

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 253**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 31/4995 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2021 PCT/EP2021/059772**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2021 WO21209545**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2021 E 21718127 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024 EP 4041194**

54 Título: **Composición que comprende trabectedina y un aminoácido**

30 Prioridad:

15.04.2020 EP 20169567

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.10.2024

73 Titular/es:

**EVER VALINJECT GMBH (100.0%)
Oberburgau 3
4866 Unterach am Attersee, AT**

72 Inventor/es:

**ACHLEITNER, MARIA-LENA;
GEHWOLF, NIKOLAUS y
SCHNAIT, HEINZ**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 981 253 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

Composición que comprende trabectedina y un aminoácido

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición, una formulación liofilizada y una inyección intravenosa que comprende trabectedina y un aminoácido.

10 **Antecedentes de la técnica**

La trabectedina (Ecteinascidina o ET-743) es un alcaloide de tetrahidroisoquinolina, que se aisló inicialmente del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata* y posee actividad antitumoral.

15 La trabectedina tiene una solubilidad acuosa y una estabilidad térmica limitadas, lo que representa un desafío para el desarrollo de formulaciones con fines médicos. La trabectedina es particularmente eficaz en el tratamiento del sarcoma y el cáncer de ovarios.

20 El documento WO2000069441 divulga el uso de trabectedina en la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer en seres humanos. La composición farmacéutica se formula como un producto liofilizado que contiene manitol como agente de carga y un tampón fosfato a pH 4 para estabilizar la trabectedina. La formulación se administra como infusión intravenosa.

25 El documento WO2006046079 divulga que los disacáridos estabilizan las formulaciones de ecteinascidina. El documento WO2006046079 describe una composición que comprende una ecteinascidina tal como ET-743 y un disacárido tal como sacarosa, que es liofilizado y reconstituido para obtener una infusión intravenosa.

30 Actualmente, la trabectedina está formulada como un producto liofilizado estéril que se presenta en un vial que contiene 0,25 mg de trabectedina, 100 mg de sacarosa y 2 mg de potasio en forma de dihidrógenofosfato de potasio, así como hidróxido de potasio y ácido fosfórico para ajustar el pH.

35 El documento WO2017133544A1 se refiere a formulaciones de trabectedina estabilizadas que pueden comprender glucosa como primer excipiente e hidroxietilalmidón, dextrano o carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilbetaciclodextrina como segundo excipiente.

40 El documento IN201741041173 divulga una composición farmacéutica estable de trabectedina. Se ilustra una formulación que comprende trabectedina y L-arginina en una proporción de 1:400. Una cantidad tan elevada de aminoácidos conduce a un alto volumen de solución para la liofilización y, consecutivamente, a ciclos de secado más largos. Adicionalmente, altas cantidades de aditivos auxiliares pueden tener efectos negativos para los pacientes.

En vista de la importancia de la trabectedina como agente quimioterapéutico, todavía existe la necesidad de mejorar las formulaciones de trabectedina, que son biocompatibles, estables y adecuadas para fines médicos.

45 **Sumario de la invención**

El objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación de trabectedina que sea estable y adecuada para fines médicos.

50 El objetivo se resuelve mediante la materia reivindicada y tal como se divulga en el presente documento.

La presente invención proporciona una composición que comprende trabectedina y al menos un aminoácido, en donde la relación en peso (p/p) entre trabectedina y el aminoácido es de 1:50 a 1:100, y en donde el aminoácido es L-arginina.

55 En una realización, la relación en peso (p/p) entre trabectedina y el aminoácido es de aproximadamente 1:70, y en donde el aminoácido es L-arginina.

60 En un aspecto, la composición descrita en el presente documento comprende un agente tampón. El agente tampón se puede seleccionar entre el grupo que consiste en ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido acético, aminoácido básico e hidróxido de sodio, o cualquier mezcla de los mismos, o una mezcla de ácido cítrico, ácido fosfórico y opcionalmente un aminoácido básico.

65 En un aspecto, la composición descrita en el presente documento comprende sustancias adicionales seleccionadas entre el grupo que comprende un agente de formación de complejos tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); un antioxidante tal como monoioglicerol; un agente tensioactivo tal como polisorbato; manitol; y ácido ascórbico.

En la formulación de acuerdo con la invención, la principal fuente de control del pH es un agente tampón. Normalmente,

5 el agente tampón está presente como un ácido o una base y su base o ácido conjugado, respectivamente. En una realización, el intervalo de sal tampón es de 1-100 mM, preferentemente entre 5-50 mM, lo más preferentemente de aproximadamente 10 mM (en formulaciones sólidas, la cantidad de tampón se selecciona para producir esta concentración después de la reconstitución/dilución). La concentración de tampón y el pH de la solución se eligen ventajosamente para proporcionar un equilibrio óptimo de solubilidad y estabilidad. Ejemplos de tampones adecuados incluyen mezclas de ácidos débiles y sales de metales alcalinos (por ejemplo, sodio, potasio) de la base conjugada de ácidos débiles tales como citrato de sodio e hidrogenofosfato disódico.

10 En una realización, la composición está en forma de una formulación liofilizada. Por lo tanto, la presente invención también proporciona una formulación liofilizada que comprende trabectedina, al menos un aminoácido, en donde la relación en peso (p/p) entre trabectedina y el aminoácido es de 1:50 a 1:100, y en donde dicho aminoácido es L-arginina. En una realización específica, la relación en peso (p/p) entre trabectedina y el aminoácido es de aproximadamente 1:70, y en donde el aminoácido es L-arginina.

15 En una realización adicional, la formulación liofilizada comprende un agente tampón.

En un aspecto, el aminoácido en la formulación liofilizada es L-arginina y el agente tampón es ácido cítrico o ácido fosfórico, o una mezcla de los mismos.

20 En otro aspecto, la formulación liofilizada se proporciona en un vial. En una realización ilustrativa, el vial contiene de 0,1 a 1 mg de trabectedina, de 10 a 60 mg de L-arginina, de 0,5 a 8 mg de ácido cítrico, de 5 a 40 mg de ácido fosfórico. En una realización específica, el vial contiene 0,25 mg de trabectedina, 17,4 mg de L-arginina, 1,9 mg de ácido cítrico y de 10 a 15 mg de ácido fosfórico.

25 La formulación liofilizada es adecuada para preparar una solución para infusión intravenosa mediante reconstitución en un medio acuoso. Por lo tanto, la invención proporciona además una solución para infusión intravenosa que comprende trabectedina, un aminoácido, un agente tampón y agua para inyección.

30 En un aspecto, la solución para infusión intravenosa se utiliza en el tratamiento del cáncer. El cáncer a tratar puede ser un sarcoma, seleccionado del grupo de leiomiomasarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer de mama, melanoma, cáncer colorrectal, mesotelioma, cáncer de riñón, cáncer de endometrio y cáncer de pulmón, o cualquier combinación de los mismos.

35 En una realización más, la infusión intravenosa descrita en el presente documento se utiliza para el tratamiento de pacientes adultos con sarcoma de tejidos blandos avanzado.

40 En una realización, la solución para perfusión intravenosa se utiliza para el tratamiento de pacientes con cáncer de ovarios sensible a platino recidivante. El tratamiento puede realizarse en combinación con doxorubicina liposomal pegilada (PLD).

Breve descripción de los dibujos

45 Fig. 1: Pureza de las muestras de estabilidad a corto plazo almacenadas a 5 °C (arriba) y 22 °C (abajo) durante hasta 29 horas.

Fig. 2: Estabilidad de los liofilizados a 2-8 °C: contenido de trabectedina (A285 nm) por RP-HPLC en % de la referencia (0,25 mg/ml).

50 Fig. 3: Estabilidad de los liofilizados a 2-8 °C: pureza de las muestras como área relativa del pico de trabectedina mediante análisis RP-HPLC (A285 nm).

Descripción de las realizaciones

55 La presente invención se refiere a una composición que comprende trabectedina y al menos un aminoácido. La formulación comprende trabectedina como sustancia activa y puede formularse como una formulación liofilizada, que puede reconstituirse para obtener una infusión intravenosa.

60 En el contexto de la presente invención, la trabectedina puede ser de origen natural, semisintético o sintético, incluyendo combinaciones de orígenes.

65 Las formulaciones conocidas de trabectedina utilizan sacáridos (por ejemplo, el documento WO2017133544 A1) para obtener una formulación estable. Sin embargo, los sacáridos pueden mostrar varias propiedades desfavorables cuando se usan en formulaciones farmacéuticas. En primer lugar, la glucosa y la sacarosa no se pueden administrar a pacientes diabéticos sin tener en cuenta la ingesta adicional de carbohidratos. Los pacientes diabéticos deben controlar su ingesta de carbohidratos generadores de glucosa y sus medicamentos para reducir la glucosa para mantener su nivel de glucosa en sangre dentro de ciertos límites. Por lo tanto, una formulación farmacológica que

contenga glucosa o sacarosa no es óptima para este grupo de pacientes específico.

Adicionalmente, los sacáridos también son la fuente de un producto de degradación específico de la trabectedina que se formará. Todos los sacáridos que pueden formar una estructura hemiacetal en solución (es decir, todos los azúcares "reductores") pueden reaccionar con grupos hidroxilo para formar un acetal estable y agua (Jerry March, *Advanced Organic Chemistry*, 3ª edición. páginas 789 - 790; John Wiley & Sons). Los productos de reacción, el acetal y el agua están en equilibrio con el compuesto farmacológico, por ejemplo, trabectedina y su grupo hidroxilo. Al eliminar el agua (por ejemplo, después de la liofilización), el equilibrio se desplaza mucho hacia el lado del acetal, formándose así este producto de reacción en cantidades relevantes.

La trabectedina, cuya estructura muestra tal grupo hidroxilo, por lo tanto es propenso a formar acetales con azúcares reductores, como glucosa o lactosa, durante la liofilización.

Esta vía de degradación específica se ha observado en formulaciones liofilizadas de trabectedina que contienen glucosa. Cuando dichas formulaciones se liofilizan, se observó la formación del acetal de trabectedina-glucosa. Aunque, este acetal se hidroliza tras la reconstitución del liofilizado, todavía está presente en la solución reconstituida durante horas (por ejemplo, con niveles relativos de aproximadamente 0,5 % después de 6 horas). Puede detectarse mediante HPLC. El método de HPLC empleado es idéntico al descrito en el presente documento en la sección de selección de formulaciones. La degradación finalmente conduce a un equilibrio con niveles bastante bajos, pero aún detectables, de impureza acetal. La aplicación de un producto farmacológico que contiene un producto de degradación de propiedades toxicológicas desconocidas a los pacientes puede ser problemática desde un punto de vista toxicológico pero también desde el punto de vista de la precisión de la dosis porque parte de la dosis de trabectedina se pierde en el acetal y no está disponible para la terapia.

Este efecto secundario de las formulaciones de trabectedina que contienen azúcares reductores (por ejemplo, glucosa o lactosa) se puede superar simplemente esperando después de la preparación de una solución para infusión hasta que la mayor parte del acetal se haya hidrolizado antes de comenzar la infusión. Sin embargo, en la práctica hospitalaria, este es un procedimiento que consume mucho tiempo y es menos deseable, que debe evitarse. Por lo tanto, es ventajosa una formulación que no presente este tipo de producto de degradación.

Asimismo, las formulaciones divulgadas en el documento IN201741041173 utilizan principalmente monosacáridos en combinación con alcoholes de azúcar para la preparación de una composición farmacéutica estable de trabectedina. Como alternativa, también se pueden utilizar aminoácidos como excipiente. Se ilustra una formulación que comprende trabectedina y L-arginina en una proporción de 1:400.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que incluso cantidades bajas de aminoácidos estabilizan las composiciones de trabectedina sin generar productos de degradación de trabectedina. En este contexto, por "estabilidad" se entiende la definición desarrollada por el Grupo de Trabajo de Ingeniería de Procesos Farmacéuticos (APV), según el cual "estabilidad" significa la calidad del medicamento especificada hasta el final del plazo especificado por el fabricante. La calidad del fármaco está determinada por el contenido de sustancia activa y la pureza, las propiedades sensorialmente perceptibles, fisicoquímicas y microbiológicas, por lo que el contenido de sustancia activa no deberá ser inferior al 90 % del valor declarado al final del plazo.

La formulación producida según la invención tiene una estabilidad (o en otras palabras una vida útil o tiempo de funcionamiento) de al menos 3 meses, preferentemente de al menos 6 meses, más preferentemente de al menos 12 meses, incluso más preferentemente de al menos 24 meses a una temperatura de 2 a 8 °C. y lo más preferentemente de al menos 36 meses, de modo que el contenido de trabectedina al final del plazo no sea inferior al 90 %, preferentemente el 95 %, de la trabectedina utilizada originalmente.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales, incluyendo aminoácidos proteinogénicos y no proteinogénicos, aminoácidos sintéticos y análogos de aminoácidos, todos en sus estereoisómeros D y L si su estructura permite tales formas estereoisoméricas. Los aminoácidos incluyen aminoácidos no polares, polares, básicos y ácidos. Los aminoácidos proteinogénicos no polares son glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), prolina (Pro), triptófano (Trp), fenilalanina (Phe) y metionina (Met). Los aminoácidos proteinogénicos polares incluyen serina (Ser), treonina (Thr), tirosina (Tyr), asparagina (Asn), glutamina (Gln) y cisteína (Cys). Los aminoácidos proteinogénicos básicos incluyen arginina (Arg), histidina (His) y lisina (Lys). Los aminoácidos proteinogénicos ácidos incluyen ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu). Los aminoácidos sintéticos incluyen acetilcisteína. Los aminoácidos no proteinogénicos incluyen citrulina.

El aminoácido puede ser un aminoácido no polar, polar, básico o ácido, o cualquier combinación de los mismos. Según una realización, el aminoácido se selecciona del grupo de aminoácidos proteinogénicos no polares, específicamente L-fenilalanina o L-isoleucina, o cualquier combinación de los mismos.

La proporción entre trabectedina y el aminoácido en las realizaciones descritas en el presente documento se determina de acuerdo con la solubilidad del aminoácido y, cuando la formulación se liofiliza, también según la liofilización del aminoácido. La relación en peso (p/p) entre trabectedina y el aminoácido (p/p) puede ser de aproximadamente 1:50,

1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, en donde dicho aminoácido es L-arginina. En algunas realizaciones, la relación en peso está en el intervalo de 1:50 a 1:100. En una realización específica, la relación en peso es de aproximadamente 1:70.

5 El término "aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a valores en el intervalo de +/- 10 % del valor citado.

10 En un aspecto específico, la composición descrita en el presente documento comprende además un agente tampón. El agente tampón permite mantener el pH del sistema en un intervalo que favorece la estabilidad de trabectedina. Normalmente, el pH estará en el intervalo de pH 2 a pH 5. Los tampones adecuados son, por ejemplo, tampón citrato, tampón fosfato, tampón citrato/fosfato, tampón lactato, tampón ascorbato, tampón tartárico/citrato, tampón bicarbonato/ácido clorhídrico, tampón acetato o ácido acético, tampón succinato, tampón glicina/ácido clorhídrico. En algunas realizaciones, se pueden emplear tampones basados en aminoácidos tales como tampones basados en aminoácidos ya presentes en la composición. También se pueden usar mezclas de dichos agentes tampón.

15 Según una realización, el agente tampón se selecciona entre el grupo que consiste en ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido acético, aminoácido básico e hidróxido de sodio, o cualquier mezcla de los mismos. En una realización más, el agente tampón es una mezcla de ácido cítrico y ácido fosfórico (tampón citrato/fosfato). Específicamente, un tampón citrato/fosfato puede contener además un aminoácido básico, tal como L-arginina, un agente tampón. Además, se puede utilizar hidróxido de sodio para ajustar el pH.

20 Se pueden incluir otros componentes en la composición, por ejemplo un agente de formación de complejos tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); un antioxidante tal como monoioglicerol; un agente tensioactivo; manitol; y ácido ascórbico. Ejemplos de agentes tensioactivos incluyen polisorbato, monooleato de polioxietileno (20) sorbitán o estearato de polioxilo, fosfolípidos, tal como una lecitina; copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, tal como un tensioactivo Pluronic; ésteres de polioxietileno de ácido 12-hidroxisterárico, tal como un tensioactivo Solutol; etoxilatos de colesterol, tales como diacilglicerol, dialquiliglicerol; sales biliares, tales como colato de sodio, desoxicolato de sodio; ésteres de sacarosa, como monolaurato de sacarosa, monooleato de sacarosa; polivinilpirrolidona (PVP); o alcohol polivinílico (PVA).

30 La composición descrita en el presente documento puede estar en forma de una formulación liofilizada. La expresión "formulación liofilizada" como se usa en el presente documento se refiere a una formulación preparada mediante liofilización (liofilización) de una mezcla que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de trabectedina. Sorprendentemente, los inventores encontraron que el uso de uno o más aminoácidos como agente de volumen en el proceso de liofilización mejora las condiciones de almacenamiento y permite el almacenamiento a largo plazo de la formulación liofilizada en un amplio intervalo de temperaturas, incluyendo las condiciones de refrigeración y la temperatura ambiente.

35 Por lo tanto, la presente invención proporciona una formulación liofilizada que comprende trabectedina, al menos un aminoácido, un agente tampón y opcionalmente un agente de carga tal como manitol. El aminoácido puede actuar como agente de carga.

45 La expresión "agente de carga" como se usa en el presente documento se refiere a un compuesto que añade masa a una mezcla liofilizada (liofilizada) y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada (por ejemplo, facilita la producción de una torta liofilizada esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poros abierta). Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de carga también pueden impartir cualidades útiles con respecto a la modificación de la temperatura de colapso, proporcionando protección contra congelación y descongelación y mejorando la estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo. Los agentes de carga ilustrativos incluyen manitol, glicina, lactosa, sacarosa, dextrosa e hidroxietilalmidón. Los agentes de carga pueden ser cristalinos (tales como glicina o manitol), o amorfos (tales como dextrano o hidroxietilalmidón).

50 En una realización específica, el aminoácido en la formulación liofilizada descrita en el presente documento es un aminoácido no polar, polar, básico o ácido, o cualquier combinación de los mismos. El aminoácido puede ser un aminoácido no polar tal como L-fenilalanina o L-isoleucina, o un aminoácido básico, por ejemplo, L-arginina, L-lisina o L-histidina, o cualquier combinación de los mismos. Específicamente, el aminoácido es L-arginina. En un aspecto, la L-arginina se puede combinar con uno o más aminoácidos adicionales tales como L-fenilalanina o L-isoleucina. En otra realización, el aminoácido es citrulina. En otra realización más, el aminoácido es acetilcisteína.

60 En una realización, el aminoácido en dicha formulación liofilizada es L-arginina y el agente tampón es una mezcla de ácido cítrico y ácido fosfórico (tampón citrato/fosfato). El aminoácido puede actuar junto con una base adicionalmente también como agente tampón.

65 La formulación liofilizada de acuerdo con la presente invención se puede preparar liofilizando una composición descrita en el presente documento en forma de una solución de preliofilización. En el presente documento se describe un método para preparar una formulación liofilizada que comprende liofilizar la composición en forma de una solución de preliofilización, en donde la solución de preliofilización comprende trabectedina a una concentración de 0,1 a 1 mg/ml, L-arginina en una concentración de 10 a 30 mg/ml, ácido cítrico a una concentración de 0,5 a 4 mg/ml, y ácido fosfórico

a una concentración de 5 a 20 mg/ml. El pH de la solución de preliofilización está en el intervalo de pH 2 a pH 5, específicamente en el intervalo entre pH 4 a pH 5, más específicamente el pH es 4,8. El método de preparación de una formulación liofilizada puede implicar además ajustar el pH a dicho valor deseado, por ejemplo, añadiendo ácido fosfórico y/o hidróxido de sodio.

5 En un aspecto, la formulación liofilizada se proporciona en un vial. Según una realización, el vial es un vial de vidrio moldeado o un vial de vidrio en forma de tubo. Sin embargo, la presente invención no está limitada por formas o diseños de recipientes específicos, siempre y cuando el recipiente sea aceptable para el uso previsto y las normas correspondientes.

10 La formulación liofilizada suele presentarse en un vial que contiene una cantidad específica de trabectedina. Por ejemplo, la cantidad de trabectedina en el vial es de 0,25 mg o 1 mg. Para proporcionar un vial que contenga la formulación liofilizada, la solución de preliofilización se añade al vial y se liofiliza. El volumen de preliofilización añadido al vial está en el intervalo de 1 ml a 5 ml o de 1 a 4 ml.

15 En una realización, el vial contiene 0,25 mg de trabectedina y 17,4 mg de L-arginina y de 0,5 a 4 mg de ácido cítrico, por ejemplo, 1,9 mg de ácido cítrico y de 5 a 20 mg de ácido fosfórico, o de 10 a 15 mg de ácido fosfórico.

20 Proporcionar la formulación liofilizada en un vial permite un transporte y una manipulación sencillos, y una reconstitución sencilla para obtener una formulación que pueda administrarse fácilmente a un paciente que la necesite.

La formulación liofilizada se puede reconstituir y diluir para dar una composición en forma de solución lista para inyección intravenosa.

25 Los términos "reconstituir" o "reconstitución" como se usan en el presente documento se refieren al proceso mediante el cual la formulación liofilizada se convierte a una forma líquida mediante la adición y mezcla con, una solución de reconstitución acuosa farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección, solución de cloruro de sodio o solución de glucosa.

30 La invención descrita en el presente documento proporciona una infusión intravenosa que comprende trabectedina, un aminoácido, un agente tampón y agua para inyección. La invención proporciona además un método para preparar una infusión intravenosa que comprende proporcionar una formulación liofilizada, reconstituir dicha formulación liofilizada en un sistema acuoso, y diluir dicha formulación reconstituida a una concentración adecuada para infusión intravenosa con un medio de infusión acuoso.

35 Las cantidades reales de solución de reconstitución no son características limitantes de las realizaciones de la presente invención. A modo de ilustraciones, pero no como limitaciones, las realizaciones de formulaciones liofilizadas según la presente invención se reconstituyen con un volumen de agua. La mayoría de tales volúmenes no exceden aproximadamente 20 ml, estando los volúmenes preferidos en el intervalo de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 15 ml, o en el intervalo de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 10 ml, o aproximadamente 5 ml. La solución reconstituida en tales realizaciones contiene una concentración de trabectedina de aproximadamente 0,05 mg/ml, aproximadamente 0,1 mg/ml o aproximadamente 0,15 mg/ml.

45 Las soluciones reconstituidas se pueden diluir aún más si así se desea. Esta dilución adicional se puede llevar a cabo con un medio de infusión acuoso que suele ser 0,9 % de cloruro sódico o 5 % de glucosa. La solución reconstituida se diluirá dependiendo de la concentración en la solución reconstituida y la concentración deseada en la solución diluida.

50 En un aspecto, la infusión intravenosa se utiliza en el tratamiento del cáncer. En un aspecto, el cáncer es sarcoma, seleccionado del grupo de leiomiomasarcoma, liposarcoma, osteosarcoma; cáncer ovárico, cáncer de mama, melanoma, cáncer colorrectal, mesotelioma, cáncer de riñón, cáncer de endometrio y cáncer de pulmón, o cualquier combinación de los mismos, y afecciones con una pluralidad de dichas formas de cáncer. Se entiende que "tratamiento" en este contexto se refiere a una acción que conduce a una mejora de la(s) condición(es) del cáncer. También se pueden usar realizaciones de formulaciones según la invención en el tratamiento de afecciones cancerosas refractarias que no han respondido favorablemente a otros tratamientos. En una realización, la infusión intravenosa se utiliza para el

55 tratamiento de pacientes adultos con sarcoma de tejidos blandos avanzado.

La trabectedina se puede utilizar en combinación con otro fármaco. Por ejemplo, se puede administrar con otro fármaco antitumoral. Ejemplos de dichos otros fármacos incluyen doxorubicina, cisplatino, paclitaxel, carboplatino, doxorubicina liposomal pegilada, docetaxel, capecitabina y gemcitabina. Se pueden utilizar fármacos con otros modos de acción, incluyendo dexametasona. La administración del otro fármaco puede ser antes, durante o después de la administración de trabectedina.

60 En otra realización, la infusión intravenosa descrita en el presente documento se utiliza para el tratamiento de pacientes con cáncer de ovarios sensible a platino recidivante, en donde el tratamiento se realiza en combinación con doxorubicina liposomal pegilada (PLD).

5 Específicamente, la infusión intravenosa descrita en el presente documento se administra por vía intravenosa de forma cíclica, por ejemplo, durante de 1 a 20 ciclos. El ciclo incluye una fase de infusión de trabectedina y, normalmente, también una fase de no infusión de trabectedina. Normalmente, el ciclo se resuelve en semanas y, por tanto, el ciclo normalmente comprende una o más semanas de una fase de infusión de trabectedina y una o más semanas para completar el ciclo. Se prefiere un ciclo de 3 semanas, pero, como alternativa, puede ser de 1 a 6 semanas. La fase de infusión puede ser en sí misma una administración única en cada ciclo de, por ejemplo, 1 a 72 h, más habitualmente de aproximadamente 1, 3 o 24 h; o una infusión diaria en la fase de infusión del ciclo durante 1 a 5 h, especialmente 1 o 3 h; o una infusión semanal en la fase de infusión del ciclo durante 1 a 3 h, especialmente 2 o 3 h. Se prefiere una sola administración al inicio de cada ciclo. Específicamente, el tiempo de infusión es de aproximadamente 1, 3 o 24 h.

Los protocolos de dosificación ilustrativos de formulaciones de trabectedina intravenosa se describen, por ejemplo, en el documento W02006046079. Dichos protocolos de dosificación incluyen:

- 15 a) aproximadamente 1,5 mg/m² de área de superficie corporal, administrado como infusión intravenosa durante 24 horas con un intervalo de tres semanas entre ciclos;
 b) aproximadamente 1,3 mg/m² de área de superficie corporal, administrado como infusión intravenosa durante 3 horas con un intervalo de tres semanas entre ciclos;
 20 c) aproximadamente 0,580 mg/m² de área de superficie corporal, administrado semanalmente como infusión intravenosa durante 3 h durante 3 semanas y 1 semana de descanso.

Ejemplos

Los Ejemplos siguientes se exponen para ayudar en la comprensión de la invención, pero no pretenden ser ni deben interpretarse como una limitación del alcance de la invención de ninguna manera. Los Ejemplos no incluyen descripciones detalladas de métodos convencionales, por ejemplo, cuantificación mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplo 1: Variantes de formulaciones

30 Se proporcionaron variantes de formulación para trabectedina como se muestra en la Tabla 1. Se utilizaron diferentes agentes de carga. Por ejemplo, "Arg 0,1 M" se refiere a L-arginina a una concentración de 0,1 mol/l.

Tabla 1: Variantes de formulaciones

N.º	Agente de carga	Tampón	Ajuste de pH	pH
1	Arg 0,1 M, Phe 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,8
2	Arg 0,1 M, Ile 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,8
3	Arg 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	ácido L-aspártico	4,8
4	Arg 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,8
5	Arg 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	3,8
6	Arg 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	3,4
7	Arg 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	3,0
8	Arg 0,1 M, Phe 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	NaOH	3,0
9	Arg 0,1 M, Phe 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	NaOH	3,8

35 Ejemplo 2: Estabilidad a corto plazo de las soluciones de preiofilización

En total, se prepararon 9 soluciones de preiofilización. Las variantes de formulación se combinaron pesando previamente aproximadamente 10 mg de trabectedina en un recipiente de vidrio de 50 ml y añadiendo la cantidad calculada de disolvente para alcanzar una concentración objetivo de trabectedina de 0,25 mg/ml. Las soluciones de preiofilización se mezclaron en un mezclador de rodillos durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente (22 °C). Las soluciones se filtraron usando filtros de jeringa de 0,2 µm (Millipore, membrana Fluorodyne®) y se llenaron (1 ml por vial) en viales de vidrio 10R limpios y despirogenizados.

45 La estabilidad de las formulaciones líquidas de trabectedina (0,25 mg/ml) se probó en un experimento de estabilidad a corto plazo (0h y 24 h) a 2-8 °C y 25 °C. Se observó cierta variación en el contenido de trabectedina mediante análisis RP-HPLC (para los parámetros, consulte la Tabla 4) entre diferentes variantes de formulación, sin embargo, las diferencias entre las muestras estresadas (24 h, a 2-8 °C o 25 °C) y no estresadas (0 h) fueron marginales (véase la Tabla 2). La Tabla 2 muestra los resultados del ensayo de estabilidad de trabectedina. El contenido de trabectedina determinado por RP-HPLC (detección a 285 nm) se da en % de la referencia. La pureza se analiza como el área relativa del pico. Se determinaron las cantidades de las impurezas enumeradas en la Tabla 2. Las cantidades se determinaron como el área relativa del pico en %. La mayoría de las impurezas se detectaron sólo en cantidades marginales (Tabla 2). Se pudo observar una dependencia de la temperatura en la estabilidad de la trabectedina. Las variantes de pH bajo parecían significativamente más estables en comparación con sus equivalentes de pH alto.

55

Tabla 2: Resultados de las pruebas de estabilidad: Contenido de trabectedina e impurezas determinado por HPLC

N.º	Trabectedina		RRT 0,94	RRT 0,73	RRT 1,12	RRT 1,20	RRT 1,43	RRT 1,69	RRT 1,32	RRT 0,27	RRT 0,3	RRT 0,78	RRT 1,42
	% Ensayo	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.	% Área rel.
n.º 10 h	100,6	99,83	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,17	<0,1	0,98	<0,1	<0,1
n.º 1 5 °C 24 h	99,8	99,80	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,20	<0,1	1,10	<0,1	<0,1
n.º 1 25 °C 24 h	100,1	99,57	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,43	<0,1	2,31	<0,1	<0,1
n.º 20 h	97,9	99,89	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,11	<0,1	0,66	<0,1	<0,1
n.º 2 5 °C 24 h	97,3	99,89	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,11	<0,1	0,71	<0,1	<0,1
n.º 2 25 °C 24 h	97,9	99,75	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,25	<0,1	1,44	<0,1	<0,1
n.º 30 h	97,6	99,85	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,15	<0,1	0,89	<0,1	<0,1
n.º 35 °C 24 h	97,3	99,83	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,17	<0,1	0,99	<0,1	<0,1
n.º 3 25 °C 24 h	97,6	99,62	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,38	<0,1	2,22	<0,1	<0,1
n.º 40 h	94,7	99,89	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,11	<0,1	0,66	<0,1	<0,1
n.º 4 5 °C 24 h	94,4	99,88	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,12	<0,1	0,72	<0,1	<0,1
n.º 4 25 °C 24 h	94,9	99,70	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,30	<0,1	1,65	<0,1	<0,1
n.º 8 0 h	100,9	100	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,17	<0,1	<0,1	<0,1
n.º 8 5 °C 24 h	94,6	99,67	<0,1	<0,1	<0,1	0,33	<0,1	<0,1	<0,1	0,16	0,47	<0,1	0,31
n.º 8 25 °C 24 h	95,6	99,29	0,13	0,23	<0,1	0,35	<0,1	<0,1	<0,1	0,3	1,13	<0,1	0,79
n.º 9 0 h	98,0	100	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,47	<0,1	<0,1	<0,1
n.º 9 5 °C 24 h	89,6	98,98	0,17	0,11	<0,1	0,61	<0,1	<0,1	0,13	0,71	2,07	<0,1	1,53
n.º 9 25 °C 24 h	90,9	98,67	0,19	0,21	<0,1	0,66	<0,1	<0,1	0,28	1,36	3,06	<0,1	2,35

Ejemplo 3 - Liofilización

- 5 Los viales llenos se taparon en posición de liofilización, se cargaron en bandejas de acero inoxidable y se envolvieron en bolsas LyoProtect® (bolsas con membrana de PTFE permeable al vapor, para evitar la contaminación del liofilizador). Se usaron dos liofilizadores piloto (Hof Sonderanlagenbau, Lohra, Alemania) (GT2, 0,36 m² de área de almacenamiento y GF3, 0,25 m² de área de almacenamiento). Ya que se liofilizaron varias variantes de formulación diferentes en una carrera de liofilización (carrera 1: variantes de formulación n.º1-n.º4, carrera 2: variantes de formulación n.º8-n.º9), se seleccionaron parámetros de liofilización conservadores genéricos (Tabla 3).
- 10

Tabla 3: Parámetros de viabilidad de la liofilización

Etapa		Temperatura de almacenamiento	Temperatura del condensador de hielo	Presión	Etapa de tiempo
	Descripción	[°C]	[°C]	[mbar]	[h:min]
1	Carga	20	-	1000	00:01
2	Rampa de congelación	-45	-	1000	01:05
3	Congelación	-45	-	1000	01:00
4	Rampa de hibridación	-20	-	1000	00:25
5	Hibridación	-20	-	1000	02:00
6	Rampa de congelación	-45	-	1000	00:25
7	Congelación	-45	-	1000	02:00
8	Ajuste de vacío	-45	-70	0,05	00:30
9	Rampa de secado primario	-10	-70	0,05	01:00
10	Secado primario	-10	-70	0,05	xx:xx*
11	Secado secundario	30	-70	0,05	04:00
12	Secado secundario	30	-70	0,05	10:00

* El secado primario se realizó durante la noche sin la asistencia del operador. Los tiempos de secado registrados oscilaron entre 14 y 16 horas. Cabe señalar que, para fines de desarrollo del proceso, probablemente sería suficiente un tiempo mucho más corto para el secado primario.

Todas las variantes de formulación eran adecuadas para la liofilización. La mayoría de las variantes mostraron algún aumento en las impurezas (especialmente RRT 1,32 (A285 nm) durante la liofilización, indicando una sensibilidad a la trabectedina.

Para diferenciar aún más las variantes de formulación, la estabilidad de las muestras liofilizadas de todas las variantes de formulación n.º1-4 y n.º 8-9 se evaluó en un estudio de estabilidad acelerada.

Ejemplo 4: Estudio de estabilidad a corto plazo de muestras liofilizadas

Las muestras obtenidas en la liofilización de viabilidad se sometieron a pruebas de estabilidad a tres temperaturas: 2-8 °C, 25 °C y 40 °C. Las muestras se analizaron inmediatamente después de la liofilización (TO), después de un mes (T1), dos meses (T2), tres meses (T3) y después de 6 meses (T6) de período de almacenamiento con respecto a la apariencia visual, la velocidad de reconstitución, el perfil de degradación por RP-HPLC y el contenido de agua residual usando un método genérico de horno Karl Fischer (solo TO).

Se almacenaron y analizaron muestras de cada variante de formulación. Todas las variantes de formulación formaron tortas sólidas que permanecieron visualmente estables durante el período de prueba. La reconstitución en 1 ml de agua para inyección fue rápida y espontánea en 10 segundos para todas las variantes en todos los momentos.

Contenido y pureza de los liofilizados

Los liofilizados reconstituidos se analizaron mediante RP-HPLC (para los parámetros, consulte la Tabla 4), para determinar el contenido de trabectedina y el perfil de impurezas. Los resultados del almacenamiento a 2-8 °C se resumen en las Figuras 2 y 3.

Tabla 4: Parámetros para mediciones de HPLC

Parámetro	Valor
Temperatura de la columna	15 °C
Temperatura del muestreador	5 °C
Longitud de onda	DAD: 285 nm, 255 nm*
Flujo de la bomba	1,2 ml/min
Tiempo de ejecución	60 min
Columna	Fenilo 250 x 4,6 mm; 5 µm; 80 Å (ZORBAX SB-Phenyl, Agilent - límite de presión 400 bar)
Tampón A	A: 1 g de formiato de amonio + 1 ml de ácido fórmico en 1 litro de agua
Tampón B	B: AcN
Gradiente	0 min: 85 % de A 15 % de B 30 min: 73 % de A 27 % de B 50 min: 35 % de A 65 % de B 52 min: 85 % de A 15 % de B 60 min: 85 % de A 15 % de B

(continuación)

Parámetro	Valor
Volumen de inyección	20 µl
Concentración de patrón/muestra	0,25 mg/ml
Diluyente	Metanol

5 La formulación con L-arginina en ácido cítrico que comprende H₃PO₄ para ajustar el pH a 4,8 (formulación n.º 4, véase la Tabla 1 y la Tabla 5) muestra muy buenos resultados de estabilidad, incluso a una temperatura de almacenamiento de 40 °C.

Tabla 5: Composición de la formulación n.º 4 (L-arginina 100 mM)

Componente	Función	Cantidad en mg/vía
Trabectedina	Principio activo	0,25
Ácido cítrico	Agente tampón	1,92
L-arginina	Agente de carga	17,42
Ácido fosfórico (85 % p/p en agua)	Agente tampón/ajuste de pH	Dependiendo del pH deseado, por ejemplo, se requieren de 10 a 15 mg para alcanzar el pH 3
NaOH	Agente tampón/ajuste de pH	Dependiente del pH deseado; utilizado para la corrección del pH

Ejemplo 5: Estudios de estabilidad de 3 meses

10 Se prepararon tres variantes de formulación diferentes (arginina-fosfato pH 3,0, pH 3,4 y pH 3,8, véase la Tabla 1 y 5), se liofilizaron y se analizaron en cuanto a ensayo y perfil de impurezas a lo largo del tiempo.

Detalles experimentales

15 Para los estudios de estabilidad, las muestras liofilizadas de variantes de formulación de trabectedina se almacenaron a 2-8 °C, 25 °C y 30 °C. Las soluciones de placebo sin trabectedina se almacenaron a 25 °C y se utilizan como muestras de referencia para el análisis de HPLC. Los puntos de tiempo del análisis son después de 1 mes, 3 meses (véanse las Tablas 6 y 7).

Tabla 6: Impurezas detectadas a 285 nm después de 3 meses de almacenamiento a 2-8 °C

Impurezas	N.º7 (Arg pH 3,0)	N.º6 (Arg pH 3,4)	N.º5 (Arg pH 3,8)
RRT 0,12 [%]	0,16	0,29	0,36
RRT 1,16 [%]	0,23	0,46	0,49
RRT 1,28 [%]	0,10	0,15	0,16
RRT 0,73 [%]	0,11	0,12	0,15

Tabla 7: Impurezas detectadas a 285 nm después de 3 meses de almacenamiento a 25 °C

Impurezas	N.º7 (Arg pH 3,0)	N.º6 (Arg pH 3,4)	N.º5 (Arg pH 3,8)
RRT 0,12 [%]	0,42	0,52	0,60
RRT 1,16 [%]	0,22	0,42	0,47
RRT 1,28 [%]	0,12	0,19	0,20
RRT 0,73 [%]	0,64	0,44	0,48

Ejemplo 6: Estudios de estabilidad de 6 mesesComposición de la solución de liofilización

25 Se prepararon 12 variantes de formulación diferentes (véase la Tabla 8), se liofilizaron y se analizaron en cuanto al contenido de trabectedina y el perfil de pureza a lo largo del tiempo. Cada formulación contiene 0,25 mg/ml de trabectedina antes de la liofilización.

Tabla 8: Variantes de formulaciones

N.º	Agente de carga	Tampón	Ajuste de pH	pH
1	Arg 0,1 M	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,0
2	Arg 0,1 M 35 mg de manitol (p/p)	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,0
3	Arg 0,1 M	acetato de sodio 10 mM	H ₃ PO ₄	4,0

(continuación)

N.º	Agente de carga	Tampón	Ajuste de pH	pH
4	L-acetil cisteína 0.1 M	ácido cítrico 10 mM	NaOH	4,0
5	Arg 0,1 M 0,2 % (p/V) de ácido L-ascórbico	ácido cítrico 10 mM	NaOH	4,0
6	Valina 0.1 M	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,0
7	L-ácido aspártico 0,1 M	-	lisina	4,0
8	L-citrulina 0.1 M	ácido cítrico 10 mM	NaOH	4,0
9	Arg 0,1 M monotioglicerol 10 mM	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,0
10	Arg 0,1 M 0,2 % (p/V) de L-metionina	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,0
11	Arg 0,1 M 0,2 % (p/V) de Tween 20	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,0
12	Arg 0,1 M 0,1 % (p/V) de EDTA	ácido cítrico 10 mM	H ₃ PO ₄	4,0

5 Las variantes de formulación seleccionadas se combinaron pesando previamente aproximadamente 12,5 mg de trabectedina en un vial de vidrio de 50 ml y añadiendo la cantidad calculada de disolvente para alcanzar una concentración objetivo de trabectedina de 0,25 mg/ml.

10 Cada una de las 12 variantes de formulación (tampón libre de API) se preparó pesando individualmente las sustancias correspondientes en un vaso de precipitados, disolución en el 90 % del volumen designado de agua purificada, ajuste de pH con solución de hidróxido de sodio (30 %) o solución de ácido clorhídrico (25 %) para la variante n.º 7, y ácido ortofosfórico (85 %) para otras variantes, y posterior adición de agua purificada al volumen final. Luego se añadió la cantidad calculada de disolvente (tampón) a la trabectedina previamente pesada en un vial de vidrio de 50 ml para alcanzar una concentración objetivo de trabectedina de 0,25 mg/ml. El volumen del tampón para la dilución se ha adaptado a las masas pesadas reales de 0,25 mg/ml para cada variante.

15 La solución se agitó en un agitador magnético durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente (22 °C) hasta su completa disolución. La solución lio se filtró usando filtros de jeringa de 0,2 µm (Millipore, membrana Fluorodyne®) y se rellenó (1 ml por vial) en viales de vidrio 10R limpios y despirogenizados.

Liofilización

20 Los viales llenos se taparon parcialmente en posición de liofilización, se cargaron en bandejas de acero inoxidable y se envolvieron y sellaron en bolsas LyoProtect® (bolsas con membrana de PTFE permeable al vapor, para evitar la contaminación del liofilizador). Los viales se cargaron en un liofilizador y se liofilizaron.

25 Después de la liofilización, los viales se ventilaron a 75 kPa (750 mbar) con nitrógeno y se cerraron los viales. Después de la descarga, los viales se sellaron y se descontaminaron con isopropanol al 70 %/agua.

Almacenamiento

30 Las muestras liofilizadas se almacenaron a 25 °C durante hasta seis meses y se analizaron inmediatamente después de la liofilización (TO), después de un período de almacenamiento de un mes (T1m), tres meses (T3m) y 6 meses (T6m) con respecto a

35 aspecto visual,
comportamiento de reconstitución;
claridad de la solución (turbidez nefelométrica);
medición del pH después de la reconstitución;
perfil de degradación por RP-HPLC; y
40 contenido de agua residual utilizando un método genérico de horno Karl Fischer (sólo TO).

Reconstitución

45 Se retiraron los tapones de los viales y los liofilizados se reconstituyeron con 5,0 ml de agua purificada usando una pipeta; se monitorizó la velocidad de reconstitución y el comportamiento.

Análisis del contenido de agua residual mediante el método genérico del horno Karl-Fischer

50 La humedad residual de las muestras se determinó mediante valoración Karl Fischer utilizando un coulómetro Karl Fischer 756 equipado con un procesador de muestras de horno 774 (Metrohm).

5 Para cada medida, se transfirió un liofilizado de cada muestra (≈ 20-50 mg) en un vial de Karl-Fischer. Se documentó el peso exacto. El vial se selló con una tapa de engarce y se transfirió al horno del coulómetro Karl Fischer que se calentó a 110 °C. Se atravesó el tabique de la tapa de engarzado con una aguja de inyección y el vapor de agua generado se transfirió directamente a la cámara de titulación mediante nitrógeno seco. Se utilizaron viales de vidrio vacíos como blanco de corrección. Las muestras se analizaron por duplicado.

Medición del pH

10 El pH de las muestras se midió directamente en el vial después de la reconstitución (5 ml de agua purificada) utilizando un pHmetro común.
 medidor de pH: SevenMulti, Mettler Toledo con micro electrodo.
 El pH-metro fue calibrado antes de su uso a pH 4,0, pH 7,0 y pH 9,0.

Contenido y pureza por RP-HPLC

15 La RP-HPLC se realizó según la Tabla 4.

20 La detección de impurezas se realizó con dos longitudes de onda de detector diferentes (285 nm y 255 nm) para cubrir todas las impurezas posibles. Se observó que algunas impurezas mostraron mayor absorción en una de las longitudes de onda que en la otra. Por lo tanto, el enfoque de evaluación en dos longitudes de onda diferentes permite una cobertura completa de todas las impurezas relevantes.

Preparación de muestras:

25 Para el análisis por RP-HPLC, el liofilizado se reconstituyó con 1 ml de agua purificada. No fue necesaria ninguna dilución adicional de la muestra para el análisis por HPLC.

Contenido y pureza de los liofilizados

30 Los liofilizados reconstituidos se analizaron mediante RP-HPLC para determinar el contenido de trabectedina y el perfil de pureza. Los resultados se resumieron en la Figura 13 y la Figura 14. La figura 13 muestra el contenido de trabectedina en T0, T1m, T3m y T6m, medido por RP-HPLC en % de la referencia. Todas las muestras muestran un contenido de trabectedina estable a lo largo del tiempo. La figura 14 muestra la pureza de las muestras como área relativa del pico de trabectedina analizada mediante RP-HPLC. Todas las muestras muestran un perfil de alta pureza a lo largo del tiempo.

Perfil de impurezas de las muestras

40 Las muestras se almacenaron a 25 °C y se analizaron después de 1, 3 y 6 meses. Se consideran 25 °C las condiciones de prueba aceleradas que permiten la evaluación de la estabilidad de las formulaciones. Lo más probable es que las condiciones de almacenamiento a largo plazo sean el almacenamiento refrigerado (entre 2-8 °C).

Se analizaron las impurezas de las muestras y los resultados se presentan en las siguientes tablas.

45 **Tabla 9 - Perfil de impurezas de n.º 1 (Arg 0,1 M, ácido cítrico 10 mM, H₃PO₄)**

Impurezas a 285 nm	Área relativa del pico de la impureza [%]			
	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,11	<0,1	<0,1	<0,1	0,11
RRT 0,12	<0,1	<0,1	0,43	0,51
Et-701	<0,1	0,13	0,26	0,27
Et-759B	<0,1	<0,1	<0,1	0,10
RRT 1,24	<0,1	<0,1	<0,1	0,15
RRT 1,35	<0,1	<0,1	0,26	0,11
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,40
TOTAL 285 nm	0,00	0,13	0,95	1,65
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	0,18	0,39	1,08	0,42
RRT 0,31	0,30	0,36	1,10	0,35
RRT 0,76	0,13	0,30	0,89	0,36
RRT 1,38	<0,1	0,34	1,24	0,27
RRT 1,46	<0,1	0,19	<0,1	0,49
RRT 1,65	<0,1	0,23	<0,1	0,64
255nm de TOTAL	0,61	1,81	4,31	2,53

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

Tabla 10 - Perfil de impurezas de n.º 2 (Arg 0,1 M, 35 mg/ml de manitol, ácido cítrico 10 mM, H₃PO₄)

Impurezas a 285 nm	Área relativa del pico de la impureza [%]			
	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,11	<0,1	<0,1	<0,1	0,13
RRT 0,12	<0,1	<0,1	1,14	1,26
RRT 0,17	<0,1	<0,1	0,23	0,17
RRT 0,40	<0,1	<0,1	0,13	0,10
RRT 0,43	<0,1	<0,1	<0,1	0,14
RRT 0,45	<0,1	0,17	0,19	0,12
Et-701	0,16	0,67	0,68	0,94
Et-745	<0,1	0,28	0,84	0,70
RRT 1,24	<0,1	1,14	2,26	3,27
RRT 1,35	<0,1	<0,1	<0,1	0,15
Et-759A	<0,1	0,26	0,44	0,33
RRT 1,51	<0,1	<0,1	<0,1	0,13
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,36
TOTAL	0,16	2,52	5,91	7,80
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	0,20	1,28	2,84	2,84
RRT 0,31	0,35	0,53	1,31	0,58
RRT 0,76	0,14	0,62	1,08	0,74
RRT 1,23	<0,1	0,25	0,48	0,98
RRT 1,38	<0,1	0,53	1,97	1,69
RRT 1,46	<0,1	0,11	0,16	0,29
RRT 1,57	<0,1	<0,1	<0,1	0,15
RRT 1,65	<0,1	<0,1	<0,1	0,31
RRT 1,69	<0,1	0,11	<0,1	0,31
TOTAL	0,69	3,43	7,84	7,89

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

5

Tabla 11 - Perfil de impurezas de n.º 3 (Arg 0,1 M, acetato de sodio 10 mM, H₃PO₄)

Impurezas a 285 nm	Área relativa del pico de la impureza [%]			
	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,11	<0,1	<0,1	<0,1	0,13
RRT 0,12	<0,1	<0,1	0,45	0,53
Et-701	<0,1	0,14	0,31	0,38
RRT 1,24	<0,1	<0,1	0,27	0,16
RRT 1,66	<0,1	<0,1	<0,1	0,10
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,36
TOTAL	0,00	0,14	1,03	1,66
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	0,29	0,64	1,01	0,58
RRT 0,31	0,32	0,53	1,14	0,44
RRT 0,76	0,21	0,49	0,81	0,45
RRT 1,38	0,16	0,71	1,05	0,43
RRT 1,46	<0,1	<0,1	<0,1	0,27
RRT 1,57	<0,1	<0,1	<0,1	0,11
RRT 1,65	<0,1	<0,1	<0,1	0,52
RRT 1,69	<0,1	<0,1	<0,1	0,23
TOTAL	0,98	2,37	4,01	3,03

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

10 Tabla 12 - Perfil de impurezas de n.º 4 (L-acetil cisteína 0,1 M, ácido cítrico 10 mM, NaOH)

Impurezas a 285 nm	Área relativa del pico de la impureza [%]			
	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,08	<0,1	<0,1	<0,1	2,40
RRT 0,11	<0,1	<0,1	0,29	0,44
RRT 0,12	<0,1	<0,1	<0,1	0,40
RRT 0,55	<0,1	<0,1	0,17	<0,1
Et-701	0,14	0,45	0,51	0,87

ES 2 981 253 T3

(continuación)

	Área relativa del pico de la impureza [%]			
RRT 0,96	0,84	0,80	0,82	0,69
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,35
TOTAL	0,98	1,25	1,79	5,15
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,31	<0,1	0,18	0,32	<0,1
RRT 1,57	<0,1	<0,1	<0,1	0,18
RRT 1,69	<0,1	<0,1	<0,1	0,11
TOTAL	0,00	0,18	0,32	0,29

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

5 Tabla 13 - Perfil de impurezas de n.º 5 (Arg 0,1 M, ácido L-ascórbico al 0,2 % (p/V), ácido cítrico 10 mM, NaOH)

	Área relativa del pico de la impureza [%]			
Impurezas a 235 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,10	<0,1	<0,1	<0,1	0,76
RRT 0,11	<0,1	<0,1	0,24	0,66
RRT 0,12	<0,1	<0,1	0,18	0,25
RRT 0,15	<0,1	<0,1	<0,1	0,26
RRT 0,45	<0,1	0,18	0,22	0,21
Et-701	<0,1	0,19	0,32	0,32
RRT 0,85	<0,1	<0,1	0,10	<0,1
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,31
TOTAL	0,00	0,37	1,06	2,77
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	0,20	0,29	0,42	0,35
RRT 0,76	0,12	0,18	0,30	0,22
RRT 1,46	<0,1	<0,1	<0,1	0,11
RRT 1,57	<0,1	<0,1	<0,1	0,12
RRT 1,65	<0,1	<0,1	0,22	0,45
TOTAL	0,32	0,47	0,94	1,25

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

Tabla 14 - Perfil de impurezas de n.º 6 (Valina 0,1 M, ácido cítrico 10 mM, H₃PO₄)

	Área relativa del pico de la impureza [%]			
Impurezas a 235 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,11	<0,1	<0,1	<0,1	0,10
RRT 0,12	<0,1	<0,1	1,62	2,31
RRT 0,43	<0,1	<0,1	<0,1	0,14
RRT 0,45	<0,1	0,32	0,11	0,24
Et-701	0,13	0,65	0,25	0,45
RRT 0,77	<0,1	0,32	1,12	0,92
RRT 0,92	<0,1	<0,1	<0,1	0,13
Et-745	<0,1	0,39	0,17	0,28
Et-759B	<0,1	<0,1	0,43	0,18
RRT 1,24	<0,1	<0,1	0,27	0,20
RRT 1,35	<0,1	<0,1	0,13	0,32
Et-759A	<0,1	0,37	<0,1	0,19
RRT 1,51	<0,1	<0,1	<0,1	0,21
RRT 1,66	<0,1	<0,1	<0,1	0,10
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,33
TOTAL	0,13	2,05	4,10	6,10
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,22	<0,1	<0,1	0,31	0,32
RRT 0,27	0,76	3,85	9,56	10,94
RRT 0,31	<0,1	0,47	1,09	0,44
RRT 0,76	0,59	2,91	6,07	7,84
RRT 1,38	<0,1	0,27	0,55	0,17
RRT 1,46	<0,1	<0,1	<0,1	0,42
RRT 1,52	<0,1	<0,1	<0,1	0,73
RRT 1,65	<0,1	0,12	0,25	0,62

ES 2 981 253 T3

(continuación)

	Área relativa del pico de la impureza [%]			
RRT 1,69	<0,1	0,22	<0,1	0,37
TOTAL	1,35	7,84	17,83	21,85

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

5 Tabla 15 - Perfil de impurezas de n.º7 (ácido L-aspártico 0,1 M, lisina)

	Área relativa del pico de la impureza [%]			
Impurezas a 285 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,12	<0,1	<0,1	0,99	1,16
RRT 0,17	<0,1	<0,1	0,15	0,17
RRT 0,43	<0,1	<0,1	<0,1	0,11
RRT 0,70	<0,1	<0,1	0,11	0,11
Et-701	<0,1	0,64	0,95	1,44
RRT 0,90	<0,1	0,15	0,18	0,29
RRT 0,96	<0,1	0,10	0,13	0,14
Et-745	0,27	0,78	0,93	1,15
Et-759B	0,34	0,63	0,68	0,58
RRT 1,24	<0,1	<0,1	0,31	0,19
Et-759A	<0,1	0,39	0,48	0,68
RRT 1,59	<0,1	<0,1	<0,1	0,12
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,25
TOTAL	0,61	2,69	4,91	6,39
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	0,26	1,24	3,73	4,02
RRT 0,31	0,30	0,43	1,63	1,08
RRT 0,43	<0,1	<0,1	<0,1	0,12
RRT 0,76	0,24	1,06	3,32	3,22
RRT 1,31	<0,1	<0,1	<0,1	0,19
RRT 1,38	<0,1	0,28	0,88	0,56
RRT 1,46	0,16	0,23	<0,1	0,13
RRT 1,52	<0,1	<0,1	<0,1	0,30
RRT 1,65	<0,1	0,14	<0,1	0,23
RRT 1,69	<0,1	0,28	0,81	1,52
TOTAL	0,96	3,66	10,37	11,37

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

Tabla 16 - Perfil de impurezas de n.º 8 (L-citrulina 0,1 M, ácido cítrico 10 mM, NaOH)

	Área relativa del pico de impureza [%]			
impurezas a 285 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,12	<0,1	<0,1	0,45	0,52
Et-701	<0,1	0,10	0,16	0,20
Et-759B	0,17	0,21	0,42	0,23
RRT 1,24	<0,1	<0,1	0,30	0,20
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,25
TOTAL	0,17	0,31	1,33	1,40
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	0,32	0,93	1,90	1,97
RRT 0,31	0,66	0,63	1,63	1,04
RRT 0,76	0,28	0,75	1,42	1,38
RRT 1,38	<0,1	0,12	0,80	0,31
RRT 1,46	<0,1	0,29	<0,1	0,24
RRT 1,65	<0,1	0,11	0,11	0,27
RRT 1,69	<0,1	<0,1	<0,1	0,43
TOTAL	1,26	2,83	5,86	5,64

10

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

ES 2 981 253 T3

Tabla 17 - Perfil de impurezas de n.º 9 (Arg 0,1 M, monotioglicerol 10 mM, ácido cítrico 10 mM, H₃PO₄)

Impurezas a 285 nm	Área relativa del pico de impureza			[%]
	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,12	<0,1	<0,1	<0,1	0,10
Et-701	<0,1	0,19	0,25	0,44
RRT 0,85	0,25	0,26	0,28	0,29
Et-759A	<0,1	<0,1	<0,1	0,12
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,27
TOTAL	0,25	0,45	0,53	1,22
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	<0,1	<0,1	0,15	0,10
RRT 0,31	0,13	0,13	0,24	0,16
RRT 1,52	<0,1	<0,1	<0,1	0,23
RRT 1,65	<0,1	<0,1	<0,1	0,15
RRT 1,69	<0,1	<0,1	<0,1	0,15
TOTAL	0,13	0,13	0,39	0,79

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

5 Tabla 18 - Perfil de impurezas de n.º10 (Arg 0,1 M, L-metionina al 0,2 % (p/V), ácido cítrico 10 mM, H₃PO₄)

Impurezas a 285 nm	Área relativa del pico de impureza			[%]
	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,12	<0,1	<0,1	0,53	0,59
Et-701	<0,1	0,12	0,24	0,26
Et-759B	<0,1	<0,1	0,27	0,12
RRT 1,24	<0,1	<0,1	0,25	0,18
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,26
TOTAL	0,00	0,12	1,29	1,41
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	0,31	0,53	1,40	1,31
RRT 0,31	0,32	0,20	0,90	0,56
RRT 0,76	0,22	0,34	1,13	0,99
RRT 1,38	<0,1	0,25	1,05	0,59
RRT 1,52	<0,1	<0,1	<0,1	0,20
RRT 1,65	<0,1	0,30	0,21	0,51
TOTAL	0,85	1,62	4,69	4,16

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

Tabla 19 - Perfil de impurezas de n.º11 (Arg 0,1 M, Tween 20 al 0,2 % (p/V), ácido cítrico 10 mM, H₃PO₄)

Impurezas a 285 nm	Área relativa del pico de impureza			[%]
	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,12	<0,1	<0,1	0,44	0,43
Et-701	<0,1	0,13	0,26	0,31
RRT 0,90	<0,1	<0,1	<0,1	0,12
Et-745	<0,1	0,18	0,52	1,00
RRT 1,20	<0,1	<0,1	<0,1	0,10
Et-759B	<0,1	<0,1	0,18	<0,1
RRT 1,24	<0,1	<0,1	0,26	0,17
RRT 1,31	<0,1	<0,1	<0,1	0,25
RRT 1,35	<0,1	<0,1	<0,1	0,14
Et-759A	<0,1	0,15	0,43	0,88
RRT 1,51	<0,1	<0,1	<0,1	0,10
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,26
TOTAL	0,00	0,46	2,09	3,76
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m
RRT 0,27	0,20	0,71	1,92	1,94
RRT 0,31	0,50	0,59	1,21	0,93
RRT 0,43	<0,1	<0,1	0,11	0,19
RRT 0,76	0,16	0,58	1,51	1,46
RRT 1,38	<0,1	0,16	0,44	0,19
RRT 1,52	<0,1	<0,1	<0,1	0,30
RRT 1,65	<0,1	0,39	0,25	0,53

ES 2 981 253 T3

(continuación)

	Área relativa del pico de impureza			[%]
RRT 1,69	<0,1	<0,1	0,22	0,24
TOTAL	0,86	2,43	5,66	5,78

Se indican las medias de dos inyecciones si >0,1 %

5 **Tabla 20 - Perfil de impurezas de n.º12 (Arg 0,1 M, EDTA al 0,1 % (p/V), ácido cítrico 10 mM, H₃PO₄)**

	Área relativa del pico de impureza				[%]
Impurezas a 285 nm	T0	T1m	T3m	T6m	
RRT 0,12	<0,1	<0,1	0,44	0,45	
Et-701	<0,1	0,23	0,29	0,37	
Et-759B	<0,1	<0,1	0,21	<0,1	
RRT 1,24	<0,1	<0,1	0,26	0,18	
RRT 1,84	<0,1	<0,1	<0,1	0,28	
TOTAL	0,00	0,23	1,20	1,28	
Impurezas a 255 nm	T0	T1m	T3m	T6m	
RRT 0,27	0,33	0,31	1,13	0,98	
RRT 0,31	0,37	0,38	1,10	0,65	
RRT 0,76	0,24	0,24	0,90	0,72	
RRT 1,38	0,12	0,23	1,06	0,58	
RRT 1,52	<0,1	<0,1	<0,1	0,23	
RRT 1,65	<0,1	0,22	0,16	0,38	
RRT 1,69	<0,1	<0,1	0,23	0,26	
TOTAL	1,06	1,38	4,58	3,80	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende trabectedina y un aminoácido, en donde la relación en peso (p/p) entre trabectedina y aminoácido es de 1:50 a 1:100; y en donde dicho aminoácido es L-arginina.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la relación en peso (p/p) entre trabectedina y aminoácido es de aproximadamente 1:70, y en donde dicho aminoácido es L-arginina.
- 10 3. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende además un agente tampón, en donde el agente tampón se selecciona entre el grupo que consiste en ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido acético, aminoácido básico e hidróxido de sodio, o cualquier mezcla de los mismos, o una mezcla de ácido cítrico, ácido fosfórico y opcionalmente un aminoácido básico.
- 15 4. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende sustancias adicionales seleccionadas entre el grupo que comprende un agente de formación de complejos tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); un antioxidante tal como monotioglicerol; un agente tensioactivo tal como polisorbato; y ácido ascórbico.
- 20 5. Una formulación liofilizada que comprende trabectedina y un aminoácido, en donde la relación en peso (p/p) entre trabectedina y el aminoácido es de 1:50 a 1:100, y en donde dicho aminoácido es L-arginina.
6. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la relación en peso (p/p) entre trabectedina y aminoácido es de aproximadamente 1:70, y en donde dicho aminoácido es L-arginina.
- 25 7. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde dicha composición comprende además un agente tampón, en donde el agente tampón se selecciona entre el grupo que consiste en ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido acético, aminoácido básico e hidróxido de sodio, o cualquier mezcla de los mismos, o una mezcla de ácido cítrico, ácido fosfórico y opcionalmente un aminoácido básico.
- 30 8. La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde dicha composición comprende sustancias adicionales seleccionadas entre el grupo que comprende un agente de formación de complejos tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); un antioxidante tal como monotioglicerol; un agente tensioactivo tal como polisorbato; y ácido ascórbico.
- 35 9. La formulación liofilizada de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho agente tampón es ácido cítrico o ácido fosfórico, o una mezcla de los mismos.
- 40 10. La formulación liofilizada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en donde la formulación se proporciona en un vial, en donde dicho vial contiene de 0,1 a 1 mg de trabectedina, de 10 a 60 mg de L-arginina, de 0,5 a 8 mg de ácido cítrico, de 5 a 40 mg de ácido fosfórico, preferentemente dicho vial contiene 0,25 mg de trabectedina, 17,4 mg de L-arginina, 1,9 mg de ácido cítrico y de 10 a 15 mg de ácido fosfórico.
- 45 11. Una solución para perfusión intravenosa que comprende trabectedina, un aminoácido, un agente tampón y agua para inyección, en donde la relación en peso (p/p) entre trabectedina y el aminoácido es de 1:50 a 1:100, y en donde dicho aminoácido es L-arginina.
- 50 12. La solución para infusión intravenosa de la reivindicación 11 para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde dicho cáncer es sarcoma, seleccionado del grupo de leiomiomasarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer de mama, melanoma, cáncer colorrectal, mesotelioma, cáncer de riñón, cáncer de endometrio y cáncer de pulmón, o cualquier combinación de los mismos.

Fig. 1

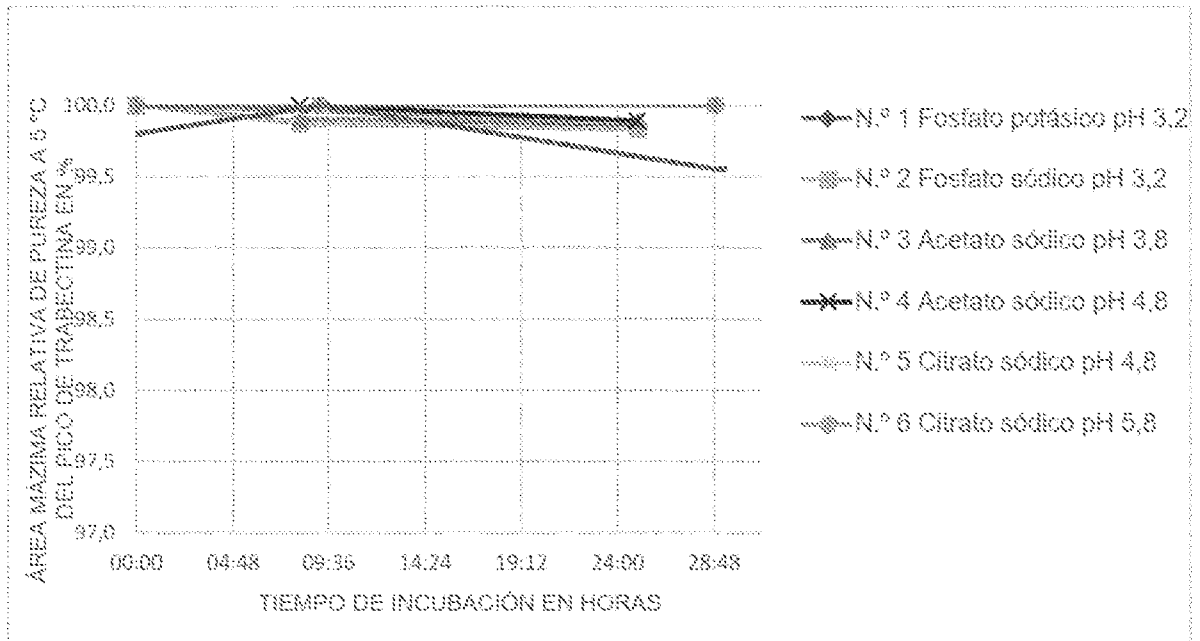
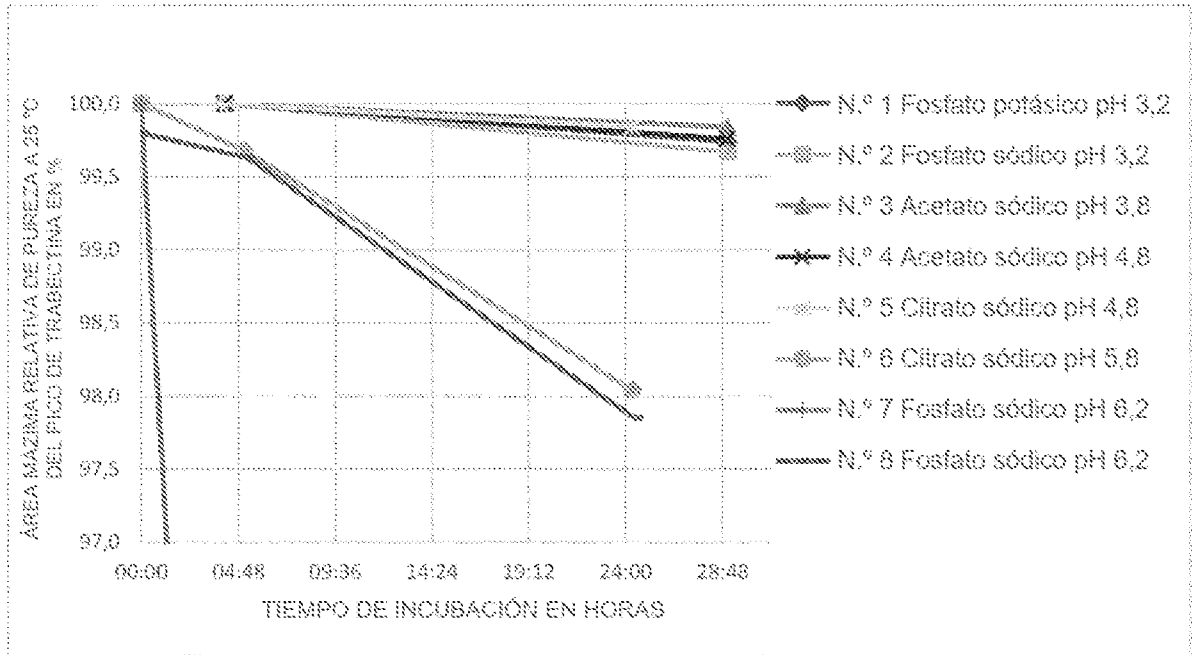


Fig. 2

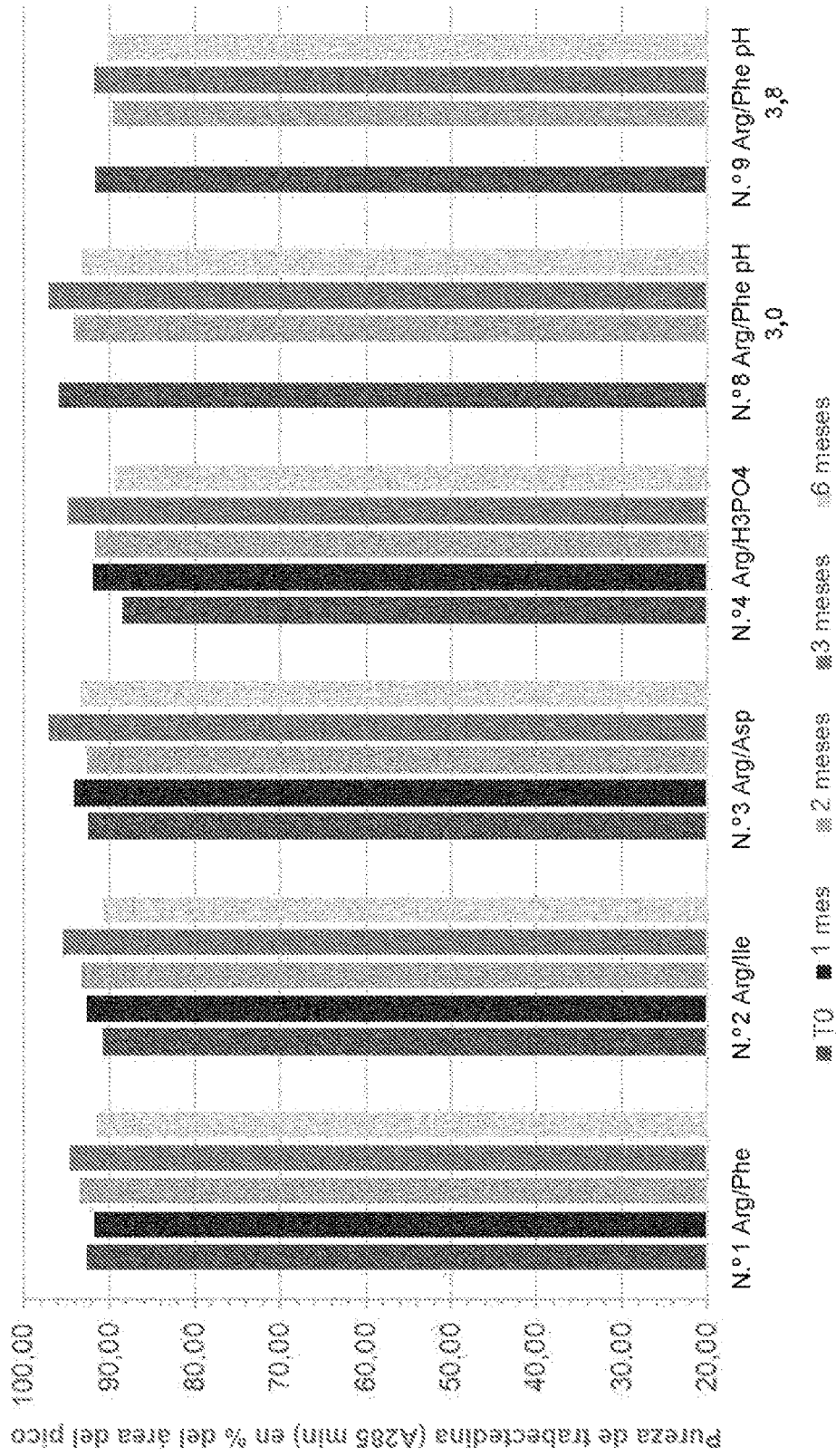


Fig. 3

