarse a cabo inmediatamente antes de administrarse a un paciente. En algunos casos, la reconstitución puede llevarse a cabo 24, 48 o 72 horas antes de administrarse a un paciente. Al llevar a cabo la reconstitución poco tiempo antes de la administración, existe una menor posibilidad de que una o más sales que conforman la solución artificial de LCR se cristalicen como resultado de la nucleación efectuada por ciclodextrina u otro evento de nucleación.

En algunos casos, el método comprende adicionalmente ajustar el pH de la solución antes, durante o después de la reconstitución. Para el caso particular en el que el aducto de ciclodextrina-panobinostat se seca por congelación sin haber primero neutralizado el pH (es decir, cuando la cuarta solución acuosa se seca), puede ser necesario ajustar el pH, por ejemplo, añadiendo una cantidad suficiente de una base para llevar el pH al intervalo de 6,0 a 8,0.

En algunos casos, el método de este aspecto de la invención comprende además mezclar la quinta solución acuosa que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat con una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) para proporcionar una sexta solución acuosa que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat en LCR artificial.

En algunos casos, la concentración de panobinostat en LCR artificial (ya sea la sexta solución acuosa o el sólido reconstituido en LCR artificial) está en el intervalo de 1 µM a 100 µM, por ejemplo, de 1 µM a 20 µM. Se cree que este intervalo de concentración corresponde a la concentración antitumoral eficaz del fármaco. La sexta solución acuosa, o el sólido liofilización que comprende el aducto ciclodextrina-panobinostat reconstituido en LCR artificial, puede ser convenientemente la solución que para su administración a un paciente a tratar, por ejemplo, a una persona u otro mamífero que tienen gliomas o que se cree que pudieran tener un glioma.

En algunos casos, el método del primer aspecto de la invención comprende además una etapa de filtración y/o esterilización al menos para una de dichas soluciones y/o para el sólido liofilización que comprende el aducto ciclodextrina-panobinostat. Normalmente, el método puede implicar una filtración esterilizante de la sexta solución acuosa o de la solución formada a partir la reconstitución del sólido liofilización que comprende el aducto ciclodextrina-panobinostat en LCR artificial, por ejemplo, en preparación para la administración terapéutica.

En algunos casos, el método comprende además introducir al menos una parte de la sexta solución acuosa o de la solución formada reconstituyendo el sólido liofilizado que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat en LCR artificial en al menos un catéter de administración mejorada por convección (CED). El catéter o catéteres de CED pueden ser microcatéteres para implantación (o pre-implantados) en la cabeza de un paciente a tratar.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una solución reconstituida que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat producido o producible por un método del primer aspecto de la invención, en donde dicha solución tiene una concentración (v/v) de menos de 1000 partes por millón (ppm) de acetona, tetrahidrofurano, diclorometano, acetonitrilo, dimetilformamida y dimetil sulfóxido (DMSO) y en donde el pH de la solución reconstituida está en el intervalo de 6,0 a 8,0.

Se ha informado que los complejos de ciclodextrina pueden tomar la forma de nanopartículas (véase, por ejemplo, He, *et al.*, *Micron*, 2008, Vol. 39, págs. 495-516). Efectivamente, algunos estudios de microscopía electrónica y microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) indican que las ciclodextrinas, incluyendo las β-ciclodextrinas, forman agregados en solución dependientes de la concentración con un radio hidrodinámico de alrededor de 60 nm. Por consiguiente, el aducto de ciclodextrina-panobinostat de la solución del segundo aspecto de la invención puede, en algunos casos, tomar la forma de una nanopartícula o de un nanotubo. En particular, el aducto de ciclodextrina-panobinostat puede estar en forma de una nanopartícula con un diámetro en un intervalo de 10 nm a 500 nm, por ejemplo, de 10 nm a 100 nm o incluso de 50 nm a 100 nm. Las nanopartículas y/o los nanotubos pueden

autoensamblarse (por ejemplo, en solución). Las nanopartículas y/o los nanotubos pueden ser reversibles, por ejemplo, pueden formar aductos monoméricos de ciclodextrina-panobinostat en solución. En algunos casos, las nanopartículas y/o nanotubos de autoensamblaje y reversibles pueden ser dependientes de la concentración o la temperatura.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) que comprende un aducto de ciclodextrina-panobinostat, en donde dicha solución tiene una concentración (v/v) de menos de 1000 partes por millón (ppm) de acetona, tetrahidrofurano, diclorometano, acetonitrilo, dimetilformamida y dimetil sulfóxido (DMSO). El aducto de ciclodextrina-panobinostat puede ser del segundo aspecto de la invención. La solución artificial de LCR puede ser producida o es producible por el método del primer aspecto de la invención. En algunos casos, el aducto de ciclodextrina-panobinostat es 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina-panobinostat.

El aducto de ciclodextrina-panobinostat de la solución del segundo aspecto de la invención y del líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) del tercer aspecto de la invención que comprende un aducto de ciclodextrina-panobinostat están sustancialmente libres de dimetilsulfóxido (DMSO). En particular, la solución tiene una concentración de DMSO (v/v) menor a 1000 partes por millón (ppm), por ejemplo, una concentración menor a 100 ppm, menor a 10 ppm o incluso menor a 1 ppm.

En particular, el aducto de ciclodextrina-panobinostat de la solución del segundo aspecto de la invención y/o la solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) del tercer aspecto de la invención están sustancialmente libres de los disolventes orgánicos acetona, tetrahidrofurano, diclorometano, acetonitrilo, dimetilformamida y DMSO. La solución tiene una concentración de los dichos disolventes orgánicos (v/v) menor a 1000 partes por millón (ppm), por ejemplo, una concentración menor a 100, menor a 10 o incluso menor a 1 ppm.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un catéter de administración mejorada por convección (CED) que contiene la solución artificial de LCR del tercer aspecto de la invención.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) del tercer aspecto de la invención o una solución reconstituida de aducto de ciclodextrina-panobinostat del segundo aspecto de la invención para uso en medicina.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona una solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) del tercer aspecto de la invención o una solución reconstituida de aducto de ciclodextrina-panobinostat del segundo aspecto de la invención para su uso en un método de tratamiento de un tumor cerebral en un sujeto mamífero.

En algunos casos, el tumor cerebral puede comprender un glioma, tales como un glioma del tronco encefálico, un astrocitoma (por ejemplo, un glioblastoma multiforme), un oligodendroglioma, un oligoastrocitoma o un glioma pontino intrínseco difuso (GPID).

En algunos casos, el método de tratamiento comprende la administración de la solución de LCR en el cerebro de dicho sujeto mamífero por medio del método de administración mejorada por convección (CED).

De acuerdo con la presente invención, el sujeto puede ser un humano, un animal de compañía (por ejemplo, un perro o un gato), un animal de laboratorio (por ejemplo, un ratón, una rata, un conejo, un cerdo o un primate), un animal doméstico o un animal de granja (por ejemplo un cerdo, una vaca, un caballo o una oveja). Preferentemente, el sujeto es un humano. En algunos casos, particularmente si el tumor es un GPID, el sujeto puede ser un niño, por ejemplo, un niño menor de 10 años de edad (por ejemplo, un niño de 1 a 5 años de edad).

Estos aspectos y realizaciones y adicionales de la invención se describen con más detalle a continuación y con referencia a los ejemplos y figuras adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** muestra la viabilidad celular (%) evaluada por medio la prueba MTT, graficada contra la concentración del fármaco (μM) para: **A)** HP-β-CD-panobinostat (cuadrados), ciclodextrina (triángulos) y solución de LCR artificial (círculos), contra células U87MG, después de 72 horas del tratamiento; **B**) HP-β-CD-panobinostat (cuadrados), ciclodextrina (triángulos) y solución de LCR artificial (círculos), contra células U87MG, después de 48 horas del tratamiento; **C**) HP-β-CD-panobinostat (cuadrados), ciclodextrina (triángulos) y solución de LCR artificial (círculos), contra células HEPG2, después de 72 horas del tratamiento; y **D**) HP-β-CD-panobinostat contra células U87MG (círculos), células HEPG2 (diamantes) y células h19 (triángulos), después del 72 horas del tratamiento. Las líneas de error indican los valores +/- de la desviación estándar de las muestras por triplicado. N = 1 repetición experimental.

La Figura 2 muestra: **A**) la viabilidad celular (%) de las células SF8628 de GPID, graficada contra la concentración (μM) de HP-β-CD-panobinostat, después de 72 horas del tratamiento; **B**) la viabilidad celular (% de células vivas), graficada contra la dosis en log10 de la concentración de HP-β-CD-panobinostat, después de 72 horas del

tratamiento (círculos), después de 6 horas de tratamiento (cuadrados) y después de 30 minutos del tratamiento (diamantes). Las líneas de error indican los valores +/- de la desviación estándar de las muestras por triplicado.

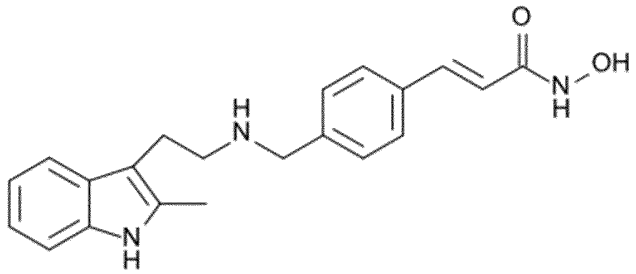
La Figura 3 muestra la concentración de panobinostat (μM) a lo largo del tiempo para una prueba de almacenamiento de 24 semanas a 15 °C–25 °C. La concentración de panobinostat medida a partir del aducto de HP-β-CD-panobinostat almacenado fue notablemente estable incluso fuera del periodo de 24 semanas del estudio.

La figura 4 muestra las impurezas totales (diamantes) como un porcentaje, graficado contra el tiempo, para una prueba de 24 semanas de almacenamiento a 15 °C–25 °C. El tiempo de retención relativo TRT 0.86 (cuadrados) y el TRT 1.12 (triángulos) hacen referencia a los picos del cromatograma a cada lado del pico principal del fármaco panobinostat. La gráfica muestra que los picos de TRT y de impurezas totales (%) se mantuvieron estables y en índices bajos a lo largo del periodo del estudio, lo que implica que la formación de productos de degradación de panobinostat es insignificante.

Descripción detallada de la invención

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, definidos como se indica a continuación.

"Panobinostat" (Farydak®, LBH-589, 2-(E)-*N*-hidroxi-3-[4[[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)etil]amino]metil]fenil]-2-propenamida) es un inhibidor no selectivo de HDAC con la estructura química que se muestra a continuación:



Como se usa en el presente documento, y a menos que el contexto especifique lo contrario (como cuando se describe como "panobinostat base libre"), el término "panobinostat" incluye las sales (por ejemplo, citrato de panobinostat, lactato de panobinostat y similares). Los métodos para la producción de derivados de hidroxamato en calidad de inhibidores de la desacetilasa, incluyendo el panobinostat, se detallan en el documento WO2002/022577.

La "ciclodextrina" es un oligosacárido cíclico e incluye específicamente a las α-ciclodextrinas, las β-ciclodextrinas y γ-ciclodextrinas. La ciclodextrina es normalmente una ciclodextrina farmacéuticamente aceptable. En algunos casos particulares, la ciclodextrina es 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

"Administración mejorada por convección (CED)" es un método para suministrar un medicamento directamente al cerebro a través de uno o más catéteres muy pequeños que se colocan quirúrgicamente en o alrededor del tumor cerebral. La colocación de los catéteres se puede dirigir de forma estereoselectiva, por ejemplo, para minimizar los efectos distintos a los deseados. El documento WO2013/135727 describe un método para el tratamiento del glioma a través del método de administración mejorada por convección (CED), utilizando una composición de carboplatino en líquido cefalorraquídeo artificial (LCR). El método CED normalmente emplea filtros de esterilización integrados. Algunos filtros de esterilización no son compatibles con DMSO (por ejemplo, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, policarbonato; poliéter sulfona; Sartobran P; algunos PVDF; PVC; Metricet; nylon; y PES). Por lo tanto, es aconsejable que la formulación de panobinostat con LCR artificial para suministro por CED debe estar sustancialmente libre de ciertos disolventes orgánicos como el DMSO. Por lo tanto, la utilización de ciclodextrina-panobinostat de la presente invención en una formulación para suministro por CED presenta ventajas en el contexto de los filtros de esterilización integrados de uso común.

“Líquido cefalorraquídeo artificial (LCR)”

Se pretende que el líquido cefalorraquídeo artificial (LCR) iguale las concentraciones de electrolitos del LCR. Preferentemente, el LCR artificial se prepara a partir de agua de alta pureza y de reactivos de calidad analítica, o se puede obtener de proveedores médicos y comerciales (por ejemplo, de South Devon Healthcare NHS Foundation Trust, Reino Unido o de Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido). Las concentraciones finales de iones en LCR artificial pueden ser como sigue (en mM):

Na 150;
K 3,0;
Ca 1,4;
Mg 0,8;

P 1,0;
Cl 155.

Opcionalmente, cada constituyente iónico puede tener una concentración de más/menos (±) 10 %, ± 5 %, ± 2 %, ± 1 % o ± 0,5 %, a partir de los valores de concentración mencionados anteriormente. Además, de manera opcional, el LCR artificial puede comprender además glucosa y/o una o más proteínas a concentraciones normalmente presentes en LCR humano. En los casos preferidos, el LCR artificial no comprende glucosa o proteínas.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Procedimiento para la producción del aducto de panobinostat-2-hidroxipropil-β-ciclodextrina

La base libre de panobinostat es escasamente soluble en agua. De forma similar, también es insoluble en soluciones acuosas concentradas de 2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina (HP-β-CD) (450 mg/ml). Sin embargo, el panobinostat es soluble en una solución tampón de citrato a pH 3,0.

Solución A: Ácido cítrico 0,1 M en agua

El ácido cítrico (Sigma Aldrich C-0759; n.º de Lote 21K0042) (2,101 g) se pesó y se disolvió en 100 ml de agua ultrapura.

Solución B: Citrato de sodio 0,1 M en agua

El citrato de sodio (tribásico) (Sigma Aldrich C3434; N.º de Lote 1304640/41807230 (2,944 g) se pesó y se disolvió en 100 ml de agua ultrapura.

Solución C: Tampón de citrato 0,1 M

La solución A (82 ml) y la solución B (18 ml) se añadieron a un matraz Duran de 250 ml y se mezclaron brevemente para formar [C]. Se midió el pH del tampón de citrato y resultó ser de pH 3,0.

Solución D: Solución de panobinostat 10 mM en tampón de citrato (25 ml)

Concentración = 10 mM = 0,01 M
Volumen = 25 ml = 0,025 l
Por lo tanto, el número de moles requeridos = $2{,}5 \times 10^{-4}$
El peso molecular de Panobinostat = 349,43 g/mol
Por lo tanto, la masa de Panobinostat requerida = 82,36 mg

Por consiguiente, la base libre de panobinostat (81,0 mg) se pesó y se disolvió en la solución C (24,59 ml).

La mezcla se agitó en un agitador orbital durante 10 minutos para dar una solución transparente incolora [D].

Solución E: 2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina 100 mg/ml en agua (20 ml)

La 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina tiene un peso molecular de 1460 g/mol. La solución se preparó bajo las siguientes condiciones por simplicidad. Concentración = 100 mg/ml.

La 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (Sigma Aldrich H107; N.º de lote 048K0672) (2,004 g) se pesó y se disolvió en 20,04 ml de agua ultrapura. La mezcla se agitó en un agitador orbital durante 10 minutos para producir una solución transparente e incolora [E].

Solución F: Aducto de panobinostat - 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (5 mM)

Se mezclaron volúmenes idénticos de las soluciones D (2 ml) y E (2 ml) en un tubo Falcon. La solución transparente e incolora se sometió brevemente a agitación vorticial para homogeneizarla.

Solución G: Aducto de panobinostat - 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (3,125mM)

Para producir una solución neutra (~pH 7) para inyección, se mezcló una muestra de la solución [F] (1 ml) con NaOH (Ac) (0,6 ml, 0,2 M) para producir una solución transparente e incolora (1,6 ml en volumen).

Solución H: Solución estéril del aducto de panobinostat - 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina en LCRa (líquido cefalorraquídeo artificial) (10 µM)

Se añadió una solución LCRa Parte 1 (South Devon Healthcare; N.º de Lote 1407292) (155,5 ml) a un matraz Duran

de 250 ml. Posteriormente, se añadió una solución [G] (0,5 ml) mediante pipeta para producir una solución final de panobinostat en LCRa a una concentración 10 µM. La solución se mezcló brevemente y luego se esterilizó por filtración en una campana de flujo laminar utilizando un cartucho de filtro de esterilización SteriFlip. Posteriormente, la solución clara e incolora se almacenó a 4 °C.

Ejemplo 2 – Análisis de enzima HDAC

Se compararon las actividades inhibitorias de panobinostat disuelto en DMSO y del aducto de HP-β-CD panobinostat (preparado como se describe en el Ejemplo 1) contra los tipos de HDAC 1-11. Ambos compuestos se evaluaron a una CI_{50} de 10 dosis con una disolución seriada (factor 3), a partir de una concentración 10 µM contra HDAC 11. Los compuestos de referencia HDAC, la tricostatina A((R,2E,4E)-6-(4-(dimetillamin)benzoil)-N-hidroxi-4-metilhepta-2,4-dienamida) y TMP 269 (N-((4-(4-feniltiazol-2-il) tetrahidro-2H-piran-4-il) metil)-3-(5-(trifluorometilo)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzamida), se evaluaron a una CI50 de 10 dosis con una disolución seriada (factor 3) a partir de una concentración 10 µM.

Los sustratos fueron los siguientes:

Sustrato para las HDAC 1, 2, 3, 6, 10: Péptido fluorógeno a partir de los restos p53 379-382 (RHKK(Ac)AMC)
Sustrato para las HDAC 4, 5, 7, 9 y 11: Sustrato fluorógeno de HDAC de clase 2a (trifluoroacetil lisina)
Sustrato para la HDAC 8: Péptido fluorógeno a partir de restos p53 379-382 (RHK(Ac)K(Ac)AMC)

Los valores de CI_{50} se calcularon utilizando el programa GraphPad Prism 4 con base en una ecuación sigmoidal dosis-respuesta. El valor del blanco (DMSO) se introdujo como 1,00E-012 de concentración para el ajuste de la curva.

A continuación, se muestran los valores de CI_{50} para cada compuesto contra cada enzima HDAC.

Compuesto	HDAG1 CI50 (M)	HDAC2 CI50 (MJ	HDAC3 CI50 (M)	HDAG4 CI50 (M)
HP-β-CD Panobinostat	8,65E-09	1,59E-03	4,02E-09	5,67E-07
Panobinostat en DMSO	1,61E-09	4,97E-09	7,51E-10	1,55E-06
Tricostatina A	1,05E-08	8,33E-09	9,33E-09	ND
TMP 269	ND	ND	ND	3,76E-07

Compuesto	HDAC5 CI50 (M)	HDAC6 CI50 (M)	HDAC7 CI50 (M)	HDAC8 CI50 (M)
HP-β-CD Panobinostat	1,10E-07	7,49E-09	1,82E-06	5,57E-08
Panobinostat en DMSO	1,66E-07	1,77E-09	3,6BE-06	5,19E-08
Tricostatina A	ND	1,41E-09	ND	3,66E-07
TMP 269	3,54E-07	ND	1,53E-07	ND

Compuesto	HDAC9 CI50 (M)	HDAC10 CI50 (M)	HDAC11 CI50 (M)
HP-β-CD Panobinostat	9,27E-07	2,03E-08	1,3BE-06
Panobinostat en DMSO	1,04E-06	1,27E-03	1,67E-06
Tricostatina A	ND	3,96E-08	7,89E-06
TMP 269	4,33E-08	ND	ND
ND indica un compuesto no evaluado contra la enzima.			

Los resultados muestran que HP-β-CD panobinostat es equipotente con respecto al panobinostat en DMSO en toda la gama de enzimas HDAC 1-11.

Ejemplo 3 – Toxicidad Celular In Vitro

Se evaluó la citotoxicidad de HP-β-CD panobinostat en hepatocarcinoma y glioblastoma.

Las líneas celulares U87MG (glioblastoma) y HEPG2 (hepatocarcinoma) fueron expuestas a dosis crecientes de HP-β-CD panobinostat, únicamente a ciclodextrina, o únicamente a líquido cefalorraquídeo artificial (LCR artificial), ya

fuera durante 48 o 72 horas. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular luego utilizando el reactivo MTT. Se determinó que la CI_{50} de HP-β-CD panobinostat es de aproximadamente 0,01 μM (véanse las figuras 1A-D). La ciclodextrina sola y el LCR artificial solo resultaron ser esencialmente no tóxicos bajo las condiciones de evaluación.

Se evaluó la citotoxicidad del HP-β-CD panobinostat en las células humanas SF8628 GPID (cortesía del grupo de Gupta en UCSF, EE.UU.).

Se empleó un ensayo de viabilidad celular fluorescente (células muertas/células vivas) (Invitrogen). Las células se cultivaron en presencia de HP-β-CD panobinostat en LCR artificial durante 72 horas a dosis 10 μM, 5 μM, 3 μM, 1 μM, 0,3 μM, 0,1 μM, 0,03 μM y 0,01 μM por triplicado. El ensayo se repitió tres veces en tres subcultivos diferentes. La viabilidad celular en comparación con controles de células vivas y células muertas (y control único del vehículo). Se graficó la curva de respuesta a las dosis utilizando el software GraphPad Prism (ver la Figura 2A). Se calculó el valor de CI_{50}, el cual resultó ser de 0,01 μM.

Estos resultados demuestran que el panobinostat formulado como un aducto de HP-β-CD panobinostat es soluble en el LCR artificial a un pH neutro y que exhibe una potente actividad de eliminación de células cancerígenas contra una gama de líneas células tumorales, incluyendo gliomas y, en particular, contra células de GPID *in vitro*.

Con el fin de analizar la evolución temporal del efecto que tiene el HP-β-CD panobinostat sobre las células de GPID, las células se cultivaron en presencia de HP-β-CD panobinostat durante 72 horas, 6 horas y 30 minutos, en dosis 5 μM, 3μM, 1μM, 0,3μM, 0,1μM, 0,03μM, 0,01μM por triplicado, en tres subcultivos separados. La incubación a corto plazo (6 horas y 30 minutos) se evaluó después de 72 horas de la aplicación de la dosis. Los resultados se muestran en la Figura 2B. A continuación, se muestran los valores de CI_{50} para cada intervalo de tiempo:

Tiempo de incubación	**CI_{S0} (PM)**
72 horas	0,01
6 horas	0,04
30 minutos	0,06

Estos resultados indican que incluso una breve exposición a las concentraciones citotóxicas puede ser suficiente para obtener una eficacia antitumoral. Los datos farmacocinéticos sugieren que el HP-β-CD panobinostat en LCR artificial para suministro basado en CED se difunde desde la punta del catéter rápidamente.

Ejemplo 4 – Solubilidad y estabilidad de las formulaciones de Panobinostat

De acuerdo con los estudios de la bibliografía, se ha identificado que el panobinostat se puede disolver en fases mixtas de DMSO y agua. Con el fin de administrar el fármaco directamente en el cerebro de un paciente mediante el método de CED, es necesario utilizar líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial como disolvente.

En el contexto de la administración basada en CED, por lo general se prepara la solución del fármaco un día antes de la administración programada. Si se programa la administración de un tratamiento basada en CED a un paciente para un lunes, la solución farmacológica debería prepararse el viernes y almacenarse en el refrigerador hasta el lunes. Por lo tanto, una solución de panobinostat preparada en LCR artificial debe demostrar que es estable durante al menos 48 horas a 4 °C.

Este estudio tuvo como objeto determinar las concentraciones de panobinostat que se pueden alcanzar con éxito en mezclas de DMSO/LCRa, así como determinar su estabilidad a una temperatura ambiente de 4 °C.

Se preparó una solución madre de panobinostat en DMSO a concentración 70 mg/ml ≡ 0,2 M ≡ 200 mM.

A partir de esta solución, se prepararon varias soluciones de trabajo de DMSO 20 mM, 10 mM, 5 mM, 2 mM y 1 mM por disolución en DMSO.

Estas soluciones fueron diluidas 50:50 con LCRartificial (LCRa) y se obtuvieron los siguientes resultados.

Después de dilución 1/2 con LCRa para dar…	100 mM	20 mM	10 mM	5 mM	2 mM	1 mM
Soluble/homogénea	No	No	No	Sí	Sí	Sí

La solución 20 mM se diluyó adicionalmente con LCRa para dar como resultado las siguientes concentraciones. Después de que las muestras se sometieran a agitación vorticial, las muestras se centrifugaron durante 60 segundos.

Solución 20 mM diluida con LCRa para dar	10 mM	5 mM	2 mM
Soluble/homogénea	No (gránulos)	No (gránulos)	No (gránulos)

La solución 10 mM se diluyó adicionalmente con LCRa para dar como resultado las siguientes concentraciones. Después de que las muestras se sometieran a agitación vorticial, las muestras se centrifugaron durante 60 segundos.

Solución 20 mM diluida con LCRa para dar	5 mM	2 mM	1 mM	0,5 mM
Soluble/homogénea	Sí	No (gránulos)	No (gránulos)	No (gránulos)

Es evidente que la proporción DMSO: LCRa es importante. Se pueden preparar concentraciones activas útiles entre 5 mM y 1 mM, pero sólo si la proporción de DMSO es de ~50 % v/v. Para uso *in vivo* en humanos, la presencia de DMSO, en particular a una concentración tan alta como del 50 % v/v, es indeseable.

En comparación, el aducto de HP-β-CD panobinostat es soluble y estable en LCR artificial a 4 °C durante al menos 48 horas.

Las soluciones madre de panobinostat (10 mM) se prepararon y se disolvieron en DMSO o tampón de citrato (pH 3). Se diluyeron las muestras para permitir el análisis por HPLC (para evitar la sobrecarga del sistema). Las áreas de los picos se midieron para ambas soluciones en el tiempo 0, 100 h y 150 h después de la preparación. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante el transcurso del análisis. El cambio porcentual se calcula con base en el área del pico y se compara con el análisis en el tiempo cero. Se analizó una réplica y se inyectaron 7,2 µl (equivalente a 0,25 µg en columna) para cada muestra. La concentración de las soluciones madre evaluadas fue 10 mM.

Columna: Péptido Ascentis Express, ES-C18, 10 cm x 4,6 mm
Fases móviles: 0,1 % de ácido trifluoroacético (TFA) en acetonitrilo (orgánico) y 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua.

HPLC: Agilent 1260 infinity

Tiempo (min)	Flujo (mi)	Agua + TFA	Acetonitrilo + TFA
0	1	90	10
2	1	90	10
3	1	0	100
9	1	90	10

Resultados:

A 100 horas, la solución de DMSO muestra que la concentración de panobinostat había disminuido en un 2,8 %, en tanto que la solución de citrato había disminuido en 0,4 %. Del mismo modo, en el punto correspondiente a 150 horas, el panobinostat en solución de DMSO había disminuido en un 4,4 %, mientras que el panobinostat en solución de citrato había disminuido sólo en un 1 %.

	Porcentaje relativo al t=0		
	0 h	100 h	150 h
DMSO	100	97,2	95,6
Citrato	100	99,6	99

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los presentes inventores consideran que la relativamente baja estabilidad de panobinostat en DMSO, comparada con la de la solución de citrato puede ser provocada por la naturaleza oxidante del DMSO y su acción sobre el panobinostat. En vista de lo anterior, sería aconsejable formular el panobinostat en una solución sustancialmente libre de DMSO.

Se preparó una solución de HP-β-CD-panobinostat en LCR artificial a una concentración inicial de panobinostat 40 µM y se almacenaron varias alícuotas a 5 °C en frascos verticales sellados. Se tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo (t = 0, día 1, día 8, día 18 y en el día 22) y la concentración de panobinostat se midió por HPLC. El panobinostat restante se expresa en un porcentaje de la concentración inicial en t = 0, Los resultados fueron:

Día	Conc. Panobinostat
0	100 %
1	>99 %
8	>99 %
18	>99 %
22	>99 %

En todos los puntos de tiempo medidos, hasta el día 22, inclusive, la concentración de panobinostat esencialmente no cambió: fue mayor al 99 % de la concentración inicial. Estos resultados demuestran que el HP-β-CD-panobinostat formulado en LCR artificial es notablemente estable.

Ejemplo 5 – Tratamiento contra GPID humano en un paciente con HP-β-CD panobinostat por CED

Se trató a un solo paciente (una niña de 5 años) con GPID por infusión directa de CED con HP-β-CD-panobinostat en LCR artificial.

El paciente contaba con un sistema de suministro de fármacos previamente implantado que incorpora un puerto transcutáneo en el cráneo que permite la administración continua del fármaco por el método de CED.

El HP-β-CD-panobinostat en LCR artificial se preparó como se describió anteriormente. El HP-β-CD-panobinostat a una concentración 10 µM se administró o se propagó durante un período aproximado de 8 horas hasta obtener un volumen suministrado de 12 ml, distribuidos en cuatro catéteres. Se brindó atención anestésica pediátrica supervisada por un especialista. Se llevó a cabo una monitorización fisiológica continua y se realizó una evaluación de las funciones neurológicas cada hora. Lo anterior incluyó el registro exacto de las funciones de las extremidades y del nervio craneal.

Se descubrió que la administración de HP-β-CD-panobinostat en LCR artificial por medio de CED fue bien tolerada y no se observaron efectos secundarios.

Ejemplo 6 - Liofilización del aducto de HP-β-CD-panobinostat

Se obtuvieron dos preparaciones de HP-β-CD-panobinostat, de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1.

La primera preparación se liberó y almacenó a 4 °C para realizar pruebas de estabilidad a largo plazo. En el día 42, se observaron partículas visibles en muchos frascos del producto (pero no en todos). El análisis de estas partículas mostró que sólo contenían sales inorgánicas (es decir, que no contenían ya fuera ciclodextrina o el compuesto de panobinostat). La presencia de magnesio y fósforo y, por lo tanto, se concluyó que las partículas visibles eran cristales de fosfato de magnesio.

Sin ánimo de limitarse a una teoría en particular, los inventores de la presente consideran que la presencia de una forma de nanopartículas de un aducto de ciclodextrina en LCR artificial (LCRa) puede estimular la nucleación de ciertas sales presentes en el LCRa. El LCR artificial contiene una mezcla de sales a concentraciones variables. Algunas de estas sales tienen una solubilidad intrínseca más baja que otras y, por lo tanto, es más probable que presentan nucleación en el transcurso del tiempo. La adición de una masa relativamente grande de ciclodextrina, que se cree que se encuentra ya en una forma nanoparticulada, a la solución, bien puede acelerar la nucleación.

Los presentes inventores han formulado la teoría de que se podría llevar a cabo una mejora mediante la introducción de un paso de liofilización. Es decir que, al minimizar el tiempo en que estas sales se encuentran en solución junto con el aducto de HP-β-CD-panobinostat, o sea, al llevar a cabo la reconstitución justo antes de la administración, los inventores esperan sortear el problema de la cristalización gradual de sales inorgánicas.

En el presente ejemplo, el proceso de liofilización implica la refrigeración de las muestras que contienen el aducto de HP-β-CD-panobinostat a -52 °C al vacío (0,053 mbar) durante alrededor de 2 horas. Sin embargo, se contemplan otros procedimientos de liofilización, siempre que produzcan un sólido sustancialmente desecado (por ejemplo, con contenido de agua por debajo del 10 % en peso, por debajo del 5 % en peso o incluso por debajo de 2 % en peso). Un especialista en la materia seguramente tendrá en cuenta los diversos procesos de liofilización que se pueden utilizar en el marco de la presente invención.

A continuación, se describe el proceso modificado para la producción del aducto de HP-β-CD-panobinostat en LCR artificial, por medio del cual, el aducto de HP-β-CD-panobinostat se liofiliza para su almacenamiento y envío antes de la reconstitución en LCRa al momento de administración para obtener una solución lista para inyección.

Solución A: Ácido cítrico 0,1 M en agua

El ácido cítrico (Sigma Aldrich C-0759; N.º de Lote 21K0042) (2,101 g) se pesó y se disolvió en 100 ml de agua ultrapura.

Solución B: Citrato de sodio 0,1 M en agua

El citrato de sodio (tribásico) (Sigma Aldrich C3434; N.º de Lote 1304640/41807230 (2,944 g) se pesó y se disolvió en 100 ml de agua ultrapura.

Solución C: Tampón de citrato 0,1 M

La solución A (82 ml) y la solución B (18 ml) se añadieron a un matraz Duran de 250 ml y se mezclaron brevemente para formar [C]. Se midió el pH de la solución tampón de citrato, que resultó ser de pH 3,0,

Solución D: Solución 10 mM de panobinostat en tampón de citrato (25 ml)

Concentración = 10 mM = 0,01 M
Volumen = 25 ml = 0,025 l
Por lo tanto, el número de moles necesarios = $2,5x10^{-4}$
El peso molecular de panobinostat = 349,43 g/mol
Por lo tanto, la masa de panobinostat necesaria = 82,36 mg

Por consiguiente, la base libre de panobinostat (81,0 mg) se pesó y se disolvió en la solución C (24,59 ml).

La mezcla se agitó en un agitador orbital durante 10 minutos para producir una solución clara e incolora [D].

Solución E: 2-Hidroxipropil-β-ciclodextrina 100 mg/ml en agua (20 ml)

La 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina tiene un peso molecular de 1460 g/mol. La solución se preparó bajo las siguientes condiciones por simplicidad. Concentración = 100mg/ml. La 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (Sigma Aldrich H107; N.º de Lote 048K0672) (2,004 g) se pesó y se disolvió en 20,04 ml de agua ultra purificada. La mezcla fue agitó en un agitador orbital durante 10 minutos para producir una solución clara e incolora [E].

Solución F: Aducto de panobinostat - 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (5mM)

Se mezclaron volúmenes idénticos de las soluciones D (2ml) y E (2ml) en un tubo Falcon. La solución transparente e incolora se sometió brevemente a agitación vorticial para homogeneizarla.

Solución G: Aducto de panobinostat - 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (3,125mM)

Para producir una solución neutra (~pH 7), se mezcló una muestra de la solución [F] (1 ml) con $NaOH_{(Ac)}$ (0,6 ml, 0,2 M) para producir una solución clara e incolora (1,6 ml en volumen).

Solución G liofilizada: Se liofilizaron 2 ml de la solución G de aducción por enfriamiento a -52 °C al vacío (0,053 mbar) durante alrededor de 2 horas, para producir una torta sólida. Posteriormente, el sólido liofilizado se puede almacenar según sea necesario, por ejemplo, para su envío a un sitio de entrega.

Solución H: Solución estéril del aducto de panobinostat - 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina en LCRa artificial (líquido cefalorraquídeo artificial) (40 µM)

La torta sólida liofilizada producida a partir de 2 ml de la solución G anterior se reconstituyó añadiendo 10 ml de LCRa para dar una solución 40 µM de panobinostat en LCRa. Esta solución se puede diluir aún más dependiendo de la dosis o del volumen que se requiere para el tratamiento.

Ejemplo 7 – Estabilidad de almacenamiento a largo plazo del aducto de HP-β-CD-panobinostat

La estabilidad a largo plazo del aducto de HP-β-CD-panobinostat se evaluó mediante las medidas de concentración de panobinostat y del porcentaje de impurezas en los intervalos desde t = 0 hasta un total de 24 semanas de almacenamiento a -25 °C – -15 °C (los datos no se muestran), 2 °C – 8 °C (los datos no se muestran), y 15 °C – 25 °C (Figuras 3 y 4).

Como se muestra en la Figura 3, la concentración de panobinostat resultó ser muy estable a lo largo del periodo de 24 semanas a 15 °C – 25 °C. Las representaciones de concentraciones equivalentes para -25 °C – -15 °C y 2 °C – 8 °C también mostraron un perfil similar con una concentración medida que permanece dentro del intervalo de 38 µM a 45 µM.

Se evaluó la posible degradación de panobinostat en el transcurso del tiempo en un intervalo de 15 °C – 25º C mediante

la medición de picos a cada lado del pico principal del compuesto panobinostat por HPLC (ver TRT 0,86 y TRT 1,12 en la Figura 4). Las impurezas totales expresadas como porcentaje también se muestran en la Figura 4, Las gráficas de la Figura 4 ilustran que las impurezas se mantuvieron en un nivel muy bajo (alrededor del 1 % o menos) durante el periodo de 24 semanas del estudio. Se observaron resultados muy similares para el almacenamiento a -25 °C – -15 °C y a 2 °C – 8 °C durante el mismo periodo de tiempo.

Si se consideran en conjunto, las mediciones de la concentración de panobinostat y de las impurezas indican que el aducto de HP-β-CD-panobinostat es estable incluso a temperatura ambiente durante un periodo de, por lo menos, 24 semanas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un aducto de ciclodextrina-panobinostat que tiene una concentración de menos de 1000 partes por millón (ppm) de acetona, tetrahidrofurano, diclorometano, acetonitrilo, dimetilformamida y dimetil sulfóxido (DMSO), que comprende:

a) proporcionar una primera solución acuosa que comprende un agente tampón, teniendo la solución un pH en el intervalo de 2,0 a 4,0;
b) disolver el panobinostat en dicha primera solución acuosa para proporcionar una segunda solución acuosa; y
c) mezclar dicha segunda solución acuosa que comprende panobinostat con una tercera solución acuosa que comprende ciclodextrina para formar una cuarta solución acuosa que comprende un aducto de ciclodextrina-panobinostat.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

la ciclodextrina es 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina; y/o
el agente tampón comprende ácido cítrico y citrato.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende adicionalmente:
d) añadir una cantidad suficiente de una base a dicha cuarta solución acuosa que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat para proporcionar una quinta solución acuosa que tiene un pH en el intervalo de 6,0 a 8,0.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además secar dicha quinta solución acuosa para formar un sólido que comprende dicho aducto de ciclodextrina-panobinostat.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además secar dicha cuarta solución acuosa para formar un sólido que comprende dicho aducto de ciclodextrina-panobinostat.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde dicho secado comprende liofilización a presión reducida para generar un sólido liofilizado que comprende dicho aducto de ciclodextrina-panobinostat.

7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde dicho sólido tiene un contenido de agua menor del 10 % p/p, opcionalmente, menor del 5 % en peso.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende además reconstituir dicho sólido al disolverlo en una solución de reconstitución.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la solución de reconstitución comprende: líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial, solución de Ringer, agua para inyección (WFI) o una solución salina tamponada.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende además ajustar el pH de la solución antes, durante o después de la reconstitución.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que implica adicionalmente mezclar dicha quinta solución acuosa que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat con una solución de líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial para proporcionar una sexta solución acuosa que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat en LCR artificial.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde la concentración de panobinostat en el LCR artificial está en el intervalo de 1 µM a 20 µM.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la etapa de filtración y/o esterilización de al menos una de dichas soluciones y/o dicho sólido que comprende dicho aducto ciclodextrina-panobinostat.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende además introducir al menos una parte del aducto de ciclodextrina-panobinostat en LCR artificial en al menos un catéter de administración mejorada por convección (CED).

15. Una solución reconstituida que comprende el aducto de ciclodextrina-panobinostat producido o producible por un método como se define en la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde dicha solución tiene una concentración (v/v) de menos de 1000 partes por millón (ppm) de acetona, tetrahidrofurano, diclorometano, acetonitrilo, dimetilformamida y dimetil sulfóxido (DMSO) y en donde el pH de la solución reconstituida está en el intervalo de 6,0 a 8,0.

16. La solución reconstituida de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el aducto de ciclodextrina-panobinostat está en forma de una nanopartícula o un nanotubo.

17. Una solución de líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial que comprende un aducto de ciclodextrina-panobinostat, en donde dicha solución tiene una concentración (v/v) de menos de 1000 partes por millón (ppm) de acetona, tetrahidrofurano, diclorometano, acetonitrilo, dimetilformamida y dimetil sulfóxido (DMSO).

18. La solución de LCR artificial de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la solución es producida o producible por un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14.

19. La solución de LCR artificial de acuerdo con la reivindicación 17 o la reivindicación 18, en donde el aducto de ciclodextrina-panobinostat es 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina-panobinostat.

20. La solución de LCR artificial de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en donde la solución está sustancialmente libre de dimetilsulfóxido (DMSO).

21. La solución de LCR artificial de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, en donde la solución está sustancialmente libre de cualquier disolvente orgánico.

22. Un catéter de administración mejorada por convección (CED) que comprende la solución de LCR artificial de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21.

23. Una solución de líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21 para su uso en un método de tratamiento de un tumor cerebral en un sujeto mamífero.

24. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el tumor cerebral comprende un glioma.

25. La solución para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el glioma comprende glioma pontino intrínseco difuso (GPID).

26. La solución para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en donde dicho método de tratamiento comprende la administración de dicha solución de LCR artificial en el cerebro de dicho sujeto mamífero por medio del método de administración mejorada por convección (CED).

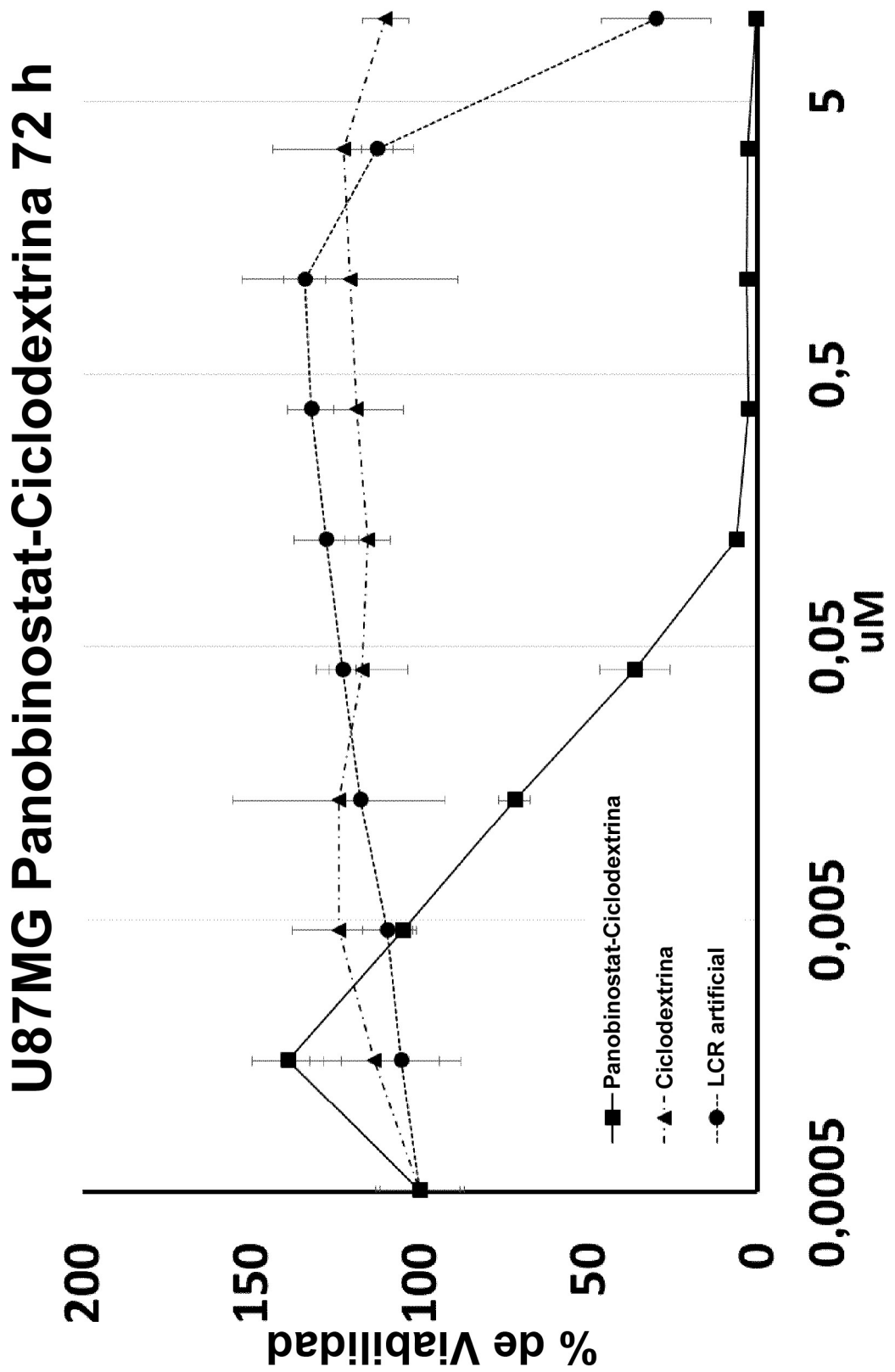

U87MG Panobinostat-Ciclodextrina 72 h
% de Viabilidad
200
150
100
50
0
0,0005
0,005
0,05
0,5
5
uM
Panobinostat-Ciclodextrina
Ciclodextrina
LCR artificial

Figura 1A

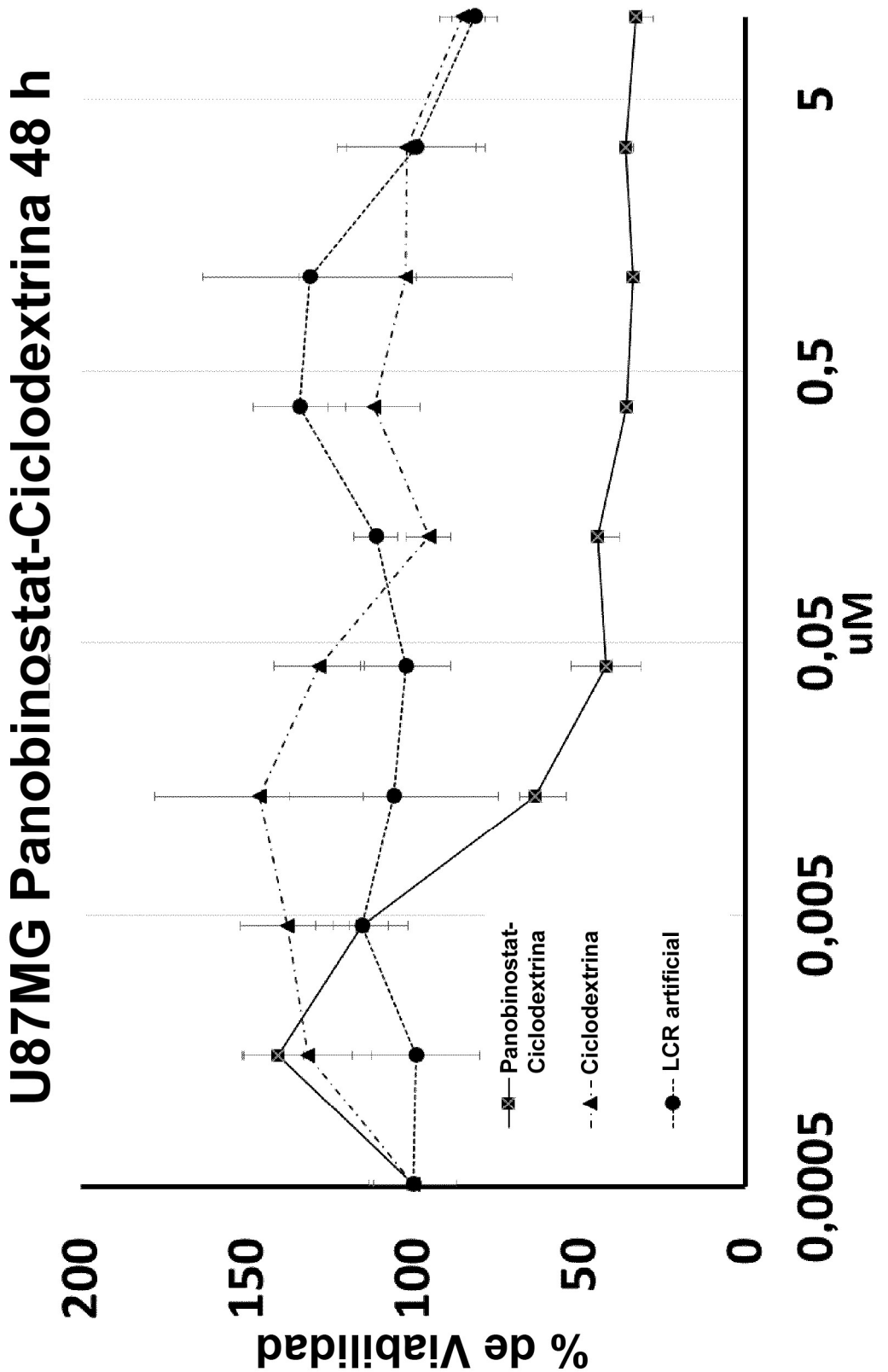

U87MG Panobinostat-Ciclodextrina 48 h
% de Viabilidad
200
150
100
50
0
0,0005
0,005
0,05
0,5
5
uM
Panobinostat-Ciclodextrina
Ciclodextrina
LCR artificial

Figura 1B

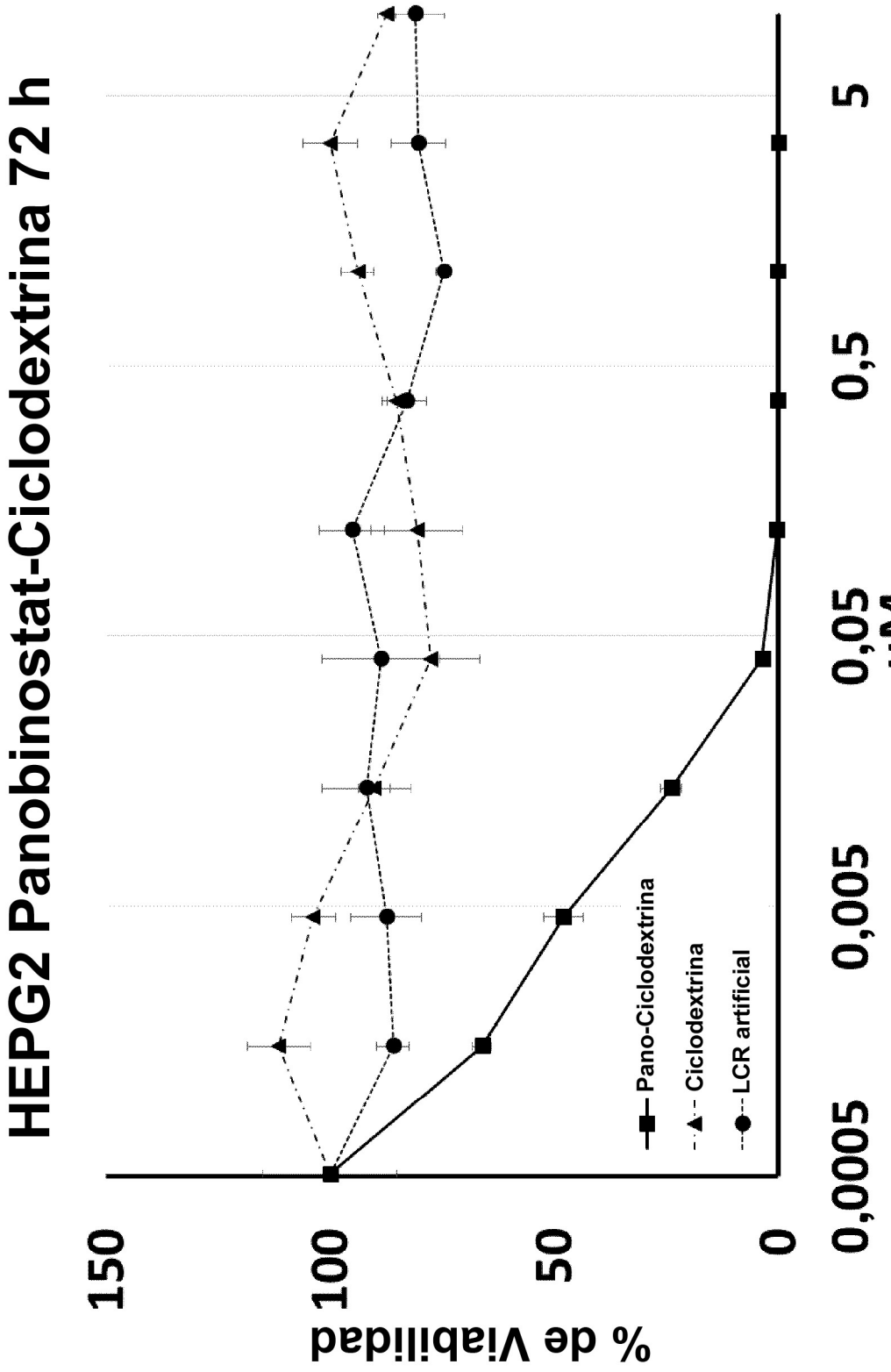

HEPG2 Panobinostat-Ciclodextrina 72 h
% de Viabilidad
150
100
50
0
0,0005
0,005
0,05
0,5
5
uM
Pano-Ciclodextrina
Ciclodextrina
LCR artificial

Figura 1C

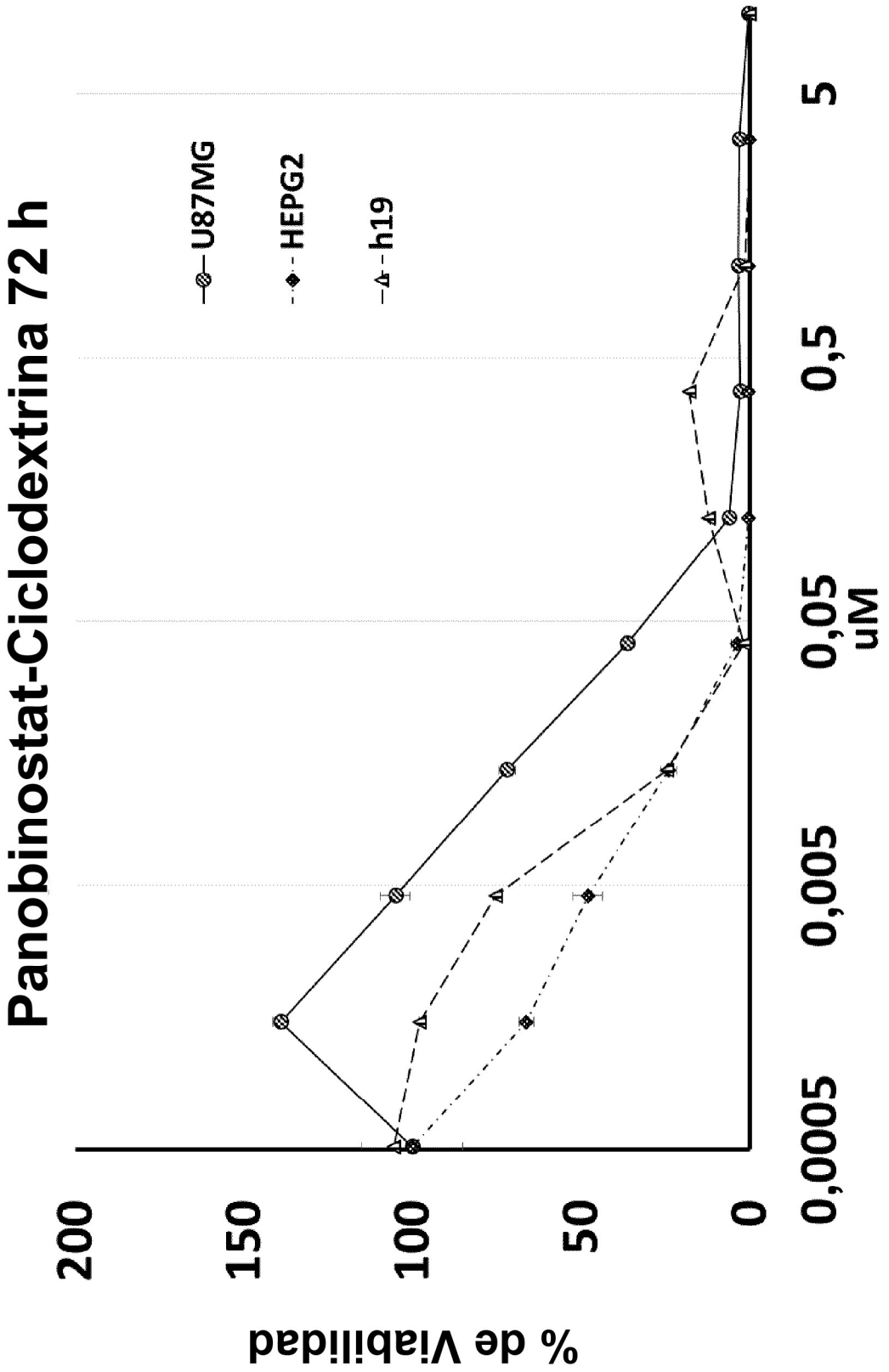

Panobinostat-Ciclodextrina 72 h
U87MG
HEPG2
h19
% de Viabilidad
200
150
100
50
0
0,0005
0,005
0,05
uM
0,5
5

Figura 1D

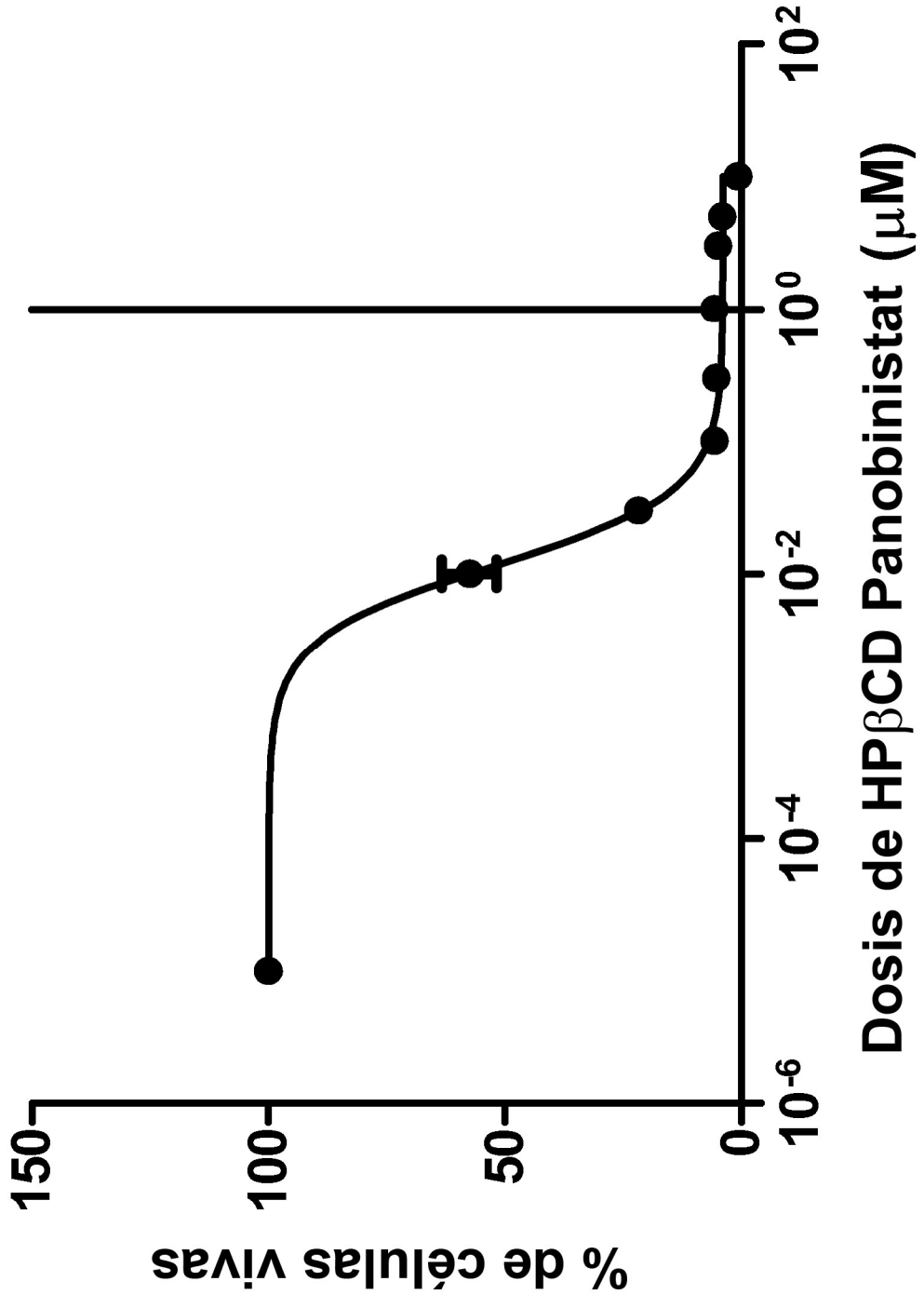

% de células vivas
150
100
50
0
Dosis de HPβCD Panobinistat (μM)
10-6
10-4
10-2
100
102

Figura 2A

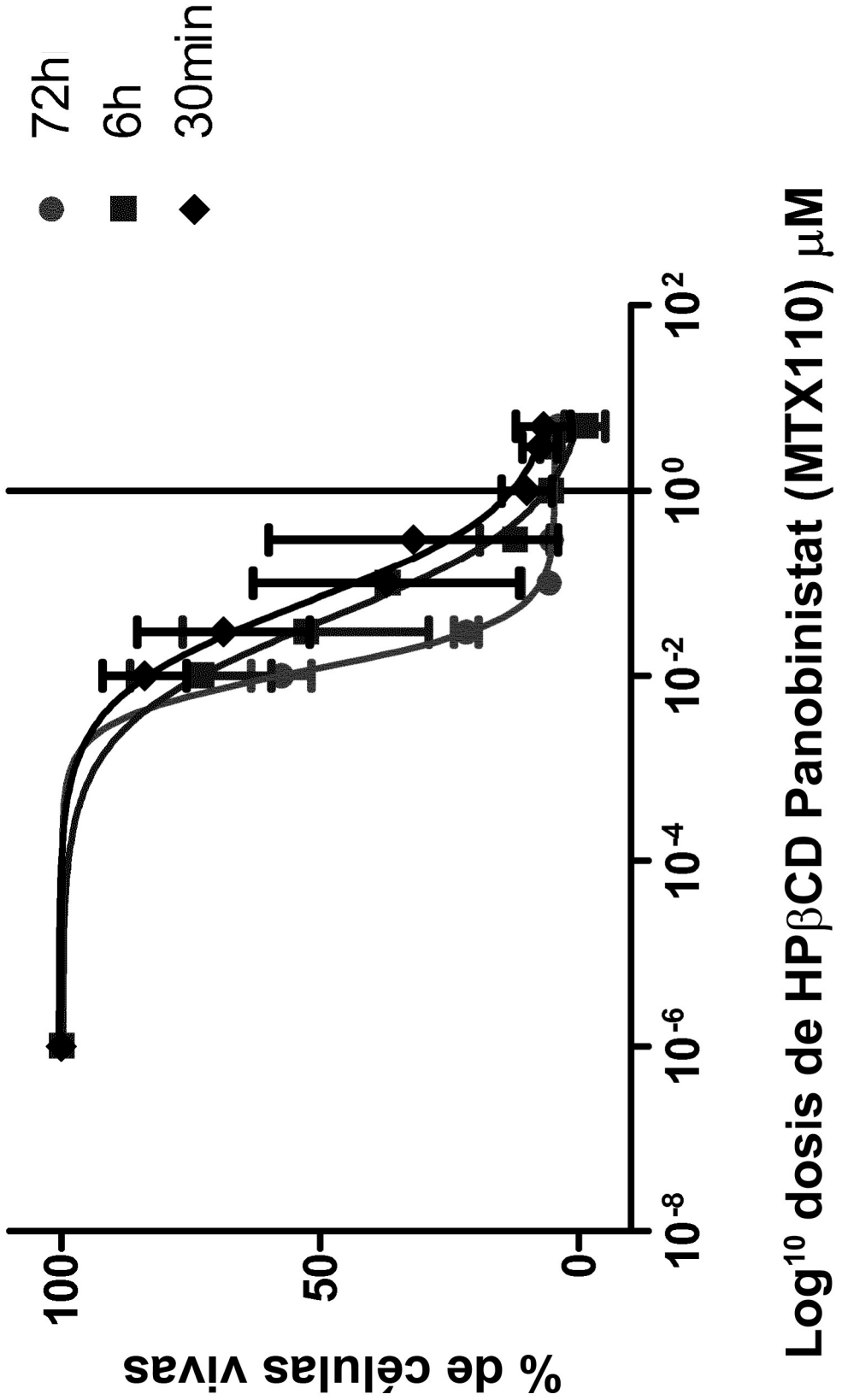

72h
6h
30min
% de células vivas
100
50
0
Log10 dosis de HPβCD Panobinistat (MTX110) μM
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102

Figura 2B

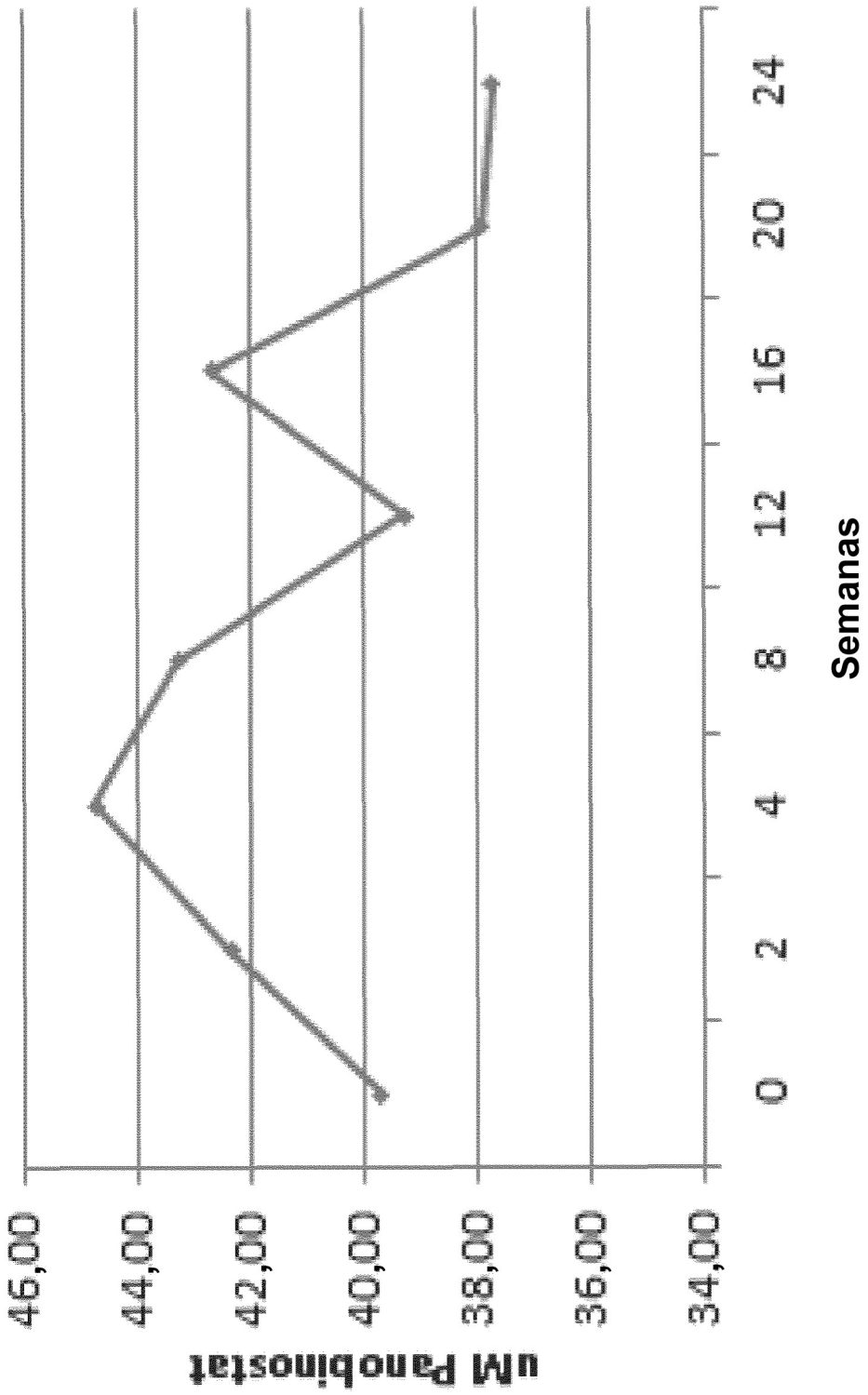

46,00
44,00
42,00
40,00
38,00
36,00
34,00
uM Panobinostat
0
2
4
8
12
16
20
24
Semanas

Figura 3

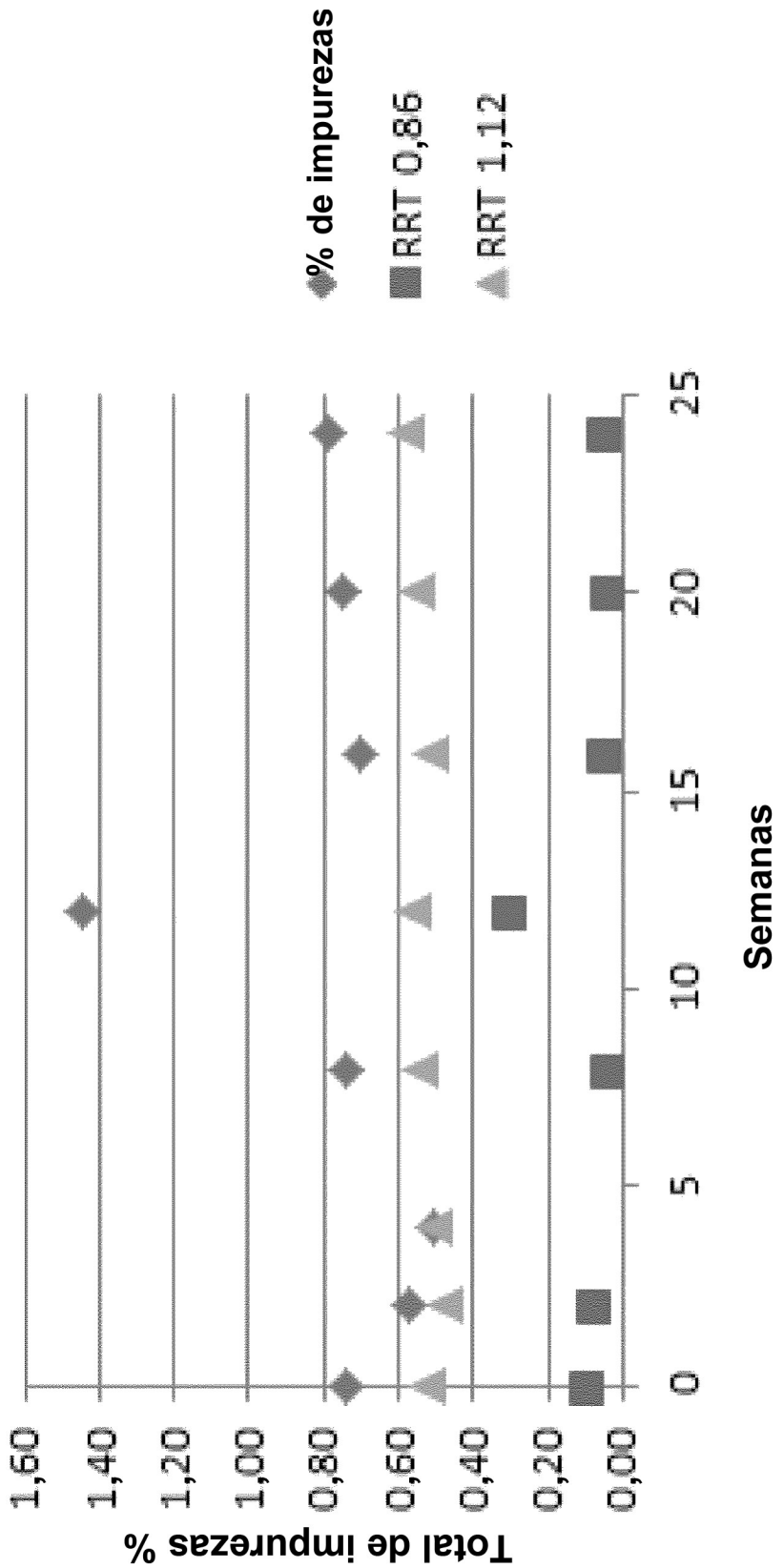

% de impurezas
RRT 0,86
RRT 1,12
Total de impurezas %
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
0
5
10
15
20
25
Semanas

Figura 4