



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA DE  
FORMULACIONES PARENTERALES CONTENIENDO ALBENDAZOL

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. JOSÉ GUADALUPE BECERRIL VEGA

TUTOR PRINCIPAL:  
Dra. HELGI HELENE JUNG COOK  
FACULTAD DE QUIMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN  
FARMACOCINÉTICA DE FORMULACIONES PARENTERALES  
CONTENIENDO ALBENDAZOL**

**T E S I S  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. JOSÉ GUADALUPE BECERRIL VEGA**

**DRA. HELGI HELENE JUNG COOK  
FACULTAD DE QUÍMICA**



Ciudad de México, Octubre 2023

**JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
<b>VOCAL</b>	Dr. Francisco Hernández Luis
<b>VOCAL</b>	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
<b>VOCAL</b>	Dra. Inés Fuentes Noriega
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Elizabeth Piñón Segundo

**Tutora**



---

Dra. Helgi Helene Jung Cook

**Sustentante**



---

M. en C. José Guadalupe Becerril Vega

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por brindarme todas las herramientas necesarias para mi formación profesional.

A mi tutora, la Dra. Helgi Jung Cook por su paciencia y dedicación, por compartir sus conocimientos conmigo y haberme apoyado en cada paso. Le agradezco también su persistencia y motivación, las cuales han sido una parte fundamental de mi formación como investigador.

A CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado con número de CVU 589367. Asimismo, a la DGAPA-PAPIIT por el apoyo en el desarrollo del proyecto IN206122.

A los miembros del comité tutor Dr. Rafael Castillo Bocanegra y Dr. Ricardo Reyes Chilpa quienes me aconsejaron y enriquecieron el proyecto durante todo el desarrollo del mismo. Les agradezco también por permitirme usar sus espacios para realizar algunas de las actividades experimentales para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Alicia Hernández y el Dr. Miguel Flores por su asesoría y apoyo técnico durante la síntesis y caracterización del profármaco. Al Dr. Gerardo Leyva por su apoyo técnico para el desarrollo de la formulación con cosolventes.

A la M. en C. Lourdes Mayet y la Dra. Iliana González por la asesoría a cada paso del desarrollo de esta tesis, por sus buenos consejos y sus valiosas observaciones para enriquecer y mejorar los trabajos escritos.

Al personal de la UNIPREC de la Facultad de Química, por su ayuda en el manejo y cuidado de los animales durante el estudio de farmacocinética. En especial a la M. en C. Marisol Rivera Huerta y la M. en C. Lucía Macías Rosales.

A los miembros de mi jurado, el Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Francisco Hernández Luis, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, Dra. Inés Fuentes Noriega y Dra. Elizabeth Piñón Segundo, por todos sus comentarios que ayudaron a enriquecer y mejorar esta tesis.

A mis padres y hermanos por todo el apoyo que me han brindado para que pudiera lograr mis metas. Gracias por siempre estar y demostrarme su cariño.

A mis amigos del laboratorio 112, Sergio Soto, Williams Hernández y Angélica Sánchez, por haber compartido tantos momentos conmigo. Por aquellas pláticas y discusiones para mejorar siempre nuestros proyectos y por todo el apoyo que me brindaron.

A mi gran compañero de vida, José Alberto Sánchez, por haber sido mí soporte en estos años, desde el inicio del doctorado. Por siempre apoyarme, en las buenas y en las malas. Gracias por alentarme a continuar con este gran proyecto de vida a pesar de las adversidades. Siempre me recuerdas que soy capaz de lograr mis objetivos. Te amo.



Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 112 del departamento de Farmacia en el conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México y fue presentado como trabajo libre en el XXIX Congreso Nacional de Educación Químico Farmacéutica Biológica, con el título:

“Desarrollo de una nueva formulación parenteral de albendazol para tratamiento de cáncer de páncreas” celebrado del 12 al 15 de abril de 2021.

También se presentó en la XXXVII Reunión Anual de Investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, con el título:

“Desarrollo y evaluación farmacocinética de dos formulaciones parenterales de albendazol mediante el uso de un profármaco y cosolventes”, celebrada del 5 al 7 de junio de 2023.

A partir del proyecto se publicó el siguiente artículo:

Becerril-Vega, J., Hernández-Campos, A., González-Hernández, I., Flores-Ramos, M., Castillo, R., Leyva-Gómez, G., Mayet-Cruz, L., & Jung-Cook, H. (2023). Development and Pharmacokinetic Evaluation of Two Parenteral Formulations of Albendazole Using Prodrug and Cosolvent Approaches. *AAPS PharmSciTech*, 24(6), 158. doi:10.1208/s12249-023-02613-9



## ÍNDICE

Índice de Tablas.....	4
Índice de Figuras .....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. ANTECEDENTES .....	10
2.1 Albendazol.....	10
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas.....	10
2.1.2 Farmacocinética .....	11
2.1.3 Farmacodinamia .....	13
2.1.4 Toxicidad .....	13
2.2 REPOSICIONAMIENTO DEL ALBENDAZOL EN CÁNCER .....	14
2.3 CÁNCER DE PÁNCREAS .....	17
2.3.1 Clasificación .....	17
2.3.2 Epidemiología .....	18
2.3.3 Factores de riesgo .....	20
2.3.4 Manifestaciones clínicas .....	21
2.3.5 Tratamiento .....	21
2.3.6 ABZ en cáncer de páncreas.....	22
2.4 ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD .....	24
2.4.1 Complejos de inclusión .....	24
2.4.2 Nanopartículas.....	25
2.4.3 Cosolventes .....	26
2.4.4 Profármacos .....	27
3. JUSTIFICACIÓN .....	29

4.	OBJETIVOS .....	30
4.1	OBJETIVO GENERAL .....	30
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
5.	HIPÓTESIS .....	30
6.	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
6.1	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS .....	31
6.2	PREPARACIÓN DEL PROFÁRMACO FOSFONOOXIMETILADO DE ABZ .....	33
6.2.1	Preparación de (1-(((di-terc-butoxifosforil)oxi)metil)-6-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (3) a partir de ABZ (1) .....	33
6.2.2	Preparación de (1-((fosfonooxi)metil)-6-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (5) 34	
6.2.3	Preparación de (2-((metoxicarbonil)amino)-6-(propiltio)-1H-benzimidazol-1-il)metilfosfato sódico (6) .....	34
6.2.4	Determinación de pureza por RMN cuantitativa .....	34
6.3	SOLUBILIDAD DEL PROFÁRMACO .....	35
6.3.1	Metodología analítica para cuantificar el profármaco .....	35
6.3.2	Prueba de solubilidad del profármaco .....	35
6.4	HIDRÓLISIS DEL PROFÁRMACO .....	35
6.5	DESARROLLO DE FORMULACIÓN EMPLEANDO COSOLVENTES.....	35
6.5.1	Metodología analítica para cuantificar ABZ en cosolventes .....	36
6.5.2	Pruebas de solubilidad.....	36
6.5.3	Diseño de la formulación .....	36
6.6	ESTUDIO DE ESTABILIDAD .....	37
6.7	EVALUACIÓN DE HEMÓLISIS.....	38
6.8	ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA.....	39
6.8.1	Método analítico para cuantificar ABZ y ABZSO .....	39
6.8.2	Parámetros farmacocinéticos.....	47
6.8.3	Análisis estadístico .....	47

7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
7.1	PREPARACIÓN DEL PROFÁRMACO FOSFONOOXIMETILADO DE ABZ .....	48
7.1.1	Determinación de pureza por RMN cuantitativa .....	56
7.2	SOLUBILIDAD DEL PROFÁRMACO .....	56
7.2.1	Metodología analítica para cuantificar el profármaco .....	56
7.2.2	Estudio de solubilidad del profármaco.....	57
7.3	HIDRÓLISIS DEL PROFÁRMACO .....	58
7.4	ANÁLISIS DEL COSTO .....	59
7.5	DESARROLLO DE FORMULACIÓN EMPLEANDO COSOLVENTES.....	59
7.5.1	Desarrollo de la metodología analítica .....	59
7.5.1.2	Validación del método cromatográfico para cuantificación de ABZ .....	62
7.5.2	Prueba de solubilidad .....	63
7.5.3	Diseño de la formulación .....	64
7.6	ESTUDIO DE ESTABILIDAD .....	66
7.7	EVALUACIÓN DE HEMÓLISIS.....	66
7.8	ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA DEL PROFÁRMACO DE ABZ Y DE LA FORMULACIÓN EN EL SISTEMA DE COSOLVENTES .....	67
7.8.1	Validación del método analítico para cuantificar ABZ y ABZSO .....	67
7.8.2	Farmacocinética de ABZ en las diferentes formulaciones desarrolladas.....	76
8.	CONCLUSIONES.....	82
9.	PERSPECTIVAS.....	83
10.	REFERENCIAS.....	84
	Anexo 1. Constancias de presentación en congresos .....	92
	Anexo 2. Artículo publicado generado del trabajo de investigación.....	94

## Índice de Tablas

Tabla 1. Modelos de cáncer en los que se ha evaluado la eficacia de ABZ .....	17
Tabla 2. Etapas del cáncer de páncreas. ....	18
Tabla 3. Composición de la tercera fase evaluada.....	37
Tabla 4. Preparación de soluciones de trabajo.....	41
Tabla 5. Preparación de curva de calibración para la cuantificación de ABZ y ABZSO empleando el método LC-MS/MS .....	41
Tabla 6. Preparación de muestras control de ABZ y ABZSO en plasma .....	42
Tabla 7. Condiciones cromatográficas para ABZ y ABZSO en plasma .....	43
Tabla 8. Condiciones para la fragmentación usadas en el modo MRM. ....	43
Tabla 9. Condiciones de reacción evaluadas para la reacción $S_N2$ . ....	48
Tabla 10. Linealidad y precisión del método analítico para cuantificar al profármaco de albendazol .....	56
Tabla 11. Solubilidad del profármaco en soluciones amortiguadoras .....	58
Tabla 12. Costo de la síntesis de 1 g de profármaco de albendazol.....	59
Tabla 13. Selectividad de los excipientes en el método espectrofotométrico .....	60
Tabla 14. Selectividad del método cromatográfico .....	60
Tabla 15. Linealidad y precisión del método espectrofotométrico .....	61
Tabla 16. Linealidad y precisión del método cromatográfico .....	62
Tabla 17. Solubilidad de ABZ en diferentes disolventes e hidrotropos .....	63
Tabla 18. Composición de las formulaciones finales.....	65
Tabla 19. Estabilidad química de las formulaciones de cosolventes .....	66
Tabla 20. Respuesta analítica de los blancos al evaluar selectividad.....	69
Tabla 21. Respuesta de los blancos en la prueba de acarreo .....	69
Tabla 22. Efecto de matriz normalizado para ABZ y ABZSO (n=5) .....	70
Tabla 23. Porcentaje de desviación de la concentración calculada con respecto a la concentración nominal de ABZ y ABZSO.....	70
Tabla 24. Repetibilidad y exactitud del método para ABZ .....	72
Tabla 25. Repetibilidad y exactitud del método para ABZSO .....	72
Tabla 26. Reproducibilidad del método para ABZ .....	73
Tabla 27. Reproducibilidad del método para ABZSO .....	74
Tabla 28. Precisión y exactitud en muestras control diluidas.....	74
Tabla 29. Precisión y exactitud obtenido en la prueba de matriz sustituta para ABZ.....	75

Tabla 30. Precisión y exactitud obtenido en la prueba de matriz sustituta para ABZSO.....	75
Tabla 31. Estabilidad en el automuestreador .....	76
Tabla 32. Parámetros farmacocinéticos de ABZ en conejos (n=6) .....	79
Tabla 33. Parámetros farmacocinéticos de ABZSO en conejos (n=6) .....	80

## Índice de Figuras

Figura 1. Estructura y valores de pKa del ABZ.....	11
Figura 2. Metabolismo del albendazol.....	12
Figura 3. Mecanismo de acción propuesto del ABZ en cáncer.....	16
Figura 4. Incidencia mundial de los 15 principales tipos de cáncer .....	19
Figura 5. Número estimado de muertes por los 10 tipos de cáncer con mayor mortalidad .....	19
Figura 6. Ranking por número de muertes ocasionadas por cáncer de páncreas. ....	20
Figura 7. Eficiencia en la formación de colonias de las células de cáncer de páncreas al ser tratadas con ABZ en diferentes concentraciones y gemcitabina. ....	23
Figura 8. Volumen del tumor en un modelo <i>in xenograft</i> de cáncer de páncreas después de la administración de ABZ y en un grupo control.....	24
Figura 9. Ruta de síntesis para obtener al profármaco de ABZ.....	33
Figura 10. Metodología para la prueba de hemólisis.....	38
Figura 11. Procedimiento de extracción de ABZ y ABZSO en muestras de plasma .....	42
Figura 12. Resultado del análisis de HPLC-MS del subproducto de reacción (dímero). ....	49
Figura 13. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del dímero de albendazol .....	50
Figura 14. Formación del subproducto principal de reacción.....	51
Figura 15. Resultado del análisis de HPLC-MS del profármaco de ABZ. ....	53
Figura 16. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del fosfonooximetil albendazol.....	54
Figura 17. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del fosfonooximetil albendazol. (D <sub>2</sub> O, 75 MHz, δ en ppm) .....	54
Figura 18. Espectro de RMN <sup>31</sup> P del fosfonooximetil albendazol. (D <sub>2</sub> O, 122 MHz, δ en ppm)....	55
Figura 19. Hidrólisis de los dos regioisómeros del profármaco de albendazol.....	55
Figura 20. Curva de calibración del método para cuantificar al profármaco de albendazol .....	57
Figura 21. Cantidad de ABZ remanente por liberarse a partir del profármaco vs tiempo.....	58
Figura 22. Curva de calibración del método espectrofotométrico. ....	61
Figura 23. Curva de calibración del método cromatográfico.....	62
Figura 24. Gráfica de superficie de respuesta del Diseño de Experimentos.....	64

Figura 25. Solubilidad de ABZ en las formulaciones preparadas de acuerdo con la Tabla 3.....	65
Figura 26. Porcentaje de hemólisis producido por las formulaciones de cosolventes.....	67
Figura 27. Cromatograma representativo de la muestra control baja (MCB) .....	68
Figura 28. Cromatograma representativo de la muestra control alta (MCA) .....	68
Figura 29. Curvas de calibración de ABZ y ABZSO .....	71
Figura 30. Perfil de concentración plasmática vs tiempo de ABZ.....	77
Figura 31. Perfil de concentración plasmática vs tiempo de ABZSO .....	78

## RESUMEN

El albendazol es un fármaco antihelmíntico de amplio espectro utilizado para las infecciones parasitarias. Se ha demostrado que inhibe la polimerización de la tubulina, provocando la degeneración de los microtúbulos y la muerte del parásito. Además, debido a su mecanismo de acción, se ha estudiado como agente anticancerígeno. Sin embargo, su escasa y muy variable biodisponibilidad son factores limitantes para su uso en enfermedades sistémicas. Aunque la vía oral es la más común por su comodidad, la vía parenteral representa una buena opción para alcanzar las concentraciones plasmáticas deseadas. El objetivo del presente estudio fue desarrollar dos formulaciones parenterales de albendazol y comparar su perfil farmacocinético con la administración oral convencional. Las formulaciones parenterales se desarrollaron utilizando dos enfoques diferentes: un profármaco fosfonooximetilado y un sistema de cosolventes. Después de sintetizar el profármaco de ABZ, se evaluó su solubilidad e hidrólisis con fosfatasa alcalina. Para la formulación con cosolventes se seleccionó una mezcla de etanol-dimetilacetamida-polietilenglicol 400, y se determinó su estabilidad y actividad hemolítica. El estudio de farmacocinética se llevó a cabo en conejos Nueva Zelanda, a los cuales se les administraron ambas formulaciones por vía intravenosa a dosis de 5 mg/Kg de ABZ. El profármaco se administró por vía intramuscular a la misma dosis. Como producto de referencia se utilizó una suspensión de ABZ por vía oral a dosis de 10 mg/Kg. La solubilidad del ABZ aumentó en 20,000 y 6,000 veces con las formulaciones de profármaco y cosolventes, respectivamente. El profármaco se hidrolizó rápidamente, con una vida media de  $8.72 \pm 0.23$  min. La formulación con cosolventes no ocasionó hemólisis y fue estable por al menos 12 meses a temperatura ambiente. En el estudio farmacocinético, se encontró que ambas formulaciones parenterales mostraron mayores concentraciones plasmáticas de ABZ durante las primeras 2 h en comparación con la vía oral. La biodisponibilidad absoluta del ABZ oral fue del 15.5%, mientras que para el profármaco por vía intramuscular fue del 102.6%. La administración parenteral de ABZ permitió una mayor exposición al albendazol. La formulación con cosolventes podría ser una buena opción para el tratamiento tomando en cuenta su facilidad de preparación y su buen comportamiento farmacocinético.

## ABSTRACT

Albendazole is a broad-spectrum anthelmintic used to treat parasitic infections. It has been shown to inhibit tubulin polymerization, resulting in microtubule degeneration and parasite death. It has also been investigated as an anticancer agent due to its mechanism of action. However, poor and highly variable bioavailability is a limiting factor for its use in systemic diseases. Although the oral route is the most commonly used due to its convenience, the parenteral route represents a good option to achieve the desired plasma concentrations. The aim of the present study was to develop two parenteral formulations of albendazole and to compare their pharmacokinetic profile with that of conventional oral administration. Parenteral formulations were developed using two different approaches: a phosphonoxyethylated prodrug and cosolvents. For the albendazole prodrug, once synthesized, its solubility and hydrolysis with alkaline phosphatase were evaluated. A factorial design of experiments was used for the cosolvent formulation. Stability and hemolytic activity were evaluated. The pharmacokinetic study was conducted in New Zealand rabbits to which both formulations were administered intravenously at a dose of 5 mg/kg ABZ. The prodrug was administered intramuscularly at the same dose. An oral suspension of ABZ at a dose of 10 mg/kg was used as the reference product.

A 20,000-fold and 6,000-fold increase in albendazole solubility was found with the prodrug and cosolvent formulations, respectively. The prodrug was rapidly hydrolyzed with a half-life of  $8.72 \pm 0.23$  minutes. The cosolvent formulation did not cause hemolysis and was stable for at least 12 months at room temperature. Both parenteral formulations showed higher albendazole plasma concentrations during the first 2 h compared to oral administration, even when the oral dose was doubled. The absolute bioavailability of oral albendazole was 15.5% compared to 102.6% for the intramuscular prodrug. Both parenteral formulations showed a significant decrease in albendazole sulfoxide formation (ANOVA  $p < 0.05$ ) and allowed for greater exposure to albendazole. ABZ cosolvent parenteral formulation could be a promising option in systemic diseases considering its ease of preparation and excellent pharmacokinetic performance.



# 1. INTRODUCCIÓN

El albendazol (ABZ) es un antihelmíntico de amplio espectro que ha demostrado ser efectivo contra nemátodos, tremátodos y céstodos. En la actualidad, es el fármaco de elección para el tratamiento de las parasitosis intestinales y sistémicas, tanto en humanos como en otras especies animales. El principal mecanismo de acción es la alteración del tegumento del parásito mediante su unión a la tubulina en el sitio sensible a colchicina, inhibiendo su polimerización o su ensamblaje en los microtúbulos (Jung Cook, 2012).

Desde hace algunas décadas se ha reportado que, los fármacos que inhiben la polimerización de la tubulina pueden producir efectos anticancerosos, siendo uno de ellos el paclitaxel, el cual se une a los microtúbulos que forman los haces mitóticos durante la metafase, interrumpiendo el ciclo celular (Khalilzadeh, et al., 2007). Considerando que el mecanismo de acción de los benzimidazoles es la inhibición de la beta tubulina, en las últimas décadas se ha evaluado su uso potencial como fármacos oncológicos. En los últimos años, el albendazol ha recibido especial atención, ya que ha demostrado su eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales en diferentes tipos de cáncer, entre ellos, cáncer de hígado (Pourgholami, et al., 2001), pulmón (Zhou, et al., 2017), estómago (Zhang, et al., 2017), colon (Pourgholami, et al., 2005), páncreas (Chen, et al., 2020), ovario (Pourgholami, et al., 2008) y células de leucemia (Khalilzadeh, et al., 2007).

A pesar de los resultados promisorios de eficacia, la principal limitante de este fármaco es su baja solubilidad, lo cual da lugar a una baja y errática absorción por vía oral y una gran variabilidad interindividual en las concentraciones en plasma, por lo que resulta de especial interés el centrar los esfuerzos en el desarrollo de formas farmacéuticas, ya sea para administración oral o parenteral, que permitan mejorar su solubilidad y por lo tanto su perfil farmacocinético (Kang, et al., 2015).

Tomando en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se desarrollaron y evaluaron dos formulaciones de albendazol para administración parenteral, empleando los siguientes enfoques: la síntesis de un profármaco fosfonooximetilado de albendazol y el desarrollo de una formulación en un sistema de cosolventes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Albendazol

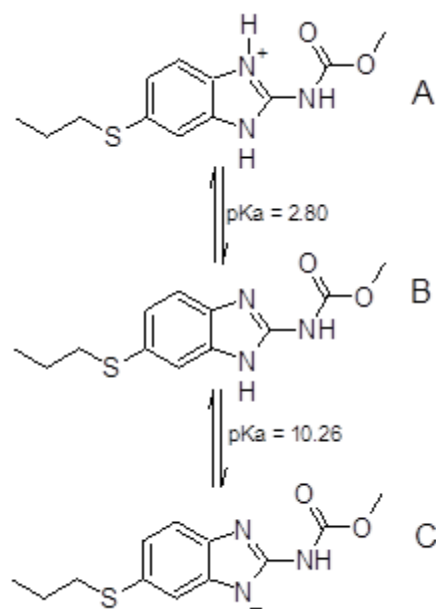
El albendazol (ABZ) es un antihelmíntico de amplio espectro que es efectivo contra nemátodos, tremátodos y céstodos. En 1987, Escobedo y colaboradores demostraron que este fármaco es efectivo para el tratamiento de la neurocisticercosis (NCC) (Jung Cook, 2012). En la actualidad, es el fármaco de elección para el tratamiento de parasitosis intestinales y sistémicas, tanto en humanos como en otras especies animales (Pranzo, et al., 2010). En los últimos años, este fármaco ha recibido especial atención por su potencial como agente anticanceroso, por los resultados de eficacia en diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, de ovario (Movahedi, et al., 2017) y de páncreas (Shaikh, et al., 2017). Aunado a lo anterior, el ABZ ha mostrado toxicidad selectiva, es decir, presenta más actividad en células cancerosas que en las células sanas, disminuyendo así los efectos adversos de la terapia, lo cual lo hace aún más atractivo para emplearse en el tratamiento de cáncer (Movahedi, et al., 2017).

#### 2.1.1 Propiedades fisicoquímicas

El ABZ, cuyo nombre químico es N-[5-(propiltio)-1*H*-bencimidazol-2-il] carbamato de metilo, forma parte del grupo de los carbamatos bencimidazolicos junto con el mebendazol y flubendazol. Es un polvo color blanco con punto de fusión entre 208 – 210 °C (Pranzo, et al., 2010), muy soluble en ácido acético, cloroformo y dimetilsulfóxido y poco soluble en etanol, metanol y acetona (Jung, et al., 1998).

En la Figura 1 se presenta su estructura química, así como los valores de pKa reportados (Jung, et al., 1998). Una de las principales limitantes para su uso en enfermedades sistémicas se debe a su baja solubilidad acuosa (0.81 µg/mL por lo que su vía de administración es exclusivamente extravascular. De acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica, el ABZ es un fármaco clase 2 (Takagi, et al., 2006), por su baja solubilidad acuosa y un valor de log P de 3.46 (Rivera, et al., 2007).

El ABZ presenta dos estructuras polimórficas, la forma I que es la forma metaestable a temperatura ambiente y es más soluble y la forma II que es un polimorfo enantiotrópico estable. Es por ello por lo que se debe especificar las condiciones de almacenamiento del ABZ comercial (forma I), para evitar la transición a la forma estable. Se recomienda mantenerlo de preferencia en refrigeración, así como cuidar de no recuperar el polvo después de disolverlo, ya que la transición ocurre más fácilmente en solución (Pranzo, et al., 2010).



**Figura 1.** Estructura y valores de  $\text{pK}_a$  del ABZ. En la estructura A el ABZ está ganando un protón en un nitrógeno básico, mientras que en la estructura C está perdiendo un protón.

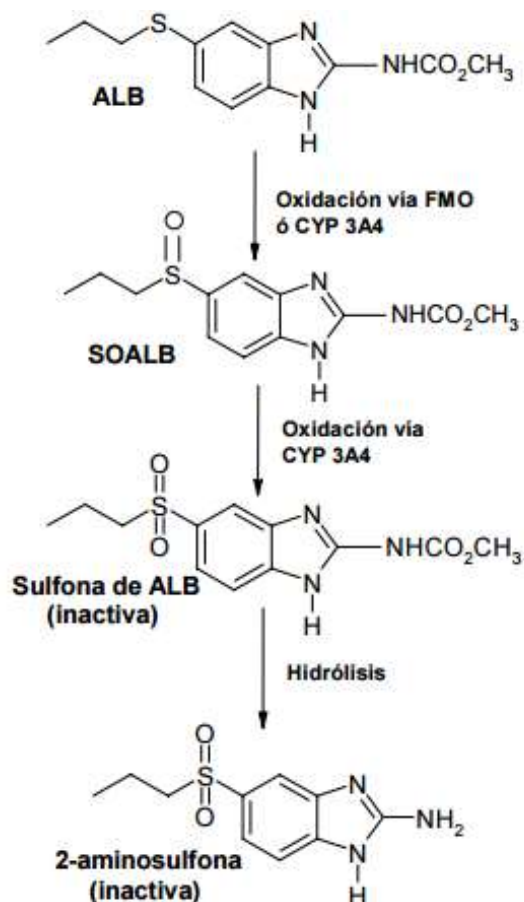
### 2.1.2 Farmacocinética

La absorción del albendazol en el tracto gastrointestinal es baja y errática debido a su baja solubilidad. La mayor parte se absorbe en el estómago ya que a pH ácido predomina la forma más soluble. A pesar de que a pH intestinal se encuentra mayoritariamente en su forma ionizada, debido a su alta liposolubilidad, la fracción no ionizada puede atravesar fácilmente la membrana y desplazar el equilibrio para que se siga absorbiendo (Jung, et al., 1998).

El ABZ presenta una baja biodisponibilidad debido a su baja solubilidad y a que sufre un extenso metabolismo de primer paso a través de las enzimas flavin mono-oxigenasas (FMO) y el citocromo P450, principalmente el CYP 3A4 (Rawden, et al., 2000). El principal metabolito es el sulfóxido de albendazol (ABZSO), el cual también posee actividad antihelmíntica. Posteriormente, el ABZSO se oxida mediante el mismo citocromo produciendo la sulfona de albendazol  $\text{ABZSO}_2$ , la cual es inactiva (Jung Cook, 2012). Las estructuras de los metabolitos se muestran en la Figura 2.

El sulfóxido de albendazol se considera el responsable tanto de la actividad cisticida como de los efectos adversos causados después de la administración de albendazol. Dicho metabolito presenta un centro quiral en el átomo de azufre y su farmacocinética es enantioselectiva. En los humanos, el enantiómero (+)-ABZSO representa el 80 % del área bajo la curva (ABC) total. (Sotelo & Jung, 1998). Además, este enantiómero es el principal responsable de la actividad

cisticida, en primer lugar, porque es el que logra atravesar en mayor proporción al líquido cefalorraquídeo, además de que presenta mayor afinidad por los blancos moleculares del parásito (Paredes, et al., 2013).



**Figura 2.** Metabolismo del albendazol

Tras la administración de una dosis única de 400 mg de ABZ en voluntarios mexicanos sanos, se encontró una absorción rápida con un  $t_{\text{máx}}$  que va entre 45 min y 1.5 h. La concentración plasmática máxima ( $C_{\text{máx}}$ ) de ABZ fue de  $22.85 \pm 15.35$  ng/mL, mientras que la concentración plasmática máxima del metabolito ABZSO se presenta entre las 2 y 3 h, con un valor de  $C_{\text{máx}}$  de  $287.16 \pm 120.46$  ng/mL. En ambos casos, los valores de  $C_{\text{máx}}$  y área bajo la curva presentan alta variabilidad interindividual (Soto Romo, 2018). Dicha variabilidad está relacionada a la baja solubilidad que conlleva a una absorción errática más que a diferencias en el metabolismo (Jung Cook, 2012). Esta misma variabilidad interindividual se ha encontrado después de la administración de una dosis de 10 mg/kg a pacientes con neurocisticercosis, en los cuales, la

concentración de ABZSO en el estado estacionario fue de  $1625 \pm 765.9$  ng/mL (Osorio, et al., 2019).

Al administrar el ABZ conjuntamente con alimentos ricos en grasas se observa un aumento en la absorción, lo cual se debe a que las grasas favorecen la secreción de sales biliares que con su efecto tensoactivo favorecen su solubilidad y su disolución (Sotelo & Jung, 1998).

Una vez en sangre, el albendazol se une extensamente a la albúmina plasmática (entre 89 y 91 %), mientras que el ABZSO se une entre un 62 y 77 %. El ABZSO permea a través de la barrera hematoencefálica, por lo que se encuentran altas concentraciones en líquido cefalorraquídeo (Jung Cook, 2012). Esto a pesar de que el ABZSO es un sustrato de la proteína de eflujo BCRP (Breast Cancer Resistant Protein), que es una proteína que favorece la salida del fármaco de aquellas células que expresan el transportador (Merino, et al., 2005). En contraste, el ABZ no es un sustrato ni un inhibidor de la glicoproteína P (Merino, et al., 2002), ni de la BCRP (Merino, et al., 2005).

La vida media de eliminación del ABZSO en pacientes con NCC oscila entre 10 y 15 h (Jung Cook, 2012). En sujetos sanos, tras la administración de una dosis única de 400 mg de ABZ con alimentos, la vida media de eliminación de ABZ osciló entre 2.0 y 3.0 h, mientras que la vida media para el ABZSO fue de 10.5 – 12.6 h (Ochoa, et al., 2021).

### 2.1.3 Farmacodinamia

El principal modo de acción del ABZ es la alteración del tegumento del parásito mediante su unión a la tubulina en el sitio sensible a colchicina, inhibiendo su polimerización o su ensamblaje en los microtúbulos (Jung Cook, 2012). Debido a que los microtúbulos del citoplasma están implicados en la absorción de glucosa tanto en las larvas como en los parásitos adultos, la unión de los benzimidazoles ocasiona la pérdida de reservas de glucógeno y por tanto lleva a la muerte del parásito (Sotelo & Jung, 1998).

La dosis recomendada para tratamiento de neurocisticercosis es de 15 mg/Kg/día dividida en 2 dosis cada 12 h por un periodo de 8 días (Sotelo & Jung, 1998).

### 2.1.4 Toxicidad

En los estudios en modelos animales de ratón, rata y perro se ha demostrado que después de una dosis de 30-40 mg/Kg por 4 a 90 días se presenta dificultad para ganar peso, anemia, leucopenia e hipercolesterolemia (Dayan, 2003). En los mismos modelos, no demostró tener actividad genotóxica ni carcinogénica. Sin embargo, presentó actividad teratogénica en

modelos de rata y conejo, por lo que no se recomienda su uso en mujeres embarazadas (Dayan, 2003) (Sotelo & Jung, 1998).

En general, el ABZ es bien tolerado en su uso clínico a las dosis recomendadas. Las reacciones adversas más comunes son dolor estomacal, diarrea, náusea, vómito y dolor de cabeza. Cuando se usan dosis altas y/o por periodos de tiempo largo pueden aparecer anormalidades en la función hepática, leucopenia y alopecia (de Silva, et al., 1997).

## 2.2 REPOSICIONAMIENTO DEL ALBENDAZOL EN CÁNCER

La manera tradicional de desarrollo de fármacos involucra la identificación y validación de la eficacia y seguridad de nuevas entidades moleculares, lo cual es un proceso que consume tiempo y dinero. A pesar de los avances tecnocientíficos y de la gran inversión en el desarrollo, el número de nuevos fármacos introducidos en la clínica no ha aumentado significativamente. Aunado a lo anterior, el tiempo promedio requerido para el desarrollo de nuevos fármacos ha aumentado de 9.7 años a 13.9 años (Shim, 2014 ).

Es por esta razón que se buscan otras alternativas para la investigación de nuevos tratamientos y una de ellas es el reposicionamiento de fármacos. Esta técnica se refiere a la investigación de nuevos usos terapéuticos para moléculas ya conocidas, lo cual permite un desarrollo más rápido y reduce costos, ya que se inicia con un fármaco bien caracterizado y que ha sido evaluado al menos en modelos preclínicos en cuanto a seguridad (Pushpakom S, 2019).

El reposicionamiento puede producirse a través de 3 vías generales: la serendipia, la búsqueda de nuevos usos basados en el mecanismo de acción de la molécula o el empleo de bases de datos para buscar posibles interacciones entre las moléculas y proteínas blanco (Shim, 2014 ).

Un ejemplo de reposicionamiento basado en el mecanismo de acción de la molécula es el caso del albendazol. Dado que existen diferentes moléculas que han demostrado actividad antitumoral y cuyo mecanismo de acción es la unión a la tubulina, los bencimidazoles (BZ) han sido evaluados para su uso potencial como fármacos oncológicos (Khalilzadeh, et al., 2007).

Desde 1985 se ha reportado la actividad de los BZ contra diferentes tipos de células cancerosas, entre los que se encuentran las de hígado (Pourgholami, et al., 2001), pulmón (Zhou, et al., 2017), estómago (Zhang, et al., 2017), colon (Pourgholami, et al., 2005), páncreas (Chen, et al., 2020), ovario (Pourgholami, et al., 2008) y células de leucemia (Khalilzadeh, et al., 2007). Un ejemplo de esto es el reporte de Pourgholami y colaboradores en 2001, los cuales llevaron a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar la actividad inhibitoria del albendazol sobre carcinoma hepático. En él, los autores encontraron que para ejercer la actividad *in vivo* la

dosis requerida fue de 300 mg/Kg por día de ABZ, argumentando que la dosis tan alta puede ser debida al extenso metabolismo del fármaco (Pourgholami, et al., 2001).

En 2005, el mismo grupo de trabajo evaluó la actividad de ABZ, el ABZSO y la sulfona, en células de cáncer de colon, encontrando que el ABZSO presentó menor actividad que el ABZ, mientras que la sulfona de albendazol fue inactiva. Se demostró que el ABZ induce apoptosis ya que después del tratamiento se activó la caspasa-3, la cual es una molécula importante para la producción de apoptosis (Pourgholami, et al., 2005).

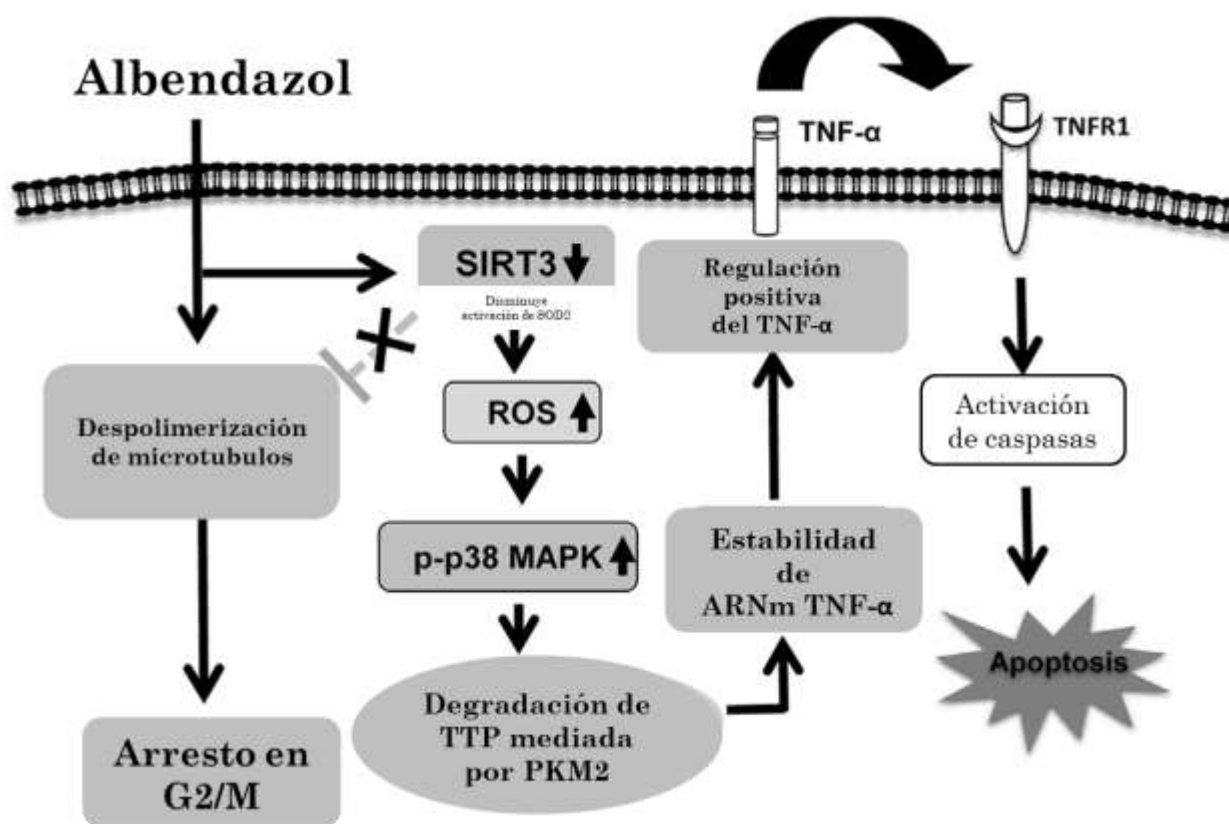
En los años 2008 y 2009 se publicaron estudios en los que se demostró la eficacia del ABZ contra cáncer de ovario en modelos *in vitro* e *in vivo*. En estas publicaciones se reportó también que el ABZ disminuye la concentración del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que es una molécula clave relacionada con la angiogénesis (Pourgholami, et al., 2008).

En 2011, Patel, et al, mostraron que el albendazol induce daño al ADN y que inhibe el crecimiento de células de melanoma y de cáncer de pulmón microcítico a concentraciones de 500 nM. Además, con esta concentración actúa en la fase G2/M del ciclo celular. Considerando que en esta fase las células son más susceptibles a la radioterapia, se evaluó el tratamiento conjunto de ABZ y radioterapia, demostrando un incremento en la apoptosis en ambas líneas celulares (Patel, et al., 2011).

En 2013, Králová y colaboradores publicaron un estudio donde encontraron que el ABZ presentó actividad antiproliferativa en las líneas celulares de cáncer de colon mientras que el ABZSO no presentó esta actividad. Los autores mencionan que ello podría deberse a que este metabolito es sustrato de dos proteínas de eflujo: glicoproteína-P y BCRP. En cambio, el ABZ no es sustrato de estas proteínas, por lo cual presenta una buena actividad antiproliferativa (Králová, et al., 2013).

En 2016 Castro, et al, reportaron que el ABZ disminuye los niveles de glutatión y aumenta la concentración de algunos marcadores oxidativos, por lo que establecen que el efecto antitumoral está relacionado con el aumento del estrés oxidativo en células de cáncer de mama (Castro, et al., 2016).

En 2020, Wuang, et al, evaluaron la actividad del ABZ en células de leucemia humana U937 y establecen que el mecanismo de acción está relacionado con la disminución de la proteína SIRT3, lo cual genera una disminución de la activación de la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD2), ocasionando un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto genera daño al ADN y además produce el aumento del TNF- $\alpha$ , que a su vez favorece la activación de las caspasas llevando a la apoptosis. La Figura 3 muestra el mecanismo propuesto por estos autores (Wuang, et al., 2019).



**Figura 3.** Mecanismo de acción propuesto del ABZ en cáncer.

En la Tabla 1 se muestran a manera de resumen los reportes en los que se ha evaluado la eficacia *in vitro* de ABZ en diferentes líneas celulares de cáncer, en la que se presentan los valores de concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) y el tiempo durante el cual se llevó a cabo la prueba. En ella se puede observar que uno de los tipos de cáncer donde el ABZ presenta una mayor potencia inhibitoria es en el cáncer de páncreas, con un valor de  $CI_{50}$  que oscila entre 80 y 150 nM (Shaikh, et al., 2017). Considerando que el cáncer de páncreas representa la 7ª causa de muerte por cáncer en el mundo (International Agency for Research on Cancer, WHO, 2023) y tiene una tasa de supervivencia a 5 años de 12.5% (National Cancer Institute, 2020), se ha continuado con la búsqueda de alternativas para el tratamiento de dicho tipo de cáncer, por lo que se consideró importante continuar con la evaluación del ABZ.



**Tabla 1.** Modelos de cáncer en los que se ha evaluado la eficacia de ABZ

Referencia	Tipo de cáncer	Línea celular	Tiempo	Cl <sub>50</sub> (nM)	Observaciones
Pourgholami, et al, 2005	Colon	HT-29	72 h	120	NA
Khalilzadeh, et al, 2007	Leucemia	CEM/dEpoB300	72 h	160	Resistentes a paclitaxel
Pourgholami, et al, 2008	Ovario	1A 9	72 h	250	Es menor la Cl <sub>50</sub> cuando se solubiliza con HP-b-CD
		SKOV-3		1000	
Patel, et al, 2011	Pulmón microcítico	H153	72 h	Sin reportar. Usan 500 nM	ABZ actúa como sensibilizante a la radiación
Bai, et al, 2011	Glioblastoma	060919	72 h	100	Células resistentes a temozolomida
Králová, et al, 2013	Colon	HCT8	48 h	300	NA
Zhang, et al, 2017	Estómago	MKN-45	72 h	350	Mayor actividad en células poco diferenciadas
		SGC-7901		380	
		MKN-28		970	
Shaikh, et al, 2017	Páncreas	MiaPaCa-2	72 h	80	Se disminuye la Cl <sub>50</sub> al emplear ciclodextrinas
		PanC-1		150	
Zhou, et al, 2017	Pulmón no microcítico	A549 y H1299	24 h	Sin reportar	Usan 500 nM
Ghasemi, et al, 2017	Cabeza y cuello	13 líneas diferentes HPV negativo	72 h	70 – 588	No tuvo efecto antiproliferativo en células no cancerosas

## 2.3 CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de cáncer más agresivos debido a que es difícil de diagnosticar en etapas tempranas ya que no presenta síntomas específicos y puede diseminarse rápidamente. Es por ello que, al momento del diagnóstico, los pacientes ya presentan tumores localizados en etapas avanzadas o incluso metástasis, lo que dificulta la decisión de optar por una cirugía para eliminar el tumor (Yang, et al., 2014).

### 2.3.1 Clasificación

El 90% de los tumores pancreáticos corresponden al adenocarcinoma ductal (ADP), correspondiendo el 10% restante a otro tipo de tumores que suelen tener un mejor pronóstico. La incidencia del ADP aumenta después de los 45 años y es más común en hombres que en mujeres. Es considerado uno de los cánceres más letales y difíciles de tratar (Vaquero & Castells, 2014).

Aproximadamente el 60 – 70% de los adenocarcinomas se encuentran en la cabeza del páncreas, mientras que el 30% restante puede encontrarse en el cuerpo o la cola de éste. (McGuigan, et al., 2018). De acuerdo con el estadio en el que se encuentre el tumor, se puede agrupar por etapas, las cuales dependen del tamaño del tumor, que tan confinado o diseminado esté y de la presencia de metástasis (American Cancer Society, 2019). En la Tabla 2 se muestra la clasificación por etapas del cáncer de páncreas.

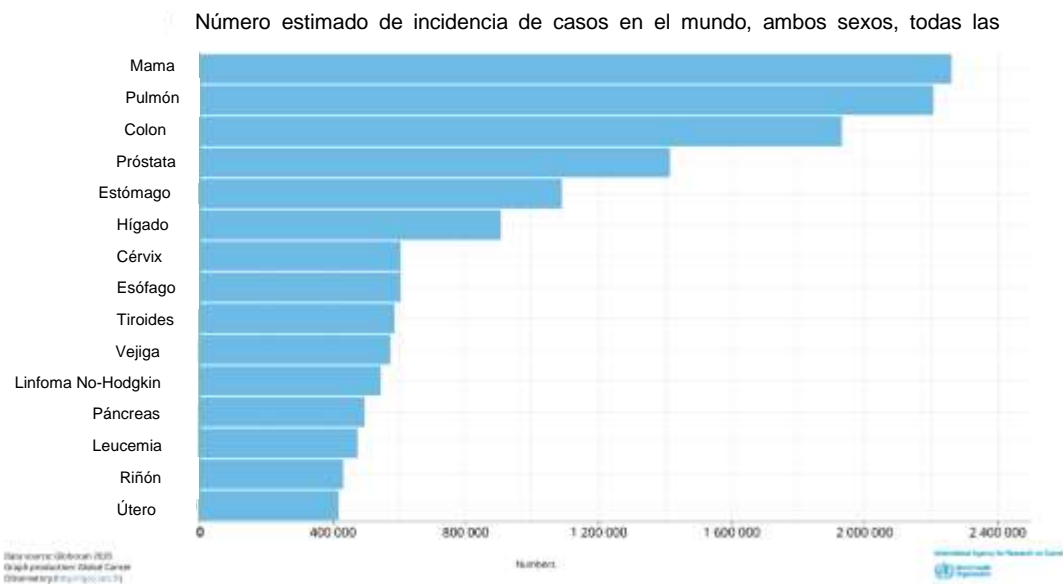
**Tabla 2.** Etapas del cáncer de páncreas.

<b>Etapas</b>	<b>Descripción</b>
0	El tumor se encuentra confinado a las capas superiores de células del conducto pancreático y no ha invadido tejidos profundos.
I A	El cáncer está confinado en el páncreas y no mide más de 2 cm.
I B	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 2 cm pero menos de 4 cm.
II A	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 4 cm.
II B	El cáncer está confinado en el páncreas, pero se ha propagado a no más de 3 ganglios linfáticos adyacentes.
III	El cáncer está confinado en el páncreas, pero se ha propagado a más de 4 ganglios linfáticos adyacentes o está creciendo fuera del páncreas y en los vasos sanguíneos principales adyacentes sin estar en sitios distantes.
IV	El cáncer se ha propagado a sitios distantes y puede ser de cualquier tamaño.

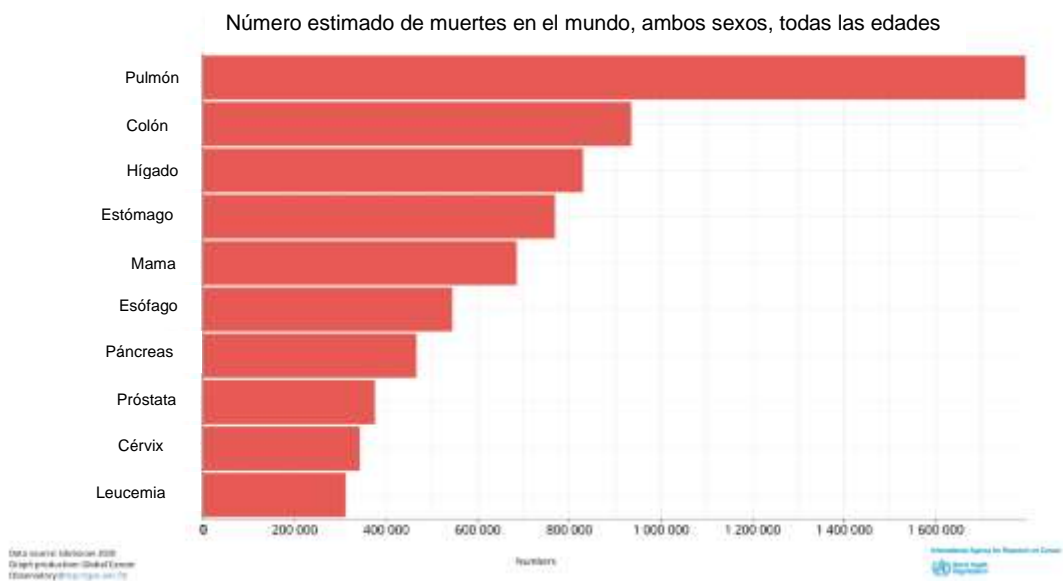
Información tomada de: American Cancer Society, 2019.

### 2.3.2 Epidemiología

El cáncer de páncreas es el número 12 en incidencia a nivel mundial (Figura 4) y es la 7ª causa de muerte por cáncer (Figura 5). La incidencia de muertes ocasionadas por este tipo de cáncer varía significativamente entre los diferentes países, habiendo la mayor incidencia en los países desarrollados, incluyendo a Estados Unidos, Alemania, República Checa y Finlandia (Figura 6) (International Agency for Research on Cancer, WHO, 2023). Además, la tendencia mundial es hacia el incremento de los casos, lo cual se asocia a la mayor esperanza de vida de la población y el mejor diagnóstico-tratamiento de lesiones oncológicas (Sánchez Morales, et al., 2021).

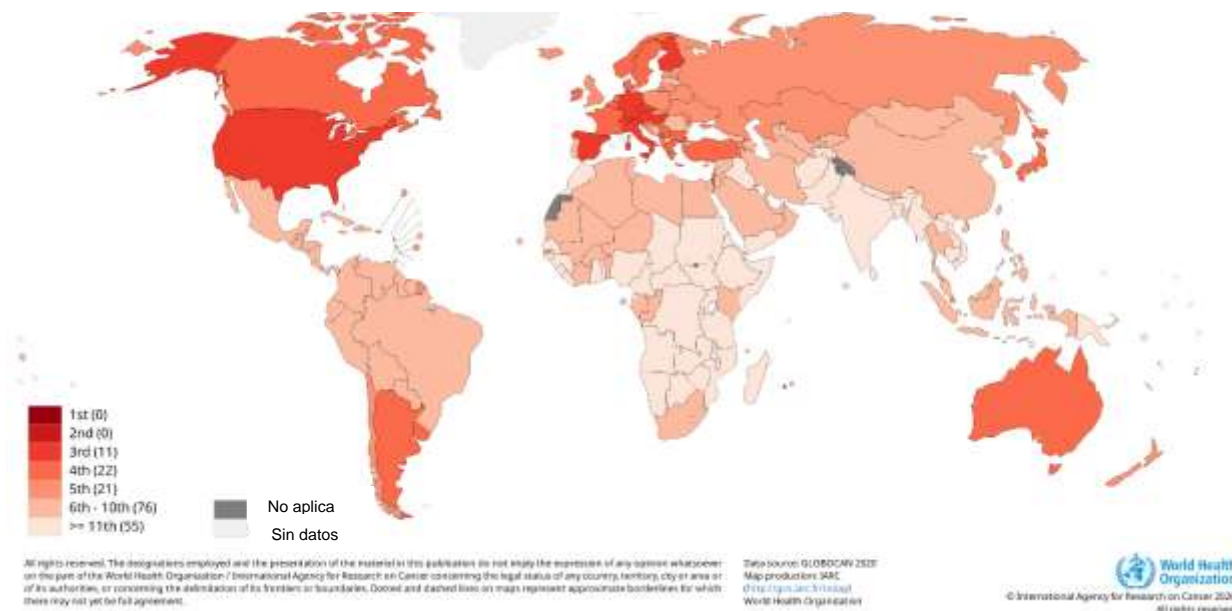


**Figura 4.** Incidencia mundial de los 15 principales tipos de cáncer



**Figura 5.** Número estimado de muertes por los 10 tipos de cáncer con mayor mortalidad

Ranking (Páncreas), número estimado de muertes en 2020, ambos sexos, todas las



**Figura 6.** Ranking por número de muertes ocasionadas por cáncer de páncreas.

En el caso de México, para el año 2015, el cáncer de páncreas representó la decimosegunda causa de cáncer con 4,489 casos diagnosticados por año. Además, las muertes por cáncer de páncreas ocasionaron el 4.9% de las muertes oncológicas (Sánchez Morales, et al., 2021), reportándose un total de 4,184 muertes en el año 2015. Con estos números, este tipo de cáncer se posiciona como la octava causa de muerte por cáncer en México (Aldaco-Sarvide, et al., 2018).

### 2.3.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo que llevan a la aparición de cáncer de páncreas pueden dividirse en factores modificables y factores no modificables. Entre los no modificables se encuentran la edad, sexo, susceptibilidad genética y presencia de diabetes mellitus (McGuigan, et al., 2018). La incidencia respecto a estos factores muestra que es una enfermedad que se presenta en un 90% en personas de 55 años o más (McGuigan, et al., 2018). Asimismo, a nivel mundial es más común la enfermedad en hombres que en mujeres. En cuanto al grupo sanguíneo, tras la recopilación de datos de varios estudios de cohorte se encontró que hay una mayor prevalencia de cáncer de páncreas en personas con tipo sanguíneo B, seguido del tipo AB, A y la menor prevalencia es en los tipos 0 (McGuigan, et al., 2018).

En el caso de la susceptibilidad genética, se ha demostrado que los pacientes con factores de riesgo familiares tienen 9 veces más probabilidades de desarrollar cáncer de páncreas que

aquellas personas donde no se ha presentado la enfermedad en su familia. Finalmente, la diabetes es un factor de riesgo bien establecido ya que una persona con esta enfermedad tiene el doble de probabilidad de desarrollar cáncer de páncreas (McGuigan, et al., 2018).

En cuanto a los factores modificables, se encuentran el consumo de cigarro, alcohol y la obesidad. Estos factores pueden eliminarse o prevenirse para así evitar la aparición de la enfermedad, sobre todo cuando ya se tienen factores no modificables (McGuigan, et al., 2018). El consumo de tabaco ha demostrado una fuerte asociación con la aparición de este tipo de cáncer en todos los estudios que lo han evaluado. En el caso del alcohol, no existe una correlación tan fuerte, sin embargo, el alcoholismo puede causar pancreatitis, lo cual es un factor de riesgo que conduce a un aumento en 13 veces la probabilidad de desarrollar cáncer si se presenta de manera crónica (McGuigan, et al., 2018). La obesidad es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial que va en aumento. Además, se ha reportado una correlación positiva entre esta enfermedad y el cáncer de páncreas, mostrando un mayor riesgo de este tipo de cáncer en pacientes obesos comparados con los no obesos (McGuigan, et al., 2018).

#### **2.3.4 Manifestaciones clínicas**

Los signos y síntomas del cáncer de páncreas están directamente relacionados con la localización del tumor, ya sea en la cabeza, cuerpo o cola del páncreas. Los síntomas más comunes son el dolor abdominal, pérdida de peso, astenia y anorexia. Cuando los tumores se encuentran en la cabeza del páncreas suele presentarse ictericia. Sin embargo, dado que estos síntomas son inespecíficos y pueden deberse a diferentes situaciones clínicas, el diagnóstico de la enfermedad es difícil. Además, en algunas ocasiones, suele desarrollarse diabetes mellitus, por lo que se debe tener especial cuidado en pacientes que hayan desarrollado recientemente esta enfermedad y que además presenten dolor abdominal y pérdida de peso, ya que pueden ser síntomas de cáncer de páncreas (Hidalgo, et al., 2017).

#### **2.3.5 Tratamiento**

Las opciones de tratamiento incluyen la cirugía, quimioterapia y radioterapia. La elección de cada una de ellas dependerá del estadio de la enfermedad. La cirugía es el único tratamiento que ofrece la cura del cáncer de páncreas y la adición de quimioterapia como adyuvante ha demostrado mejorar la supervivencia (McGuigan, et al., 2018). Sin embargo, sólo el 20 % de los pacientes son candidatos a cirugía debido al diagnóstico tardío de la enfermedad. En dicha cirugía se puede extraer todo o sólo una parte del páncreas, dependiendo el tamaño y

localización del tumor (McGuigan, et al., 2018). Por otra parte, la quimioterapia puede emplearse antes o después de la cirugía como adyuvante para reducir el tumor o eliminar células residuales e incluso puede usarse como terapia paliativa en pacientes con metástasis. El fármaco de primera línea usado es la gemcitabina. Este fármaco puede administrarse sólo o en combinación con capecitabina dependiendo la respuesta y el tipo de paciente (McGuigan, et al., 2018).

La gemcitabina, un análogo nucleósido de la desoxicitidina y presenta un amplio espectro de actividad anticancerosa contra varios tipos de tumores. Su actividad está relacionada con el metabolito difosfatado, el cual inhibe a la enzima ribonucleótido reductasa. Además, su metabolito trifosfatado puede ser incorporado en el ADN, ocasionando el bloqueo de la ADN polimerasa (Samanta, et al., 2019).

Otro régimen quimioterapéutico es el FOLFIRINOX (una combinación de oxaliplatino, 5-fluorouracilo e irinotecan). Este tratamiento genera una mejora significativa en el tiempo de supervivencia de los pacientes comparado con lo que se logra con gemcitabina. Sin embargo, también presenta mayor toxicidad, por lo que sólo se emplea en pacientes con un adecuado estado de salud (McGuigan, et al., 2018 y Conroy, et al., 2018).

La tercera opción de tratamiento es el uso de paclitaxel unido a albúmina (nab-paclitaxel). Este suele ser administrado en conjunto con gemcitabina y puede ser usado como adyuvante antes o después de cirugía o en pacientes con metástasis (Hidalgo, et al., 2017).

Cualquiera de estos tratamientos puede aumentar el tiempo de supervivencia de los pacientes, pero presentan una alta toxicidad. Los eventos adversos más comunes incluyen bajos niveles de hemoglobina, neutropenia, trombocitopenia, fatiga, diarrea, náusea, dolor abdominal, vómito, neuropatía periférica, alopecia y constipación, dando lugar a una baja calidad de vida (Hidalgo, et al., 2017). Es por ello que resulta importante la búsqueda de nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad.

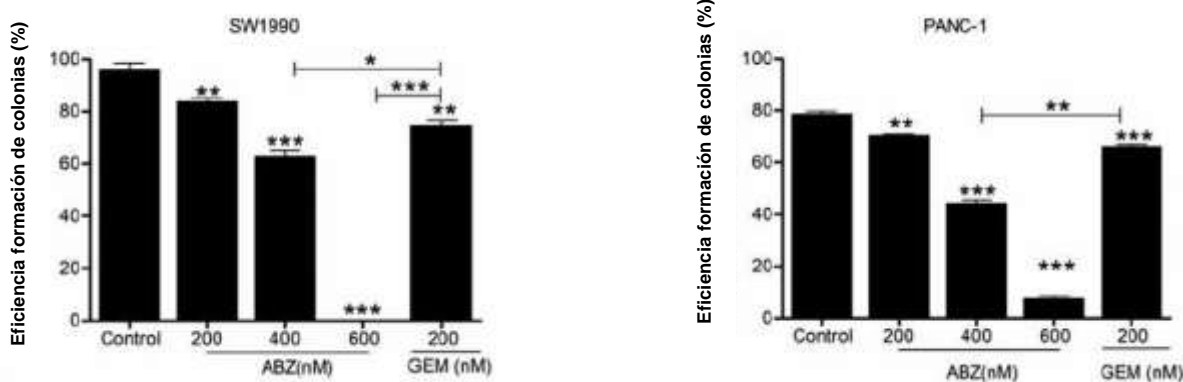
### **2.3.6 ABZ en cáncer de páncreas**

El primer reporte para el uso en este tipo de cáncer fue el realizado por Shaikh, et al., en 2017, quienes evaluaron la eficacia *in vitro* del ABZ en complejos con ciclodextrinas. Las líneas celulares evaluadas fueron MiaPaCa-2 y PanC-1. Después de 72 h, se encontró que las  $CI_{50}$  del ABZ en los complejos con  $\beta$ -ciclodextrina e hidropropil- $\beta$ -ciclodextrinas fueron menores que con el ABZ sólo, reportando valores de 50 nM para la línea MiaPaCa-2 y 125 nM para la PanC-1 (Shaikh, et al., 2017).

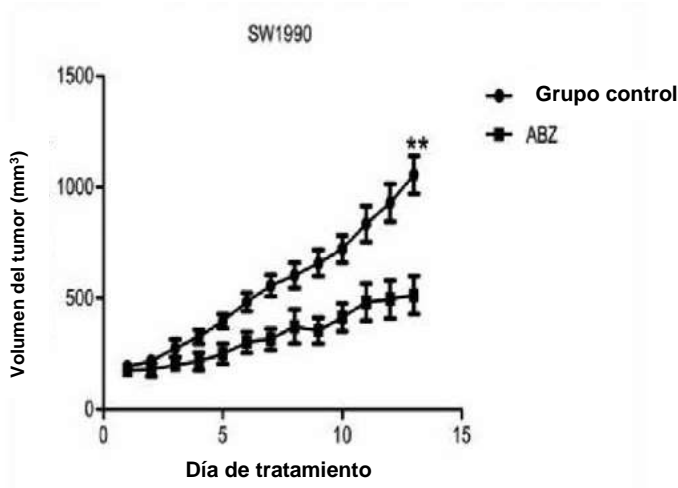
El siguiente reporte del uso de ABZ *in vitro* en células AsPC-1 fue evaluado por Lu, et al., en 2017. Ellos desarrollaron nanopartículas de albúmina conteniendo ABZ de 100 y 200 nm. Se evaluó su actividad citotóxica por 72 h y se determinó su  $Cl_{50}$  que fue de 1.32  $\mu\text{g/mL}$  para las nanopartículas de 100 nm y de 1.58  $\mu\text{g/mL}$  para las de 200 nm (Lu, et al., 2017).

En 2020, Chen y colaboradores publicaron un estudio en el cual evaluaron el efecto *in vitro* e *in vivo* de ABZ. En el estudio *in vitro* se comparó la citotoxicidad de ABZ contra gemcitabina empleando las líneas celulares SW1990 y PANC-1. Se encontró que la respuesta de ABZ a concentraciones de 400 y 600 nM, fue mejor que la gemcitabina a 200 nM, tal como se muestra en la Figura 7.

Los estudios *in vivo* se llevaron a cabo empleando células PATU8988, las cuales fueron implantadas en la axila derecha de ratones BALB/c. Se les administró una dosis de 300 mg/Kg de ABZ por vía oral por 21 días junto con radioterapia. Se encontró que el ABZ inhibe la producción de HIF-1 $\alpha$  y VEGF, lo cual aumenta la sensibilidad del tumor a la radiación e inhibe el crecimiento del tumor. De igual forma se evaluó la actividad *in vivo* del ABZ en un modelo *xenograft* empleando la línea celular SW1990, la cual fue implantada en ratones BALB/c. La dosis de ABZ fue de 300 mg/Kg/día durante 21 días y se evaluó el volumen del tumor. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 8, el grupo que recibió el ABZ mostró una disminución significativa en el volumen del tumor, lo que sugiere el efecto antitumoral del ABZ *in vivo* (Chen, et al., 2020).



**Figura 7.** Eficiencia en la formación de colonias de las células de cáncer de páncreas al ser tratadas con ABZ en diferentes concentraciones y gemcitabina. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparando contra el control (Chen, et al., 2020).



**Figura 8.** Volumen del tumor en un modelo *in xenograft* de cáncer de páncreas después de la administración de ABZ y en un grupo control

La información presentada muestra que el ABZ es un candidato promisorio para el tratamiento de cáncer, sin embargo, su principal limitante es su baja absorción por la vía oral. A continuación, se presentan algunas de las estrategias empleadas para aumentar la solubilidad y, por lo tanto, su biodisponibilidad.

## 2.4 ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA BIODISPONIBILIDAD

Entre las técnicas reportadas para mejorar la solubilidad y el perfil farmacocinético del ABZ se encuentran el uso de complejos de inclusión, el desarrollo de nanopartículas y una formulación empleando cosolventes, las cuales se describen a continuación.

### 2.4.1 Complejos de inclusión

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que han sido ampliamente usados en el desarrollo de nuevas formulaciones para aumentar la solubilidad de fármacos poco solubles, ya que, en soluciones acuosas, las ciclodextrinas forman complejos de inclusión donde el fármaco se localiza dentro de su cavidad que posee características hidrofóbicas, mientras que la parte exterior es más hidrofílica. Las ciclodextrinas más usadas son la  $\beta$ -ciclodextrina y la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, siendo esta última un derivado de la primera que tiene mayor solubilidad acuosa (Gupta & Brazeau, 2010). Justo esta última fue la empleada por Ehteda, et al. (2012) para aumentar la solubilidad de ABZ. La solución que contenía al complejo de inclusión también contenía ácido acético. Con esta técnica se logró obtener una solubilidad de



ABZ de 1970  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , comparada con 0.19  $\mu\text{g}/\text{mL}$  obtenidos con agua, lo cual es un aumento de 10 000.

Asimismo, se evaluó la farmacocinética de la formulación de ciclodextrinas administrada por vía intraperitoneal y se comparó con la administración de ABZ por la misma vía en suspensión con hidroxipropilmetilcelulosa. Después de la administración de la formulación con ciclodextrinas se obtuvieron valores de  $C_{\text{máx}}$  y ABC mucho mayores que los obtenidos con la suspensión. De igual manera, se logró una mejor actividad antitumoral en un modelo *in xenograft* de células de cáncer de colon (Ehteda, et al., 2012).

Otro tipo de complejos de inclusión que se han empleado es con el uso de curcubit[n]urils. Estos son un tipo de compuestos cíclicos que sirven de contenedores moleculares y que se unen con más fuerza a los fármacos que las ciclodextrinas. Hettiarachchi, et al. (2016) emplearon este tipo de compuestos para obtener una formulación de ABZ, con la cual evaluaron su farmacocinética y su eficacia en un modelo *in vivo* de cáncer de ovario en ratones. La formulación fue administrada vía intraperitoneal e intravenosa a dosis de 3.2 mg/Kg. Se obtuvo una biodisponibilidad intraperitoneal de 78 %. A pesar de la baja dosis administrada, ellos demuestran una buena actividad antitumoral y mencionan que puede deberse a que con esta formulación se incrementa la absorción del ABZ, dando lugar a un aumento de las concentraciones de fármaco plasma.

#### 2.4.2 Nanopartículas

Otra técnica empleada para aumentar la biodisponibilidad del albendazol es mediante nanopartículas, las cuales pueden ser poliméricas, niosomas o liposomas. En cuanto a las nanopartículas poliméricas, Zhang, et al. (2006) evaluaron nanopartículas de butilcianocrilato para administración oral, las cuales lograron una mejora en biodisponibilidad y un mayor tiempo medio de residencia comparada con una suspensión de albendazol.

Otro tipo de nanopartículas poliméricas fueron las desarrolladas por Liu, Y., et al en 2013, las cuales eran nanopartículas de quitosano con tripolifosfato como agente entrecruzante y poloxamero 188 como disolvente auxiliar. Dichas nanopartículas lograron una buena eficiencia de encapsulamiento del albendazol. Asimismo, en un estudio de farmacocinética por vía oral, las nanopartículas lograron una biodisponibilidad de 146.05% para el ABZ comparada con una suspensión oral.

Recientemente se reportó una formulación de albendazol unido a albúmina (tecnología “nab”). Esta tecnología “nab” es una asociación no covalente de fármacos hidrofóbicos con la albúmina, con lo cual se forman nanopartículas que son suspendidas en un medio acuoso. Esta

tecnología es actualmente usada en el “Abraxane” (nab-paclitaxel). Los resultados mostraron que, con esta tecnología, el ABZ presentó eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de ovario empleando una dosis muy baja de 10 µg/mL (Noorani, et al., 2015).

Otro tipo de nanopartículas que se ha evaluado son los niosomas. Estos son vesículas formadas por surfactantes no iónicos que pueden atrapar fármacos en su interior. Para el caso del ABZ, Karimunnisa, *et al.* (2018) prepararon niosomas de Span 60® y colesterol, los cuales posteriormente fueron PEGilados. Dichos niosomas mejoraron la solubilidad del albendazol, así como sus propiedades farmacocinéticas ya que al ser administrados por vía intravenosa a una dosis de 20 mg/kg, empleando un modelo de rata, se logró un aumento del área bajo la curva y el tiempo medio de residencia del fármaco en el cuerpo.

Finalmente, Viranov et al. (2018) evaluaron el efecto de diferentes surfactantes en la solubilidad de ABZ para formular liposomas y encontraron que los mejores candidatos para la aplicación parenteral era una mezcla de 60% de dioctil sulfosuccinato de sodio y 40% del fosfolípido dipalmitoil-fosfatidilglicerol de sodio. En este sistema de administración lograron una solubilidad de 4.4 mg/mL de ABZ.

Aun cuando los resultados han mostrado un incremento de la solubilidad y biodisponibilidad de ABZ, la mayoría de ellas tienen algunas limitaciones. Por ejemplo, el tamaño de las nanopartículas nab puede limitar el acceso del fármaco al tumor (Noorani, et al., 2015). En el caso del uso de tensoactivos, la necesidad de utilizar condiciones ácidas (pH=3) es una limitante ya que podría causar irritación local en la administración parenteral (Vinarov, et al., 2018).

### 2.4.3 Cosolventes

Una de las estrategias más comunes en la formulación de fármacos insolubles es el uso de cosolventes orgánicos. En términos de aumento de solubilidad, el uso de cosolventes es uno de los mejores métodos dentro de las técnicas de formulación de fármacos poco solubles, permitiendo su administración en forma de solución. El proceso es sencillo, más económico y no es necesario llevar a cabo estudios de tamaño de partícula o la evaluación de velocidad de disolución y/o liberación del fármaco (Gupta & Brazeau, 2010).

Existen varios productos en el mercado que emplean esta tecnología, como son el VePesid® (etopósido), Valium® (diazepam), Nembutal® (Pentobarbital), entre otros (Gupta & Brazeau, 2010). Estos productos suelen estar fabricados para uso intramuscular o intravenoso y deben cumplir con los requisitos de cantidades máximas permitidas de cosolventes indicadas por la FDA (U.S Food and Drug Administration, 2020).

Además, cuando esta estrategia no permite alcanzar la concentración adecuada del fármaco, es posible utilizar soluciones no acuosas compuestas solamente por cosolventes, siempre que se cumpla con los límites máximos de cosolventes a administrar (Strickley, 2004). Entre las ventajas de las formulaciones con cosolventes se incluyen las siguientes: no se necesita una tecnología costosa para producir la forma farmacéutica, el proceso de esterilización es sencillo y se facilita el proceso de administración (Yeh, et al., 2009).

En el caso del ABZ, Álvarez, et al. (2008) prepararon una formulación de cosolventes para un estudio preclínico de interacción entre ABZ e ivermectina. La formulación consistía en 80% propilenglicol y 20% dimetilsulfóxido (DMSO) y lograron solubilizar 20 mg/mL de ABZ. Esto permitió que, al ser administrada la formulación en ovejas, se pudieran cuantificar las concentraciones de ABZ por las primeras 3 h en un rango entre 0.1 y 10  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, a pesar de la alta cantidad disuelta alcanzada, tales proporciones de propilenglicol pueden producir hemólisis (Gupta & Brazeau, 2010).

Chow y colaboradores (2008) reportaron la preparación de una formulación intravenosa de mebendazol empleando un sistema con cosolventes. El sistema estaba conformado por polietilenglicol 400 (PEG 400), dimetilacetamida y DMSO y lograron solubilizar hasta 3.488 mg/mL de mebendazol. Dadas las características similares entre el mebendazol y el ABZ, la formulación de este último en un sistema de cosolventes podría ser una buena opción para la administración parenteral.

#### **2.4.4 Profármacos**

Otro método para aumentar la solubilidad de los fármacos es mediante la síntesis de profármacos. Un profármaco es un compuesto inactivo, biorreversible, el cual se convertirá en el fármaco al ser administrado *in vivo*, ya sea mediante acción enzimática o química. Esta modificación en la estructura del fármaco permite cambiar sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo la solubilidad. Una de las principales características de los profármacos es que puedan liberar rápida y cuantitativamente al compuesto activo en condiciones fisiológicas (Gupta & Brazeau, 2010).

Para fármacos poco solubles, existen en general dos técnicas de obtención de profármacos que mejoren esta propiedad. La primera es la adición de un grupo hidrofílico que permita aumentar las interacciones intermoleculares con el agua. La segunda es la alteración de la estructura cristalina, favoreciendo las interacciones con moléculas de disolvente sobre las interacciones entre moléculas del mismo compuesto (Gupta & Brazeau, 2010).

Entre los profármacos más empleados en el área farmacéutica se encuentran los ésteres, debido a la amplia distribución de las esterases en el cuerpo humano. Dentro de este grupo de profármacos, se encuentra un subtipo especial que son los ésteres de fosfato, los cuales son muy solubles en agua, especialmente como sales de sodio, además de que son fácilmente hidrolizables *in vivo*. Un ejemplo de este tipo de profármacos que se encuentra actualmente en el mercado es la fosfenitoína, que es el profármaco de la fenitoína (Gupta & Brazeau, 2010).

La fosfenitoína es utilizada tanto por vía intravenosa como intramuscular para el tratamiento de convulsiones. Este profármaco es transformado a fenitoína por las fosfatasas del músculo y la sangre. La biodisponibilidad absoluta de la fenitoína después de la administración del profármaco IV o IM es de 100%, siendo la vida media de conversión de entre 7 a 15 min (Fischer, et al., 2003).

Este tipo de profármacos también se ha empleado exitosamente en los benzimidazoles. En el año 2008, Chassaing, et al., sintetizaron profármacos fosfonooximetilados de diferentes benzimidazoles, siendo el más importante, el fenbendazol, cuya solubilidad acuosa fue de 130 mM. Asimismo, después de la administración oral del profármaco en cerdos se logró obtener un  $C_{máx}$  y un ABC mayores comparado con los obtenidos después de administrar una suspensión de flubendazol, mostrando las ventajas del profármaco tras su administración *in vivo*.

En el año de 2014, Flores-Ramos, et al., publicaron los resultados de la síntesis de un profármaco fosfonooximetilado de un derivado benzimidazólico empleado para tratamiento de fascioliasis, encontrando que la molécula presenta buena estabilidad y un aumento en la solubilidad de 50,000 veces comparado con el fármaco puro, demostrando así la gran utilidad de este grupo de profármacos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El ABZ es un fármaco seguro y eficaz que ha sido usado por muchos años en la clínica; sin embargo, posee una baja solubilidad acuosa, lo cual, junto con su amplio metabolismo de primer paso, dan lugar a una absorción baja y variable por la vía oral.

El desarrollo de formulaciones para su administración parenteral permitirá mejorar la biodisponibilidad y disminuir la variabilidad de las concentraciones plasmáticas, lo cual podría ser una buena estrategia para el tratamiento de enfermedades sistémicas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una formulación parenteral de albendazol que permita mejorar su perfil farmacocinético.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar un profármaco fosfonooximetilado de albendazol.
- Desarrollar una formulación parenteral de albendazol empleando la técnica de cosolventes.
- Evaluar la estabilidad de la formulación con cosolventes.
- Evaluar la farmacocinética del albendazol después de ser administrado por vía intravenosa.
- Calcular la biodisponibilidad absoluta del albendazol por la vía oral.
- Evaluar la farmacocinética del albendazol después de la administración del profármaco por las vías intravenosa e intramuscular.
- Calcular la biodisponibilidad absoluta del albendazol después de la administración del profármaco por vía intramuscular.

## 5. HIPÓTESIS

Las formulaciones de albendazol desarrolladas aumentarán la biodisponibilidad del albendazol disminuyendo la formación del principal metabolito, sulfóxido de albendazol.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

#### ➤ Materiales

- Cámara para cromatografía de capa fina
- Aguja metálica
- Jeringas
- Placas de vidrio cubiertas de gel de sílice malla 60, marca Merck.
- Tubos de rosca de 10 x 1.2 cm
- Tubos de ensayo de 13 x 1.6 cm
- Matraces volumétricos de 5, 10, 20, 50, 100 y 1000 mL
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 500 mL
- Pipetas Pasteur
- Jeringas de plástico
- Filtros de Nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro
- Micropipeta de 2 – 20  $\mu\text{L}$
- Micropipetas de 20 – 200  $\mu\text{L}$
- Micropipeta de 100 – 1000  $\mu\text{L}$
- Micropipeta de 500 – 5000  $\mu\text{L}$
- Catéter 24G
- Jeringas 21G
- Microtubos de 1.5 mL
- Tubos con EDTA como anticoagulante

#### ➤ Reactivos

- Albendazol (Sigma Aldrich®). Pureza 98.0%
- Sulfóxido de albendazol (Santa Cruz Biotechnology, Inc) Pureza 98.0%

#### Reactivos usados para la síntesis del profármaco

- Carbonato de Cesio ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ), hidruro de sodio (NaH), dioxano, HCl 4 M en dioxano y ácido cloroacético (Sigma Aldrich®)

- Dimetilformamida (DMF), diclorometano (DCM), cloroformo, metanol (MeOH), acetato de etilo (AcOEt), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), trietilamina (J.T. Baker®)
- Fosfato de di-*terc*-butil clorometilo (AccelaChemBio Co)
- Fosfatasa alcalina EC 3.1.3.1 (tipo VII-S: de mucosa intestinal bovina) (Sigma Aldrich®)

**Reactivos usados para desarrollo de la formulación en sistema de cosolventes**

- Agua destilada (Elix® 3 y Milli Q®, Millipore®)
- Kolliphor® P188 (Poloxamero 188), Pluronic® F-127 (Poloxámero 127), Polietilenglicol (PEG) 400, Ácido fórmico (Sigma Aldrich®)
- Tween® 20, Tween® 80, Glicerina, Cremofor®, Propilenglicol, Aceite de castor, Miristato de isopropilo, PEG 600 (Gattefossé)
- Etanol anhidro (EtOH), Dimetil sulfóxido (DMSO), Dimetil acetamida (DMA), Benzoato de sodio (J.T. Baker®)

**Reactivos utilizados para el desarrollo del método analítico**

- Éter etílico, acetonitrilo (ACN), metanol, hidróxido de sodio (NaOH), fosfato monobásico de amonio (J.T. Baker®)

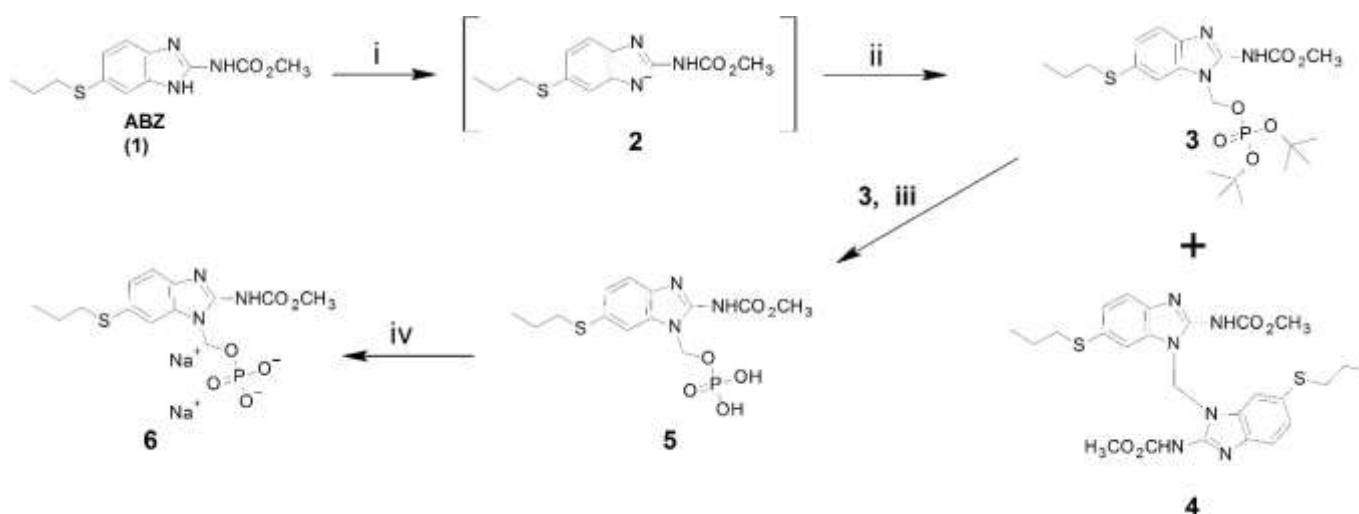
➤ **Equipos**

- Balanza granataria OHAUS E4000
- Balanza analítica Sartorius modelo ENTRIS 224I-1S
- Rotaevaporador Büchi R-215 con baño B-490 acoplado a bomba de vacío Vacuubrand modelo MD 4C con regulador de vacío integrado CVC211.
- Parrilla automática IKA modelo IKAMAG RET básica con sensor de temperatura
- Espectrofotómetro Shimadzu UV-1900
- Baño de ultrasonido Fisher Scientific FS60
- Cromatógrafo de líquidos con detector UV Shimadzu LC-10ATvp
- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu Prominence acoplado a un detector de masas/masas API 4500 ABSciex.
- Centrífuga Eppendorf 5416
- Baño de agitación horizontal Shel-Lab SWBR17



## 6.2 PREPARACIÓN DEL PROFÁRMACO FOSFONOXIMETILADO DE ABZ

El método utilizado para la síntesis del profármaco fosfonooximetilado de ABZ, se basó en las metodologías reportadas por Chassaing, et al., 2008 y Flores-Ramos, et al., 2014. Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo atmósfera de nitrógeno. El avance de las reacciones se realizó por cromatografía de capa fina empleando cloroformo:acetato de etilo:metanol: ácido acético (60:35:5:0.5) como sistema de elución. La síntesis se llevó a cabo siguiendo la secuencia de reacciones de la Figura 9.



**Figura 9.** Ruta de síntesis para obtener al profármaco de ABZ.

(i) NaH o Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, temperatura ambiente, 3 h; (ii) Fosfato de di-*tert*-butil clorometiilo, DMF, 0°C, 1 h, después, 6 h a temperatura ambiente; (iii) HCl 4 M en dioxano, temperatura ambiente, 2 h; (iv) NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O, temperatura ambiente

### 6.2.1 Preparación de (1-(((di-*tert*-butoxifosforil)oxi)metil)-6-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (3) a partir de ABZ (1)

Se preparó una suspensión de ABZ (1) en 25 mL de dimetil formamida (DMF) anhidra (1,0062 g, 3,77 mmol), se añadió Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,8700 g, 5,74 mmol) y se agitó durante 3 h a temperatura ambiente. Se disolvió el fosfato de di-*tert*-butil clorometilo (1,464 g, 5,66 mmol) en DMF anhidra en un baño de hielo. Después se añadió gota a gota la mezcla de ABZ preparada previamente mientras se agitaba y se mantuvo a 0°C durante 1 h. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Se añadió diclorometano (DCM) (400 mL) y la mezcla de reacción se lavó con NaHCO<sub>3</sub> al 2% (3 x 300 mL). Se realizó un lavado final con agua (300 mL). La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporaron los compuestos volátiles en el rotavapor. La resina resultante conteniendo el compuesto 3 se utilizó sin purificar para el paso siguiente.

### 6.2.2 Preparación de (1-((fosfonooxi)metil)-6-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il)carbamato de metilo (5)

La resina anterior (que contenía el compuesto **3**) disuelta en 1,4-dioxano (10 mL) se enfrió en un baño de hielo y se trató con una disolución 4 M de HCl en 1,4-dioxano (15 mL) añadiéndola gota a gota. La mezcla se agitó 2 h a temperatura ambiente. Después se eliminó el disolvente al vacío para obtener el compuesto **5**.

### 6.2.3 Preparación de (2-((metoxicarbonil)amino)-6-(propiltio)-1H-benzimidazol-1-il)metilfosfato sódico (6)

El compuesto **5** se disolvió en MeOH (7 mL) y se le añadió gota a gota con agitación una solución de NaOH en MeOH:agua (6:3) hasta alcanzar pH 7. Los disolventes volátiles se eliminaron en el rotavapor y el residuo sólido se suspendió en etanol anhidro con agitación durante 3 h. El sólido (compuesto **6**) se filtró, se volvió a suspender y se mantuvo con agitación durante 24 h en DCM para eliminar el ABZ residual y otros compuestos no polares. Al sólido obtenido se le agregó MeOH y se mantuvo en agitación continua durante 24 h para disolver el profármaco. Posteriormente, se filtró y el disolvente se evaporó al vacío. El sólido recuperado se secó al vacío durante 72 h. El compuesto se caracterizó por RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C y RMN <sup>31</sup>P, así como por HPLC-MS.

### 6.2.4 Determinación de pureza por RMN cuantitativa

Debido a que no existe una sustancia de referencia con la cual se pueda comparar la pureza de la molécula obtenida, se empleó la RMN cuantitativa. Para ello se determinó el espectro de RMN de <sup>1</sup>H del polvo final empleando ácido cloroacético como estándar interno. La muestra se disolvió en metanol deuterado.

Una vez obtenido el espectro, se integraron los picos correspondientes al profármaco y al estándar interno. Se empleó la siguiente ecuación para calcular la pureza (Mahajan, et al., 2012):

$$Pureza = \frac{\text{Área analito}}{\text{Área EI}} * \frac{\#protones\ estándar}{\#protones\ analito} * \frac{masa\ estándar}{masa\ analito} * \frac{PM\ analito}{PM\ estándar} * pureza\ estándar$$

### **6.3 SOLUBILIDAD DEL PROFÁRMACO**

#### **6.3.1 Metodología analítica para cuantificar el profármaco**

Para la cuantificación del profármaco se empleó un método analítico por HPLC-UV, utilizando una columna Spherisorb ODS1 de 4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y una solución de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1%:MeOH:ACN (30:50:20) como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección fue de 40  $\mu\text{L}$  y la longitud de onda seleccionada fue 245 nm. El rango de la curva de calibración fue de 10 a 90  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **6.3.2 Prueba de solubilidad del profármaco**

Para la prueba, se seleccionaron las soluciones amortiguadoras de pH 6.0, 7.4 y 8.0, que son bien toleradas para la administración parenteral. Para determinar la solubilidad, se utilizó el método de shake flask. A cada una de las soluciones, se le agregó una cantidad en exceso del profármaco y se mantuvo en agitación durante 48 h a temperatura de 25 °C. Pasado este tiempo, las muestras se filtraron empleando un filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se tomó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$ , se añadieron 10 mL de fase móvil y se cuantificó empleando el método HPLC previamente descrito.

### **6.4 HIDRÓLISIS DEL PROFÁRMACO**

Se disolvió 1 mg de profármaco en 1.2 mL disolución amortiguadora de Tris/HCl pH 8.5 y se colocó en un baño de agua a 37°C. Después de 10 minutos, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  (88 unidades) de fosfatasa alcalina. Se tomaron muestras a los 10, 20, 30 segundos y a los 1, 3, 5, 10 y 90 minutos, y se mezclaron con 900  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo para detener la actividad enzimática. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 14,000 rpm. Para determinar la formación de ABZ se empleó el mismo método cromatográfico descrito en la sección 6.5.

A partir de los datos de cantidad vs tiempo se determinó la vida media de hidrólisis del profármaco.

### **6.5 DESARROLLO DE FORMULACIÓN EMPLEANDO COSOLVENTES**

El otro procedimiento seleccionado para aumentar la solubilidad del ABZ y desarrollar una formulación parenteral, fue el uso de cosolventes. El primer paso fue determinar la solubilidad de ABZ en diferentes disolventes puros y posteriormente en mezclas de los mismos en los porcentajes permitidos para su uso en formulaciones inyectables.

### 6.5.1 Metodología analítica para cuantificar ABZ en cosolventes

Para la cuantificación de ABZ, se empleó un método por espectrofotometría UV o bien un método cromatográfico para los cosolventes que presentaron interferencia a la longitud de onda de absorción del ABZ.

Para el método UV se utilizó una curva de calibración de 1.0 a 25.0  $\mu\text{g/mL}$  preparada en solución de HCl 0.1 N. Las muestras se diluyeron empleando este mismo disolvente. La longitud de onda seleccionada fue de 305 nm.

Para el método cromatográfico se utilizó una columna Hypersil ODS 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm y una solución de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.011 M:MeOH:ACN (30:50:20) como fase móvil a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. El volumen de inyección fue de 50  $\mu\text{L}$  y la longitud de onda fue 295 nm. El rango de la curva de calibración fue de 3.0 a 25  $\mu\text{g/mL}$ .

Para demostrar la confiabilidad del análisis, se evaluó la linealidad y precisión en dos días diferentes para ambos métodos.

### 6.5.2 Pruebas de solubilidad

Para esta prueba, se utilizó el método de shake flask. En tubos de ensayo con tapón de rosca, se colocaron los diferentes disolventes o soluciones a evaluar y se agregó una cantidad en exceso de ABZ. Los tubos se mantuvieron en agitación durante 48 h a temperatura de 25 °C. Pasado este tiempo, las muestras se filtraron a través de un filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  para su posterior cuantificación empleando el método espectrofotométrico o bien por HPLC de acuerdo con el disolvente utilizado.

### 6.5.3 Diseño de la formulación

Tomando en cuenta los datos de solubilidad, toxicidad y hemólisis, se seleccionaron la dimetilacetamida (DMA), polietilenglicol 400 (PEG 400) y etanol como cosolventes. Para determinar en cuál mezcla de cosolventes se obtenía la mayor solubilidad del ABZ, se empleó un diseño de experimentos de superficie de respuesta, factorial  $3^2$ . Los factores evaluados fueron la concentración de DMA y PEG 400, mientras que la concentración de EtOH se mantuvo fija a 25% v/v. Los niveles evaluados fueron los siguientes:

Factor	Nivel		
	-1	0	1
Dimetilacetamida (% v/v)	15	22.5	30
PEG 400 (% m/v)	30	40	50

El diseño se llevó a cabo empleando el programa Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.18. La prueba de solubilidad se llevó a cabo de acuerdo con lo descrito en la sección 6.5.2. La cuantificación se llevó a cabo empleando el método espectrofotométrico. Los experimentos se realizaron de manera aleatorizada y por triplicado.

A partir de los resultados obtenidos, se eligió la formulación cuya concentración de ABZ fue la más alta, y se denominó formulación F1.

Para disminuir el riesgo de hemólisis, se decidió mejorar la formulación añadiendo diferentes soluciones acuosas al EtOH (Tabla 3) y manteniendo la proporción de DMA y PEG 400. Se eligió la formulación que presentó la mayor cantidad solubilizada de ABZ, la cual se denominó F2. Una vez seleccionadas las dos formulaciones, se llevaron a cabo los estudios de estabilidad y de hemólisis.

**Tabla 3.** Composición de la tercera fase evaluada

Formulación	Composición de la tercera fase
AA	Benzoato de sodio 6% en EtOH al 60%
AB	EtOH al 60%
AC	NaCl 0.9% en EtOH al 60%
BA	Benzoato de sodio 6% en EtOH al 70%
BB	EtOH al 70%
BC	NaCl 0.9% en EtOH al 70%
CA	Benzoato de sodio 6% en EtOH al 80%
CB	EtOH al 80%
CC	NaCl 0.9% en EtOH al 80%

## 6.6 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Las condiciones de estabilidad evaluadas fueron refrigeración y temperatura ambiente. Para el estudio, se prepararon las 2 formulaciones a una concentración de 5 µg/mL de ABZ, Se tomaron muestras al inicio (tiempo 0) y a los 6 y 12 meses, las cuales se analizaron empleando el método cromatográfico previamente validado. Se registró también el valor de pH y la apariencia. El porcentaje de diferencia se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$\%diferencia = \frac{\text{Concentración final} - \text{Concentración inicial}}{\text{Concentración inicial}} * 100$$

Criterio de aceptación: El porcentaje de diferencia no debe ser mayor al 10%.

## 6.7 EVALUACIÓN DE HEMÓLISIS

Se empleó sangre de conejos, la cual se obtuvo a partir de animales que iban a ser sacrificados. El anticoagulante usado fue EDTA.

La metodología empleada fue una combinación de las reportadas por Evans, et al. (2013) y Dal Negro, et al. (1996). El esquema general se muestra en la Figura 10.

Se emplearon dos controles de hemólisis, uno positivo y otro negativo. El control positivo fue una solución de Tritón® X100 al 1%, mientras que el control negativo fue solución salina estéril 0.9%. Las muestras se analizaron por triplicado.

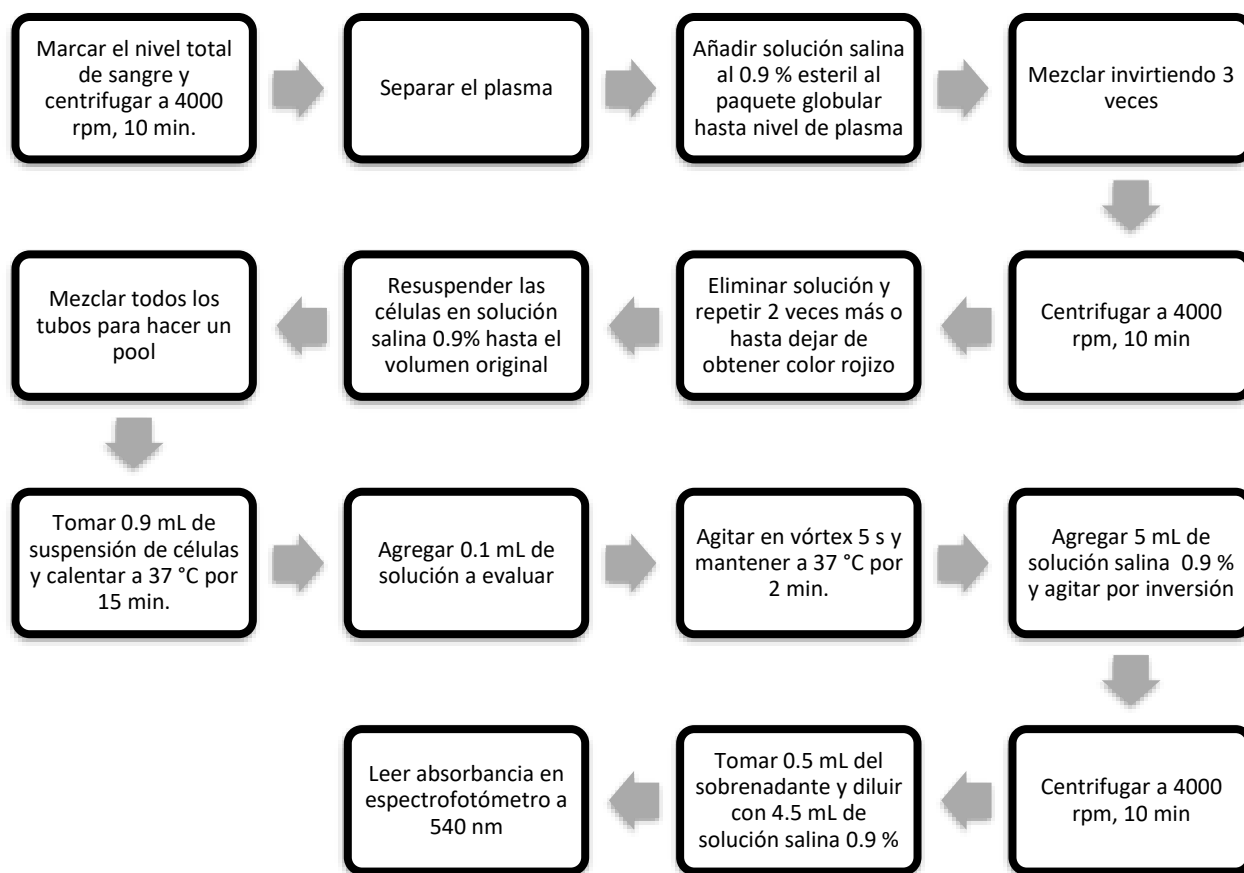


Figura 10. Metodología para la prueba de hemólisis

## 6.8 ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, con el número FQ/CICUAL/435/21. El estudio se llevó a cabo en la sala 2, en el área de Experimentación Animal de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química de la UNAM.

Los animales se mantuvieron en jaulas individuales, pero manteniendo un enriquecimiento social sin contacto. Durante la toma de muestras, se mantuvieron en cepos para su inmovilización. Los conejos se mantuvieron en ayuno por 12 h con agua *ad libitum* antes de cada administración.

El estudio se realizó en doce conejos blancos machos de Nueva Zelanda (2.5 - 3.5 kg). Los conejos se asignaron aleatoriamente a dos grupos diferentes. En un primer periodo, el grupo A recibió una dosis oral de 0.8 mL de suspensión de Zentel® (40 mg ABZ/mL) mientras que el grupo B recibió 1 mL de la solución acuosa del profármaco por vía intramuscular a una concentración equivalente a 15,88 mg/mL de ABZ. En el segundo periodo, después de 15 días de lavado, el grupo A recibió 3 mL de la formulación F2 por vía intravenosa (5 mg/mL) en la vena auricular marginal y el grupo B recibió 1 mL del profármaco por vía intravenosa a una concentración equivalente a 15.88 mg/mL de ABZ. Inmediatamente antes de la administración, las formulaciones parenterales se filtraron a través de filtros de nylon de 0.22 µm.

Se tomaron muestras de sangre de la vena auricular marginal antes de la dosificación (0 h) y a las 20, 40 min, 1, 1.5, 2, 3.5, 5, 8, 12 y 24 h después de la administración. En la administración parenteral, se añadió un tiempo de muestreo a los 10 min. Las muestras se recolectaron en tubos con EDTA y se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min para separar el plasma. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

### 6.8.1 Método analítico para cuantificar ABZ y ABZSO

Para cuantificar el ABZ y su principal metabolito ABZSO en plasma, se desarrolló un método por cromatografía de líquidos acoplada a un detector Masas/Masas.

#### 6.8.1.1 Preparación de soluciones

- **Soluciones generales**

##### Ácido fórmico 0.1%

En un matraz volumétrico de 1 L, se colocaron 500 mL de agua destilada. Se añadió 1 mL de ácido fórmico y se agitó para mezclar. Se llevó al aforo con agua destilada.

### **Fase móvil**

Se mezclaron 300 mL de la solución de ácido fórmico 0.1% con 700 mL de MeOH grado HPLC. Los volúmenes fueron medidos con probeta. Se agitó vigorosamente para mezclar y se llevó al sonicador por 20 min para desgasificar antes de su uso.

- **Soluciones Stock**

#### **Solución Stock de ABZ 1 mg/mL**

Se pesaron 10 mg de ABZ, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se añadió 0.1 mL de ácido fórmico y 5 mL de DMSO. Se sonicó la mezcla por 10 min. Se llevó al aforo con metanol.

#### **Solución Stock de ABZSO 1 mg/mL**

Se pesaron 10 mg de ABZSO, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se añadió 0.1 mL de ácido fórmico y 5 mL de DMSO. Se sonicó la mezcla por 10 min. Se llevó al aforo con metanol.

#### **Solución Stock de carbamacepina (CBZ) 0.5 mg/mL**

Se pesaron 5 mg de CBZ, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL y se añadió 4 mL de metanol. Se sonicó la mezcla por 10 min. Se llevó al aforo con metanol.

- **Soluciones estándar**

#### **Solución estándar 1 de ABZ o ABZSO 100 000 ng/mL (STD 1)**

Se tomó 1 mL de la solución Stock de ABZ o ABZSO, y se aforó a 10 mL con MeOH conteniendo 0.1% de ácido fórmico.

#### **Solución estándar 2 de ABZ o ABZSO 10 000 ng/mL (STD 2)**

Se tomó 1 mL de la solución STD 1 de ABZ o ABZSO y se aforó a 10 mL con MeOH conteniendo 0.1% de ácido fórmico.

#### **Solución estándar 3 de ABZ o ABZSO 1 000 ng/mL (STD 3)**

Se tomó 1 mL de la solución STD 2 de ABZ o ABZSO y se aforó a 10 mL con MeOH conteniendo 0.1% de ácido fórmico.



### Solución estándar de 2000 ng/mL de CBZ (STD EI)

Se tomaron 40  $\mu\text{L}$  de la solución stock de CBZ y se aforó a 10 mL con MeOH.

- **Soluciones de trabajo**

Se prepararon las siguientes soluciones de trabajo conteniendo ABZ y ABZSO, las cuales fueron utilizadas para preparar la curva de calibración y las muestras control.

**Tabla 4.** Preparación de soluciones de trabajo

Solución	Sol. ABZ	Vol. STD ABZ ( $\mu\text{L}$ )	Sol. ABZSO	Vol. STD ABZSO ( $\mu\text{L}$ )	Vol. Fase móvil ( $\mu\text{L}$ )	[ABZ] ng/mL	[ABZSO] ng/mL
ST1	STD 3	10	STD 3	200	790	10	200
ST2	STD 3	20	STD 2	40	940	20	400
ST3	STD 3	100	STD 2	80	820	100	800
ST4	STD 3	200	STD 2	200	600	200	2000
ST5	STD 2	100	STD 1	40	860	1000	4000
ST6	STD 2	200	STD 1	100	700	2000	10000
ST7	STD 1	100	STD 1	200	700	10000	20000
ST8	STD 1	200	STD 1	300	500	20000	30000
ST9	STD 3	25	STD 2	60	915	30	600
ST10	STD 2	50	STD 2	300	650	500	3000
ST11	STD 2	150	STD 1	150	700	1500	15000
ST12	STD 1	150	STD 1	250	600	15000	25000
ST13	STD 1	300	STD 1	500	200	30000	50000

- **Curva de calibración y muestras control**

En la Tabla 5 se describe la metodología utilizada para la preparación de la curva de calibración, mientras que en la Tabla 6 se presenta la metodología para la preparación de las muestras control. En todos los casos se empleó plasma para el aforo.

**Tabla 5.** Preparación de curva de calibración para la cuantificación de ABZ y ABZSO empleando el método LC-MS/MS

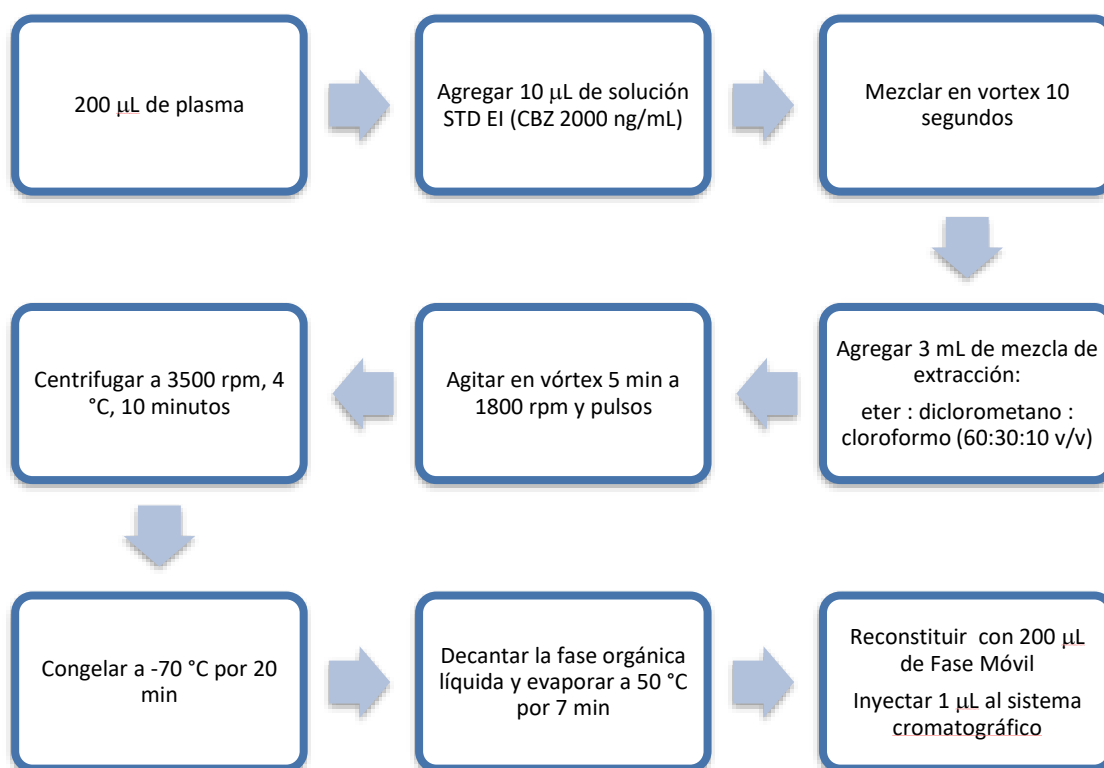
Nivel de la curva	Solución	Vol. ST ( $\mu\text{L}$ )	Vol. Plasma ( $\mu\text{L}$ )	[ABZ] ng/mL	[ABZSO] ng/mL
CC1	ST1	25	475	0.5	10.0
CC2	ST2	25	475	1.0	20.0
CC3	ST3	25	475	5.0	40.0
CC4	ST4	25	475	10.0	100.0
CC5	ST5	25	475	50.0	200.0
CC6	ST6	25	475	100.0	500.0
CC7	ST7	25	475	500.0	1000.0
CC8	ST8	25	475	1000.0	1500.0

**Tabla 6.** Preparación de muestras control de ABZ y ABZSO en plasma

Nivel de la curva	Solución	Vol. ST (µL)	Vol. Plasma (µL)	[ABZ] ng/mL	[ABZSO] ng/mL
MCB	ST9	25	475	1.5	30.0
MCM1	ST10	25	475	25.0	150.0
MCM2	ST11	25	475	75.0	750.0
MCA	ST12	25	475	750.0	1250.0
MCD	ST13	25	475	1500.0	2500.0

### 6.8.1.2 Metodología analítica

La extracción de los analitos a partir de las muestras de plasma se llevó a cabo como se muestra en la Figura 11.



**Figura 11.** Procedimiento de extracción de ABZ y ABZSO en muestras de plasma

Las muestras se inyectaron empleando las condiciones cromatográficas indicadas en la Tabla 7. Para la detección se empleó el modo MRM (multiple reaction monitoring). Las condiciones de fragmentación para cada analito y el EI se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 7.** Condiciones cromatográficas para ABZ y ABZSO en plasma

Parámetro	Condición
Cromatógrafo	Shimadzu Prominence
Detector	AB Sciex Triple Quad 4500
Modo de detección	MRM
Columna cromatográfica	Sepax HP-C18 (4.5 x 150 mm, 5 µm)
Precolumna	HP-C18 (4 x 10 mm, 5 µm)
Temperatura de columna	30 °C
Fase móvil	Metanol:ácido fórmico 0.1% (70:30 v/v)
Flujo	0.7 mL/min
Volumen de inyección	1 µL
Temperatura automuestreador	10 °C

**Tabla 8.** Condiciones para la fragmentación usadas en el modo MRM.

Compuesto	Transición	DP (eV)	EP (eV)	CE (eV)	CXP (eV)
<b>ABZ</b>	266 > 234 m/z	30	4	24	12
<b>ABZSO</b>	282 > 240 m/z	20	4	19	9
<b>CBZ</b>	237 > 194 m/z	45	4	22	11

Finalmente, las condiciones de temperatura y flujo de los gases fueron las siguientes:

\*Gas Cortina (CUR): 40 psi

\*Voltaje del capilar para formación del spray (IS): 5000 eV

\*Temperatura: 500 °C

\*Gas 1: 20 psi

\*Gas 2: 40 psi

### 6.8.1.3 Validación del método analítico

Para la validación del método se utilizó plasma humano. Se realizó también la prueba de matriz sustituta con plasma de conejo para evaluar la no interferencia de la matriz. Los parámetros que se evaluaron fueron: selectividad, efecto de acarreo, efecto de matriz, matriz sustituta, curva de calibración, límite inferior de cuantificación, precisión como repetibilidad y reproducibilidad, exactitud y estabilidad en automuestreador.

#### 6.8.1.3.1 Selectividad

Se evaluó la no interferencia de compuestos endógenos del plasma en el tiempo de retención de ABZ y ABZSO empleando: plasma blanco humano de 4 donadores diferentes, plasma de 2 conejos diferentes y plasma hemolizado, sin la adición de los analitos ni del EI. También se analizaron la muestra cero y muestras de plasma adicionadas con ABZ y ABZSO a la

concentración correspondiente al límite inferior de cuantificación (LIC) (0.5 ng/mL de ABZ y 10.0 ng/mL de ABZSO) y con el EI. Se identificaron las señales cercanas a los tiempos de retención (tr) de los analitos y del EI y se determinó su respuesta cromatográfica.

*Criterio de aceptación:* La respuesta cromatográfica de las interferencias cercanas al tr del analito debe ser menor al 20% de la respuesta obtenida en el LIC y menores al 5% de la respuesta del EI.

#### **6.8.1.3.2 Efecto de matriz**

Se procesaron e inyectaron 10 muestras de plasma, cinco con la muestra control baja (MCB) y cinco con la muestra control alta (MCA) de ABZ y de ABZSO. Al mismo tiempo se inyectaron por quintuplicado soluciones a la concentración del MCB y de la MCA de ambos analitos. Se compararon las respuestas analíticas del ABZ y del ABZSO en las muestras de plasma con respecto a las obtenidas en solución y se calculó el factor de matriz normalizado (FMN) de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$FMN = \frac{\text{Factor de respuesta del analito en plasma}}{\text{Factor de respuesta del analito en solución}}$$

*Criterio de aceptación:* El %CV del factor de matriz normalizado debe ser menor a 15%.

#### **6.8.1.3.3 Efecto de acarreo**

Posterior a la inyección de la concentración más alta de cada una de las curvas se inyectó por duplicado una muestra blanco. Para cada muestra blanco se calculó el % de respuesta (interferencia).

*Criterio de aceptación:* La respuesta cromatográfica de las interferencias cercanas al tr del analito debe ser menor al 20% de la respuesta obtenida en el LIC y menores al 5% de la respuesta del EI.

#### **6.8.1.3.4 Curva de calibración**

Se preparó por triplicado la curva de calibración en plasma en el rango de 0.5 - 1000 ng/mL para ABZ y de 10 - 1500 ng/mL para ABZSO. Cada curva de calibración incluyó una muestra blanco y una muestra cero. Las muestras se procesaron de acuerdo con el procedimiento descrito en la Figura 11. Se graficó la relación de áreas (analito/EI) en función de la

concentración y se seleccionó el mejor modelo al cual se ajustaron los datos. Se determinó la pendiente ( $m$ ), la ordenada al origen ( $b$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ). Se calculó la concentración recuperada a cada nivel de concentración de cada curva de calibración, y a partir de estos datos se calculó el % de desviación con respecto a la concentración adicionada de analito.

*Criterio de aceptación:* Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.

Cuando un punto de la curva de calibración no cumpla con el criterio de aceptación, debe ser rechazado y la curva de calibración debe ser recalculada sin modificar el modelo matemático.

Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación.

#### **6.8.1.3.5 Límite inferior de cuantificación (LIC)**

Las concentraciones seleccionadas como LIC fueron de 0.5 ng/mL para el ABZ y de 10.0 ng/mL para ABZSO. Se evaluó la precisión y la exactitud de acuerdo con los criterios establecidos en las pruebas de precisión y exactitud.

#### **6.8.1.3.6 Precisión**

La precisión del método analítico se evaluó como repetibilidad o precisión intradía y como reproducibilidad o precisión intermedia.

**Repetibilidad.** Se prepararon por quintuplicado y se analizaron en una misma corrida muestras control equivalentes al LIC, MCB, MCM1, MCM2, MCA y MCD de ABZ y ABZSO. El mismo día se preparó una curva de calibración de ABZ y de ABZSO en plasma la cual se analizó en la misma corrida analítica. Se determinó la concentración recuperada de cada muestra, así como el valor promedio, la DE y el %CV de cada nivel.

*Criterio de aceptación:* El %CV del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

**Reproducibilidad (Precisión intermedia).** Se prepararon y analizaron por quintuplicado, en dos días diferentes (3 corridas analíticas diferentes), las muestras control de ABZ y de ABZSO en plasma correspondientes a las MCB, MCM1, MCM2 y MCA. Cada día de análisis se preparó una curva de calibración de ABZ y de ABZSO en plasma, la cual se analizó en la misma corrida analítica. Se calculó la concentración recuperada de ABZ y de ABZSO de cada una de las muestras y se calculó el promedio, la DE y el CV%.

*Criterio de aceptación:* El %CV del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

#### **6.8.1.3.7 Exactitud**

A partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, se calculó el % de desviación con respecto a la concentración adicionada.

*Criterio de aceptación:* El valor promedio del porcentaje de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

#### **6.8.1.3.8 Matriz sustituta**

En el mismo día se preparó una curva de calibración en plasma humano y un juego de muestras control por triplicado preparadas en plasma de conejo. Se interpoló la respuesta de las muestras control de plasma de conejo en la curva de calibración de plasma humano y se determinó la precisión y exactitud.

#### **6.8.1.3.9 Estabilidad**

Se evaluó la estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador. Para ello, se prepararon por triplicado las MCB y MCA de ABZ y ABZSO en plasma. Las muestras se mantuvieron en el automuestreador y al finalizar la evaluación se inyectaron junto con una curva de calibración fresca. La respuesta se interpoló en la curva de calibración y se determinó la concentración recuperada. Se consideraron estables las muestras si cumplían con los criterios de repetibilidad y exactitud.

### 6.8.2 Parámetros farmacocinéticos

La cuantificación de ABZ y ABZSO se realizó empleando el método previamente validado. Las muestras del mismo conejo se analizaron en una misma corrida analítica junto con una curva de calibración. Las concentraciones se obtuvieron interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración.

Para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se utilizó el programa Phoenix WinNonLin Version 8.3.3.33 (Pharsight, Mountain View, CA, USA), empleando un modelo no compartimental. Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ), tiempo en el que se alcanza la concentración máxima ( $t_{max}$ ), área bajo la curva de 0 a 24 h ( $AUC_{0-t}$ ), área bajo la curva de 0 a infinito ( $AUC_{0-\infty}$ ), constante de eliminación ( $k_e$ ), vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ) y para las administraciones intravenosas, adicionalmente se calculó: concentración a tiempo cero ( $C_0$ ), volumen de distribución ( $V_z$ ) y depuración (Cl).

Para comparar la formación relativa del metabolito ABZSO, se calculó el cociente individual de  $AUC_{0-\infty}ABZSO/AUC_{0-\infty}ABZ$  para cada vía de administración. Asimismo, se determinó la biodisponibilidad absoluta (F) para ambas administraciones extravasculares, empleando la siguiente ecuación:

$$F = \frac{AUC_{0-\infty} \text{ extravascular}}{AUC_{0-\infty} \text{ intravenosa}} * \frac{Dosis \text{ intravenosa}}{Dosis \text{ extravascular}}$$

### 6.8.3 Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas se realizaron empleando prueba de ANOVA seguidas de una prueba de Tukey, utilizando Statgraphics Centurion XVI versión 16.1.18.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 PREPARACIÓN DEL PROFÁRMACO FOSFONOOXIMETILADO DE ABZ

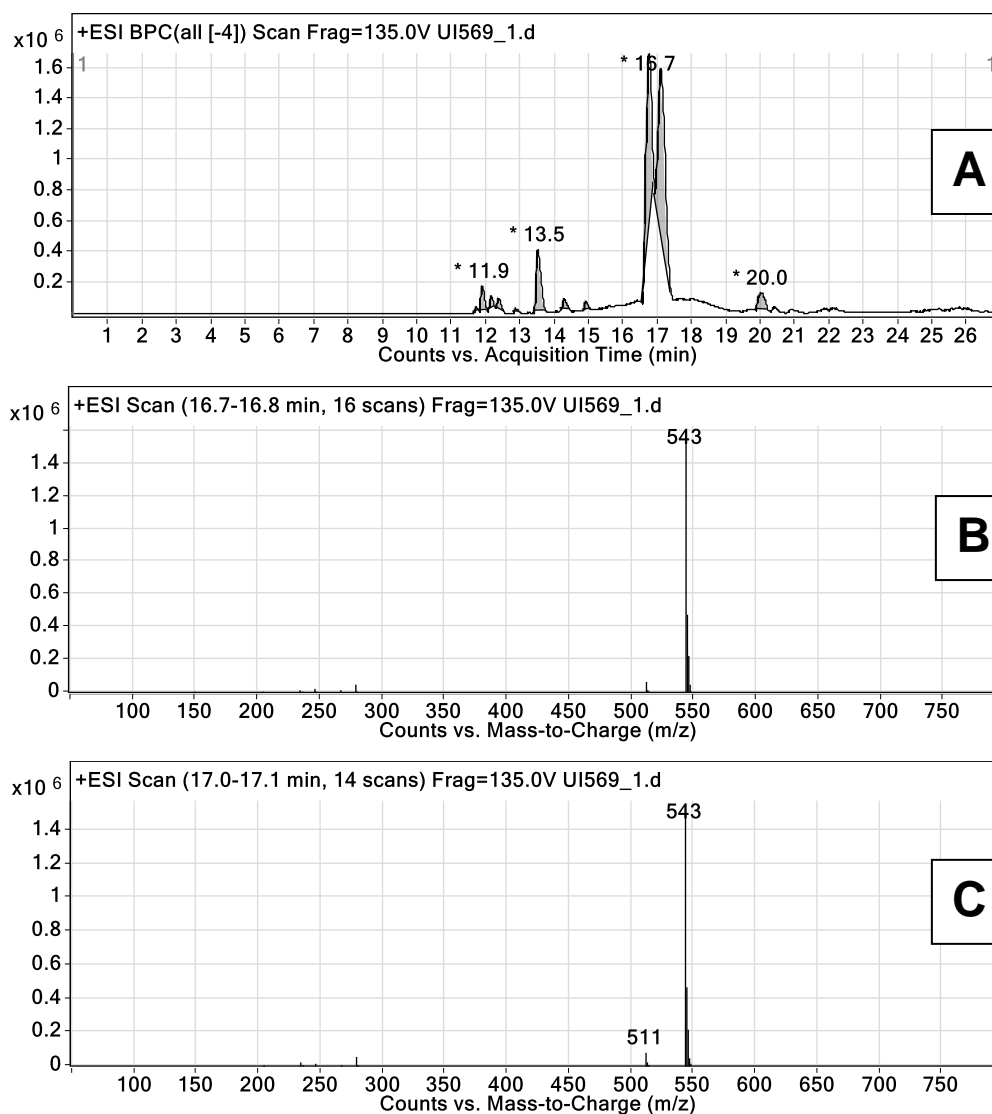
La primera estrategia seleccionada para aumentar la solubilidad del ABZ fue la síntesis del profármaco fosfonooximetilado. Para tal propósito se tomó como base la metodología de Chassaing, C., et al (2008) y Flores, M., et al (2014).

La ruta de síntesis empleada se presenta en la Figura 9. Las reacciones i y ii, fueron las que presentaron un menor rendimiento, y representan el paso limitante de la síntesis del profármaco. Es por esto que se probaron diferentes condiciones de reacción para mejorar el rendimiento de la misma y minimizar la cantidad de subproductos. Las condiciones evaluadas, así como los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9 y se describen a continuación. Una vez realizada la síntesis empleando la condición 1, se utilizó cromatografía en columna en fase normal y una mezcla de cloroformo:MeOH (80:20) como fase móvil y se aisló un sólido, el cual se analizó por HPLC-MS y RMN <sup>1</sup>H, el cual resultó ser un dímero de albendazol (compuesto 4). En la Figura 12, se presenta el cromatograma obtenido. Los picos a los 16.7 y 17.0 min corresponden a una mezcla de los posibles regioisómeros del dímero de ABZ (543 m/z [M+H]<sup>+</sup>), cuya estructura se muestra en la figura 13.

**Tabla 9.** Condiciones de reacción evaluadas para la reacción S<sub>N</sub>2.

Condición	Base	Temperatura	Cantidad de CIMEP	Activante	Resultado aproximado
1	NaH 3 eq	Ambiente	1.3 eq	NO	Se obtienen en igual proporción dímero y compuesto de interés. 50% de rendimiento.
2	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.5 eq	Ambiente	3 eq	Et <sub>3</sub> N 1.5 eq	Bajo rendimiento.
3	NaH 3 eq	-40 °C/4h	3 eq	NO	Bajo rendimiento. Se obtiene el dímero en un 80%.
4	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.5 eq	-40 °C/4 h	3 eq	Et <sub>3</sub> N 1.5 eq	Poca formación del dímero (20%), pero bajo rendimiento.
5	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.5 eq	-40 °C/4 h	3 eq	Et <sub>3</sub> N 3 eq	Obtención de dímero en 70%.
6	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2.5 eq	30 °C	3 eq	Et <sub>3</sub> N 1.5 eq	No se observa la formación del compuesto
7	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2 eq	50 °C	1.5 eq	Et <sub>3</sub> N 1 eq	Se obtiene el compuesto con muchas impurezas
8	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5 eq	Ambiente 6 h	1.5 eq	No	Proporción obtenida: 70% compuesto, 30% dímero.
9	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5 eq	Ambiente	10 eq	No	Proporción obtenida: 70% compuesto, 30% dímero.
10	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1.5 eq	Ambiente	2 eq	I 2.5 eq	Proporción obtenida: 70% compuesto, 30% dímero.





**Figura 12.** Resultado del análisis de HPLC-MS del subproducto de reacción (dímero). **A)** Cromatograma, **B)** Espectro de masas correspondiente al pico de 16.7 min **C)** Espectro de masas correspondiente al pico de 17.0 min

En el caso de la RMN <sup>1</sup>H (Figura 13), es importante mencionar que la presencia de regioisómeros vuelve complicada la asignación de señales, porque se produce una multiplicidad diferente a la esperada. Por ejemplo, la señal en 0.99 ppm pareciera un cuarteto, sin embargo, son dos tripletes traslapados generados por el metilo de la cadena alifática. A pesar de esto, la integración y desplazamientos corresponden a las señales comunes del ABZ pero con la aparición de la señal correspondiente al metileno que sirve de puente entre las dos moléculas, la cual produce una señal en 6.48 ppm y que integra para 2H. Esto aunado a los hallazgos por HPLC-MS permite asegurar la presencia del dímero de ABZ.

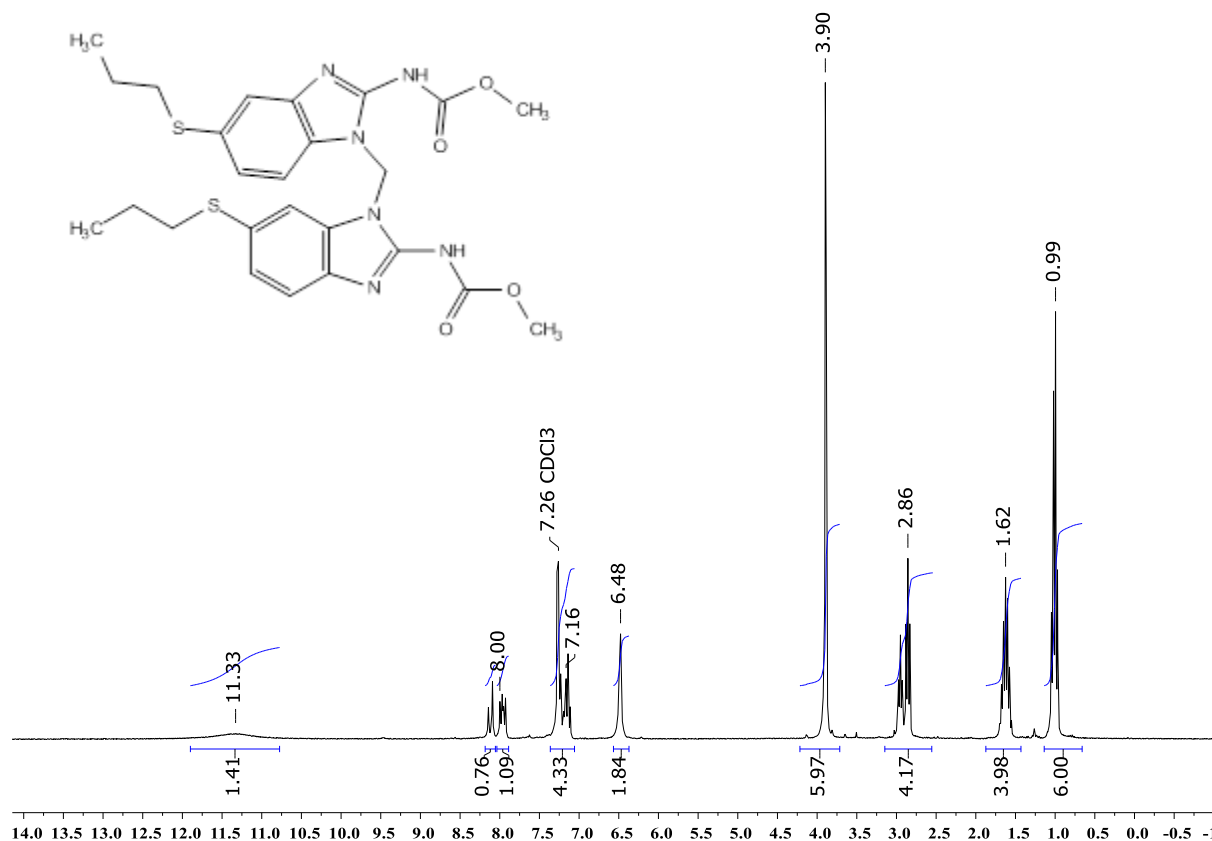
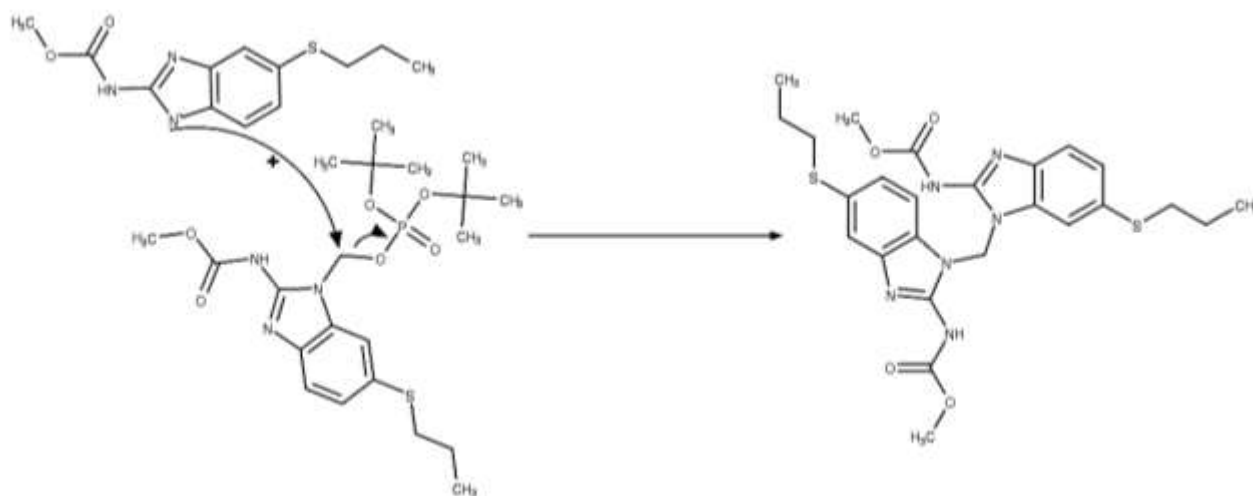


Figura 13. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del dímero de albendazol

El motivo por el cual sólo se logró aislar el dímero a partir de la condición 1 es que el compuesto **3** no se logró recuperar de la columna a pesar de haberse realizado pruebas con otras fases móviles. Lo  nico que se logró recuperar al agregar MeOH puro a la columna fue un polvo que al analizarlo por HPLC-MS/MS se encontró que correspondía a una mezcla del compuesto **5** y ABZ. Esto nos lleva a pensar que el compuesto **3** no es estable dentro de la columna ya que con el ambiente ácido generado se lleva a cabo la ruptura de los enlaces con los terbutilos, formando así el compuesto **5**. En adición, el ABZ aparecía casi en todas las fracciones eluidas a pesar de modificar la polaridad de la fase móvil. Esto llevó a la conclusión de que no se realizaría una purificación intermedia de los compuestos, si no que se realizarían las reacciones de manera consecutiva hasta la formación de la sal de sodio.

La siguiente condición que se evaluó fue con el cambio de la base empleada. En la Tabla 9 se observa que al emplear NaH como base se obtuvo una mayor proporción de dímero que al emplear  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ . Este efecto se atribuye a que el NaH es una base muy fuerte ( $\text{pK}_a = 35$ ) que

aumenta la nucleofilia del ABZ y por tanto, una vez formado el compuesto de interés, una segunda molécula de ABZ se une al metileno unido al grupo fosfato, mediante el mecanismo mostrado en la Figura 14. Es por este motivo que se decidió emplear una base más débil, pero con la fuerza suficiente para quitar el protón del anillo benzimidazólico como lo es el  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  ( $\text{pK}_a = 10.3$ ).



**Figura 14.** Formación del subproducto principal de reacción.

Con el objetivo de aumentar la electrofilicidad del fosfato de di-*tert*-butil clorometilo (ClMeP) y aumentar el rendimiento se empleó trietilamina ( $\text{Et}_3\text{N}$ ) en las condiciones 2, 4, 5, 6 y 7. Sin embargo, se obtuvo una mayor proporción del dímero con estas condiciones. Esto debido a que además de ser un agente activante, es una base que generó un efecto similar al del  $\text{NaH}$ , por lo que se decidió no utilizarlo en otras pruebas.

En las condiciones 3 a la 7 se evaluó la temperatura de la reacción. En este caso se observó que una temperatura baja al inicio de la reacción no presentó una ventaja siendo un proceso que consume recursos y esfuerzo. Por otro lado, usar una temperatura elevada promueve la formación de subproductos, lo cual lleva a tener rendimientos bajos. Es por esto que se decidió mantener la temperatura ambiente.

Otra manera de aumentar el rendimiento es colocando un exceso de los reactivos, por lo que se decidió agregar un exceso de electrófilo (condición 9). Se encontró que, a pesar de que el rendimiento incrementó, se obtuvieron especies polifosfatadas que poseen carga neta positiva, las cuales pudieron ser observadas al analizar la mezcla de reacción por HPLC-MS. Dicha mezcla se sometió a tratamiento en medio básico, sin embargo, esto llevó a la descomposición de los compuestos formados. Aunado a esto, el uso de un exceso del electrófilo conlleva a

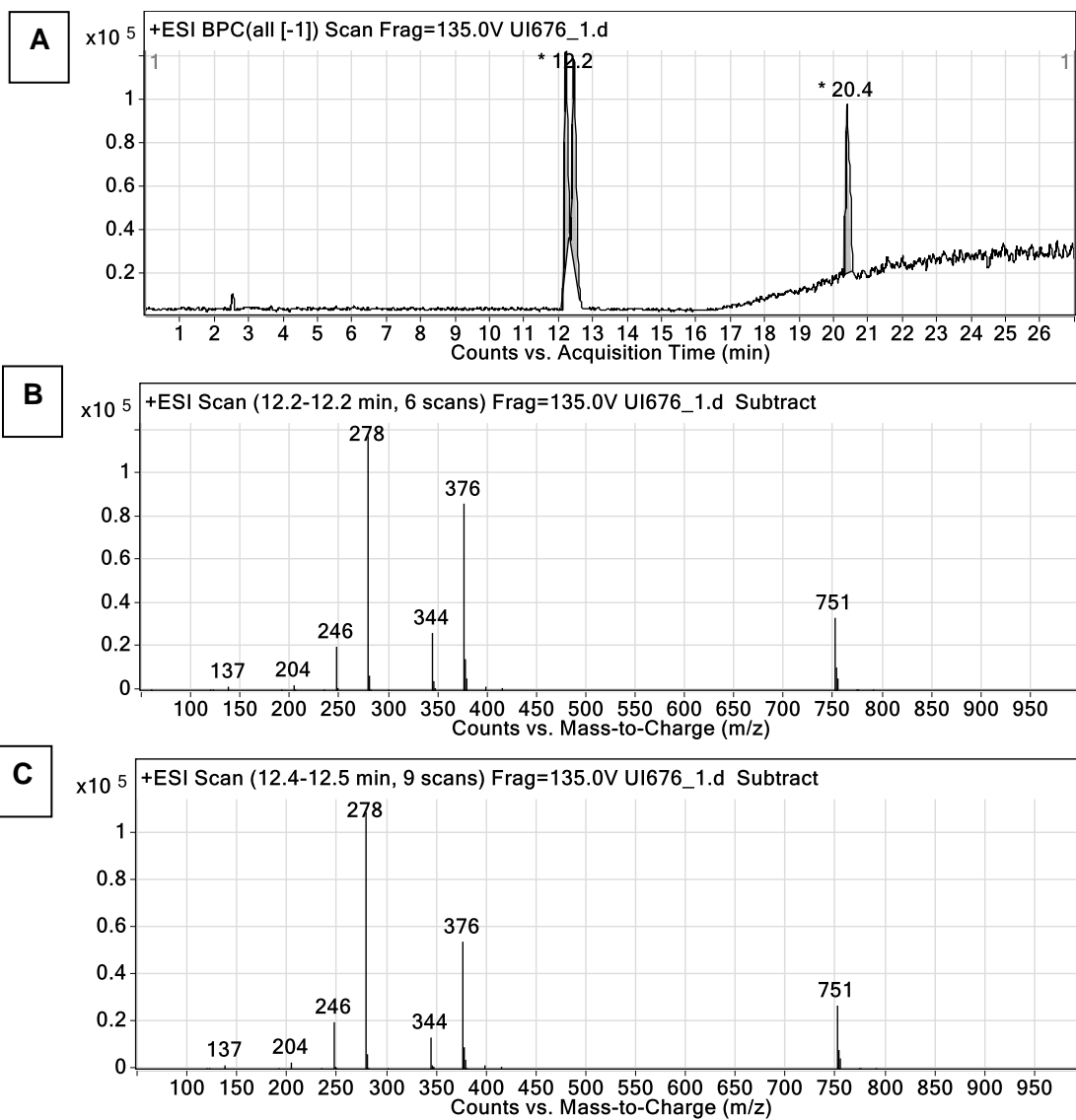
problemas en la purificación, además de que dicho reactivo es mutagénico. Es así que se decidió emplear la menor cantidad posible del mismo.

La última estrategia (condición 10) fue el aumento de la electrofilicidad del CIMeP, empleando el fundamento de la reacción de Finkelstein (Pace & Regmi, 2006). Se usó KI como fuente de yoduro para que este elemento reemplace el átomo de cloro en el electrófilo, haciéndolo así más reactivo. Con ello se logró disminuir la cantidad de electrófilo usado y obtener un buen rendimiento. Sin embargo, aún se obtiene ABZ residual en gran cantidad, por lo que no se encontró una ventaja sustancial.

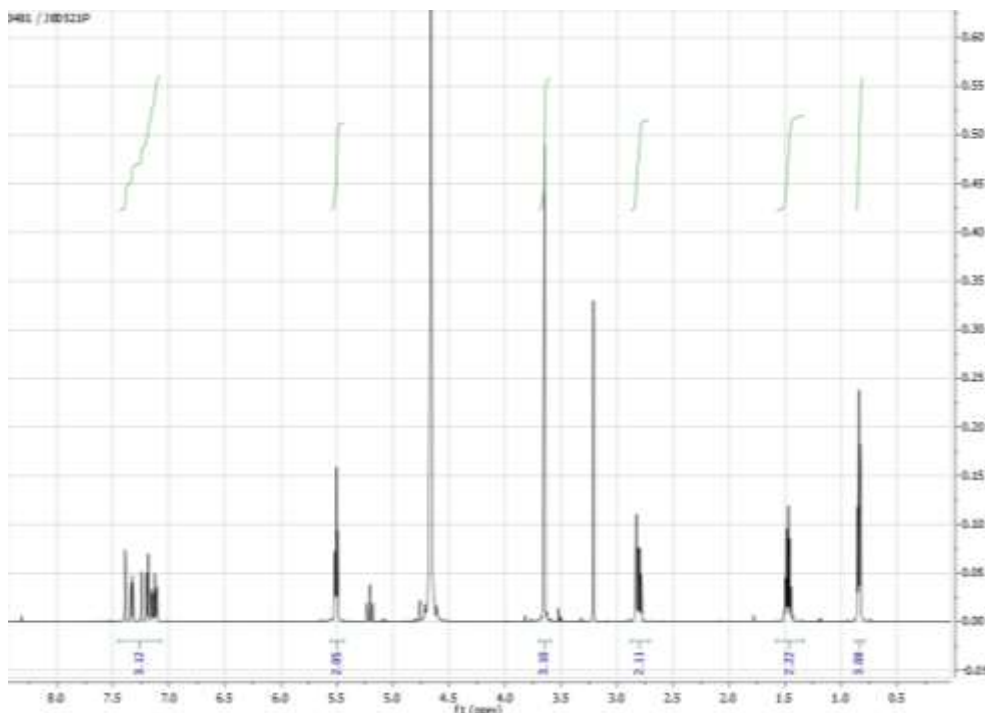
Debido a esto, se eligió la condición 8 que empleando la menor cantidad de electrófilo y de base permitió la formación del compuesto. Posterior a esto se realizó la desprotección y la formación de sal disódica tal como se indica en la metodología en la sección 6.2.

El sólido obtenido se analizó por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{31}\text{P}$ , así como por HPLC-MS. En el cromatograma mostrado en la Figura 15 se observa la presencia de dos picos correspondientes a los regioisómeros del profármaco de albendazol, ambos con un espectro de masas ESI<sup>+</sup> similar, mostrando un pico de 376 m/z [M+H<sup>+</sup>] correspondiente al profármaco en su forma diácida, ya que la fase móvil empleada tenía ácido fórmico. Asimismo, se observa la transición con relación masa carga 278 m/z que corresponde a la pérdida del grupo fosfato.

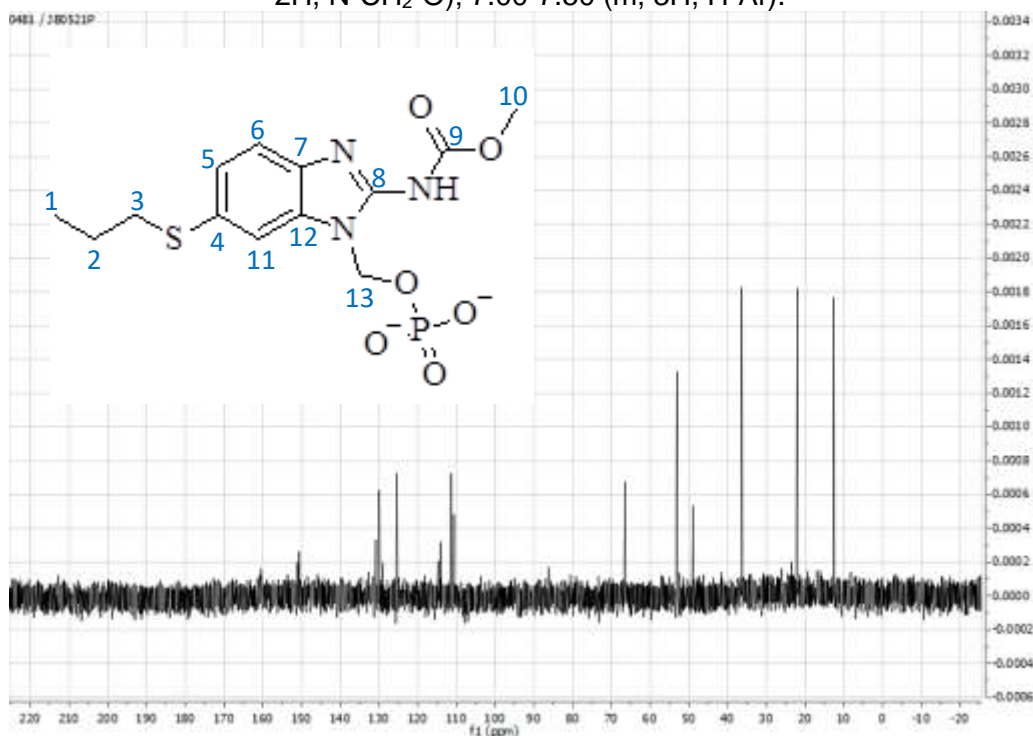
Los espectros de RMN del profármaco de ABZ, se muestran en las figuras 16 a 18. En el caso de la RMN  $^1\text{H}$ , todas las señales corresponden en desplazamiento y multiplicidad a los núcleos de hidrógeno presentes en la molécula. En el caso de la RMN  $^{13}\text{C}$ , se obtuvieron las 13 señales esperadas para cada uno de los carbonos de la molécula. Por último, en el espectro de  $^{31}\text{P}$ , se obtuvieron dos señales en 11 ppm, lo que indica la presencia de los dos regioisómeros del profármaco de ABZ.



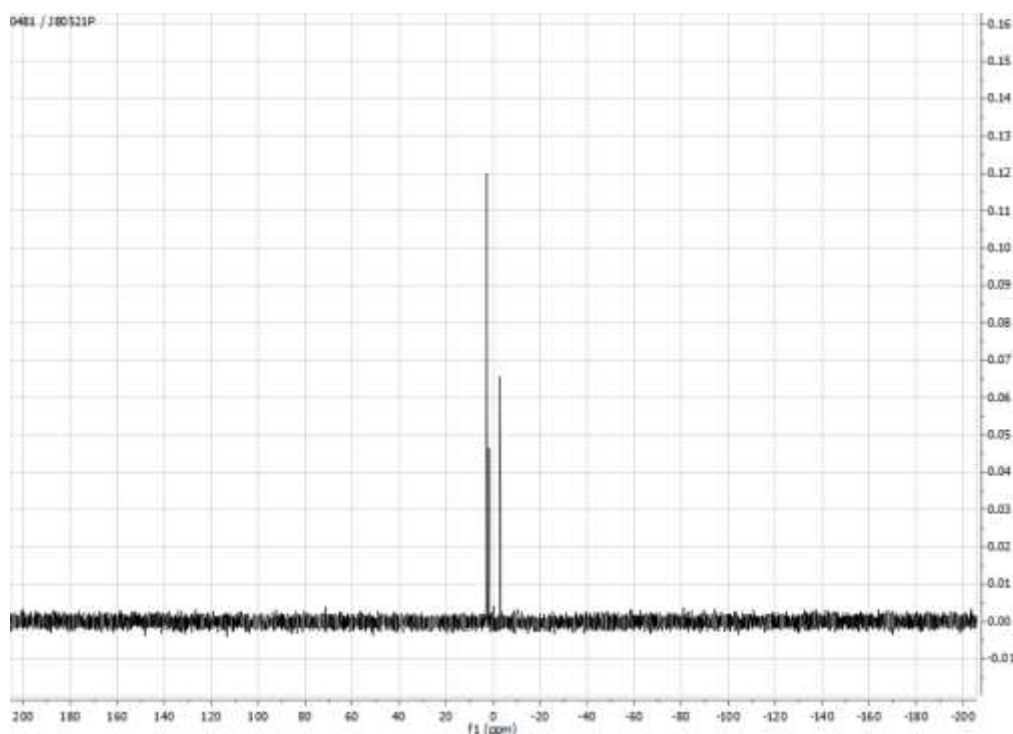
**Figura 15.** Resultado del análisis de HPLC-MS del profármaco de ABZ. **A)** Cromatograma, **B)** Espectro de masas correspondiente al pico de 12.2 min. **C)** Espectro de masas correspondiente al pico de 12.4 min. 376 *m/z* [M+H]<sup>+</sup>, 344 *m/z* ([M-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>), 278 *m/z* ([M-H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]<sup>+</sup>)



**Figura 16.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del fosfonooximetil albendazol. ( $\text{D}_2\text{O}$ , 400 MHz,  $\delta$  ppm): 0.86 (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 1.50 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ); 2.87 (m, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{S}$ ); 3.67 (s, 3H,  $\text{O}-\text{CH}_3$ ); 4.7 (sb, OH); 5.52 (d, 2H,  $\text{N}-\text{CH}_2-\text{O}$ ); 7.00-7.50 (m, 3H, H-Ar).

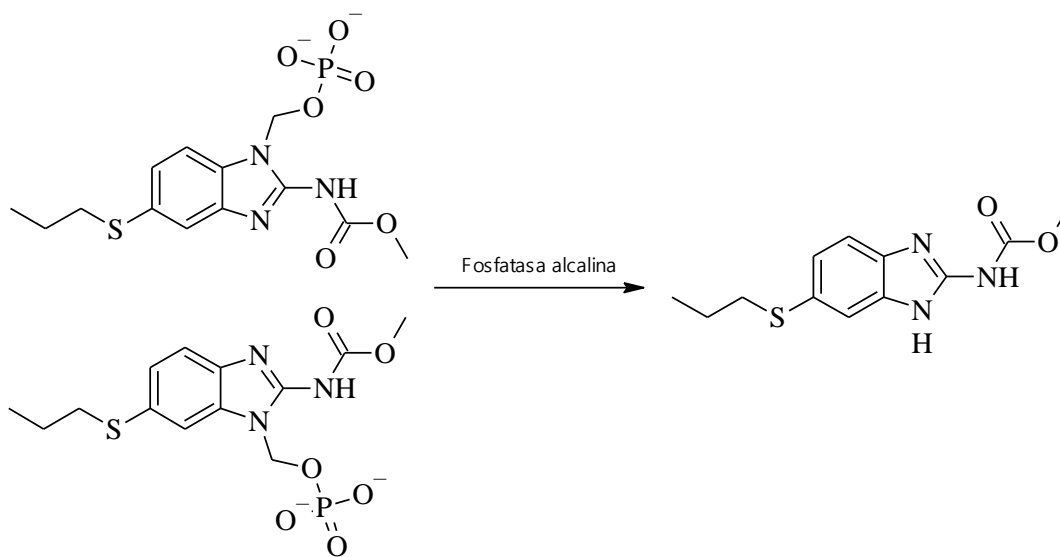


**Figura 17.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del fosfonooximetil albendazol. ( $\text{D}_2\text{O}$ , 75 MHz,  $\delta$  en ppm): 12.59 (1); 22.08 (2); 36.00 (3); 52.85 (10); 66.85 (13); 110.43 (6); 111.54 (4); 113.75 (11); 114.86 (5); 125.46 (7); 129.98 (12); 131.00 (8); 150.77 (9).



**Figura 18.** Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  del fosfonooximetil albendazol. ( $\text{D}_2\text{O}$ , 122 MHz,  $\delta$  en ppm)

Es importante mencionar que no se consideró necesario separar los regioisómeros ya que al ser un profármaco biorreversible, una vez que se hidroliza en el cuerpo, ambas moléculas generan al ABZ, tal como se muestra en la Figura 19.



**Figura 19.** Hidrólisis de los dos regioisómeros del profármaco de albendazol

### 7.1.1 Determinación de pureza por RMN cuantitativa

Una vez comprobada la identidad del compuesto, se determinó la pureza empleando la técnica de RMN cuantitativa y ácido cloroacético como estándar interno. La ecuación utilizada fue:

$$Pureza = \frac{\text{Área analito}}{\text{Área EI}} * \frac{\#protones\ estándar}{\#protones\ analito} * \frac{masa\ estándar}{masa\ analito} * \frac{PM\ analito}{PM\ estándar} * pureza\ estándar$$

Y se obtuvo el siguiente resultado:

$$Pureza = \frac{1783.05}{23690.15} * \frac{2}{2} * \frac{0.0112\ g}{0.0132\ g} * \frac{419}{94.5} * 99.0 = 28.03\ \%$$

Con este dato de pureza y tomando en cuenta que al llevar a cabo la reacción se inició con 1.0062 g de albendazol y se lograron obtener 0.5648 g de los 1.423 g esperados de compuesto, el rendimiento global del proceso fue de 11.13%.

$$Rendimiento = 0.5648\ g\ polvo * \frac{28.03\ g\ compuesto}{100\ g\ polvo} * \frac{100}{1.423\ g\ esperados} = 11.13\ \%$$

## 7.2 SOLUBILIDAD DEL PROFÁRMACO

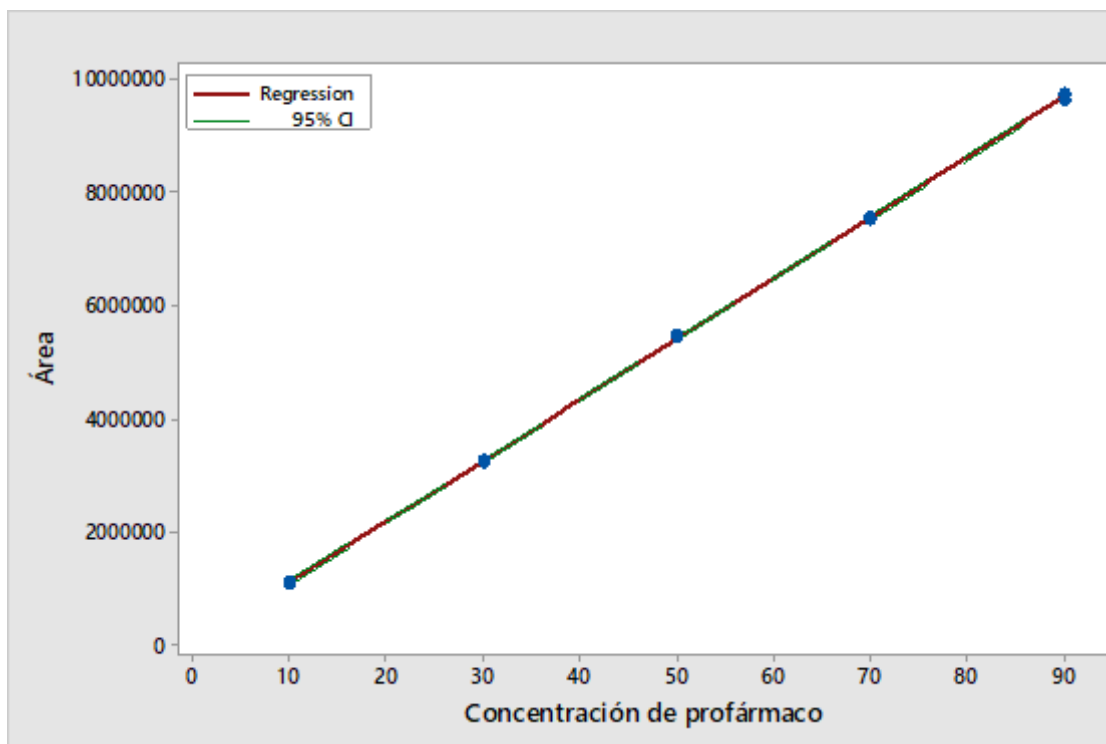
### 7.2.1 Metodología analítica para cuantificar el profármaco

El método analítico para la cuantificación del profármaco por HPLC fue lineal y preciso en el rango de 10 a 90 µg/mL (Tabla 10). En la Figura 20 se muestra una de las curvas de calibración obtenidas. Con estos resultados se demuestra que la metodología es confiable para cuantificar el profármaco en solución.

**Tabla 10.** Linealidad y precisión del método analítico para cuantificar al profármaco de albendazol

Concentración teórica (µg/mL)	Concentración real (µg/mL)	Respuesta		Factor respuesta
10.00	10.350	1079468		104296.425
30.00	31.050	3232236		104097.778
50.00	51.750	5454365		105398.358
70.00	72.450	7536024		104016.894
90.00	93.150	9656607		103667.279
	<b>Ordenada (b)</b>	27223.50000	<b>Promedio</b>	104295.347
	<b>Pendiente (m)</b>	103662.15459	<b>DE</b>	657.205
	<b>r</b>	<b>0.9999</b>	<b>CV (%)</b>	<b>0.6</b>
	<b>ERR</b>	<b>0.776</b>		





**Figura 20.** Curva de calibración del método para cuantificar al profármaco de albendazol

### 7.2.2 Estudio de solubilidad del profármaco

La solubilidad del profármaco se evaluó a los pHs: 6.0, 7.4 y 8.0, que son bien tolerados para una administración parenteral. Los resultados de solubilidad se muestran en la Tabla 11. En ella se puede observar que, en el rango evaluado, la solubilidad del profármaco es independiente del pH. Considerando que la solubilidad de ABZ en agua es  $3 \times 10^{-3}$  mM, con el profármaco se aumentó este valor de más de 20 000 veces.

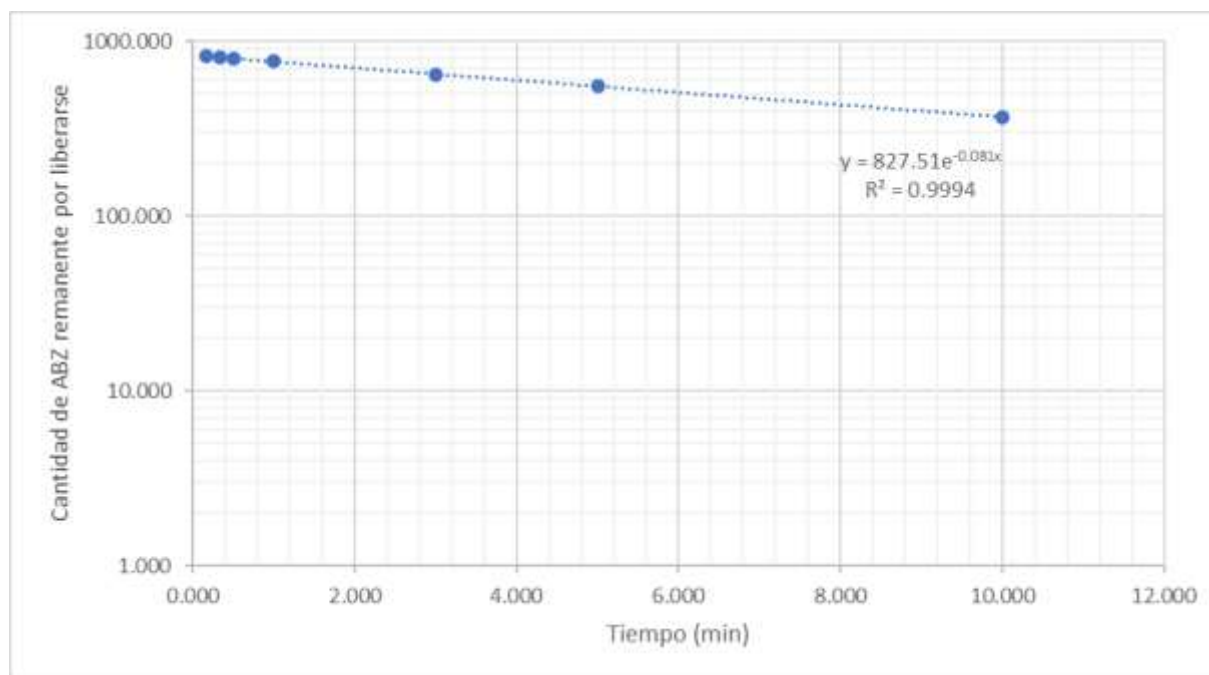
Tomando en cuenta que la dosis normal de ABZ es 15 mg/Kg al día y asumiendo que el peso del paciente fuera de 70 kg y que la biodisponibilidad fuera de 1%, la dosis por vía intramuscular debería ser de 10.5 mg en un volumen máximo de 2 mL. Los resultados de solubilidad de la Tabla 11 documentan la factibilidad de administrar el profármaco por esta vía.

**Tabla 11.** Solubilidad del profármaco en soluciones amortiguadoras

Solución amortiguadora	Concentración interpolada (µg/mL)	Concentración de la muestra (mg/mL)	Concentración promedio (mg/mL)	Concentración promedio (mM)
pH 6.0	52.46	26.234	27.288	64.8
	55.91	27.959		
	55.34	27.673		
pH 7.4	51.98	25.993	27.045	64.2
	55.41	27.705		
	54.87	27.437		
pH 8.0	59.39	29.696	29.622	70.4
	59.69	29.850		
	58.64	29.321		

### 7.3 HIDRÓLISIS DEL PROFÁRMACO

Una vez evaluada la solubilidad, el siguiente parámetro fue la hidrólisis del profármaco. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21. En ella se puede observar que la cantidad de ABZ remanente por liberarse vs tiempo sigue un comportamiento exponencial, lo que indica que la cinética de liberación de ABZ a partir del profármaco es de primer orden. Al calcular la vida media de liberación se obtuvo un valor de  $8.72 \pm 0.23$  min, lo que indica que, una vez que el profármaco se encuentra en la circulación, al estar en contacto con las enzimas fosfatasas, el ABZ se liberará rápidamente, dejándolo disponible para ejercer su efecto terapéutico.



**Figura 21.** Cantidad de ABZ remanente por liberarse a partir del profármaco vs tiempo

## 7.4 ANÁLISIS DEL COSTO

A pesar de que el profármaco presenta una alta solubilidad acuosa y el ABZ se libera rápidamente, la ruta sintética para obtenerlo fue complicada. En la tabla Tabla 12 se presenta el costo para obtener 1 g del profármaco, el cual es muy alto. Por lo anterior, se decidió utilizar otra alternativa para obtener una formulación vía parenteral de albendazol.

**Tabla 12.** Costo de la síntesis de 1 g de profármaco de albendazol

	ABZ	CS <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	CIMeP	DMF	HCl en dioxano	Dioxano	Total
Cantidad	6.33 g	11.84 g	9.27 g	350 mL	95 mL	60 mL	---
Precio por frasco	\$1,673/ 10 g	\$1,267/ 50 g	\$15 900/ 25 g	\$2,353/ 1L	\$2,948/ 100 mL	\$1,366/ 100 mL	
Precio aproximado para 1 g de compuesto	\$1,060	\$300	\$5,896	\$823	\$2,800	\$820	<b>\$11,699</b>

## 7.5 DESARROLLO DE FORMULACIÓN EMPLEANDO COSOLVENTES

La segunda estrategia consistió en el uso de una técnica más sencilla que es el uso de sistema de cosolventes. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

### 7.5.1 Desarrollo de la metodología analítica

Para poder desarrollar la formulación empleando cosolventes, se debía contar con una metodología confiable para la cuantificación del ABZ en los diferentes cosolventes o mezclas de ellos. En primer lugar, se seleccionó un método espectrofotométrico, por lo que se determinó la selectividad a los diferentes excipientes a evaluar. El criterio de aceptación era que la absorbancia de los cosolventes debía ser menor al 20% de la absorbancia de una solución de ABZ a 1 µg/mL a las longitudes de onda elegidas. En la Tabla 13, se muestran los resultados de absorbancia, en la que se muestra en negritas los disolventes que no cumplieron con dicho criterio. Por lo anterior, fue necesario desarrollar un método cromatográfico para llevar a cabo la cuantificación de ABZ en estos disolventes. En la Tabla 14 se presentan los resultados de respuesta de los cosolventes empleando el método cromatográfico. Se puede observar que la respuesta obtenida fue menor al 20% de la señal obtenida con la solución de

ABZ de 3  $\mu\text{g/mL}$ , lo que demuestra que el método es selectivo. Ambos métodos fueron validados determinando su linealidad precisión y exactitud.

**Tabla 13.** Selectividad de los excipientes en el método espectrofotométrico

Sustancia	Dilución o concentración	Absorbancia $\lambda=291\text{ nm}$	Absorbancia $\lambda=305\text{ nm}$
ABZ	1 $\mu\text{g/mL}$	0.043	0.036
Citrato de sodio	1.65% m/v	0.005	0.003
PLX®188	25% m/v	0.008	0.006
Benzoato de sodio	20% m/v	<b>0.013</b>	0.007
PLX® 127	5% m/v	0.006	0.002
Tween® 20		<b>0.118</b>	<b>0.047</b>
Tween® 80		<b>2.476</b>	<b>0.350</b>
Glicerina	1:4	0.007	0.004
Propilenglicol		0.009	0.005
PEG 400		0.007	0.006
PEG 600		0.007	0.007
Cremofor®	1:50	<b>2.532</b>	<b>0.324</b>
EtOH		0.002	0.002
DMSO	1:1000	0.001	0.003
DMA		0.003	0.001

**Tabla 14.** Selectividad del método cromatográfico

Solución	Área	% respuesta
ABZ 3 $\mu\text{g/mL}$	312737	-
Tween 20®	1602	0.512
Tween 80®	4222	1.350
Cremofor®	32520	10.399

#### 7.5.1.1 Validación del método espectrofotométrico para cuantificar ABZ

En la Figura 22 se presenta una curva típica de calibración obtenida empleando el método espectrofotométrico (rango de 1.0 – 25.0  $\mu\text{g/mL}$ ). En todos los casos, el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99. En la Tabla 15 se observa que el método es preciso y exacto ya que los valores de coeficiente de variación y de error relativo debido a la regresión (ERR) fueron menores a 2% en todos los casos.

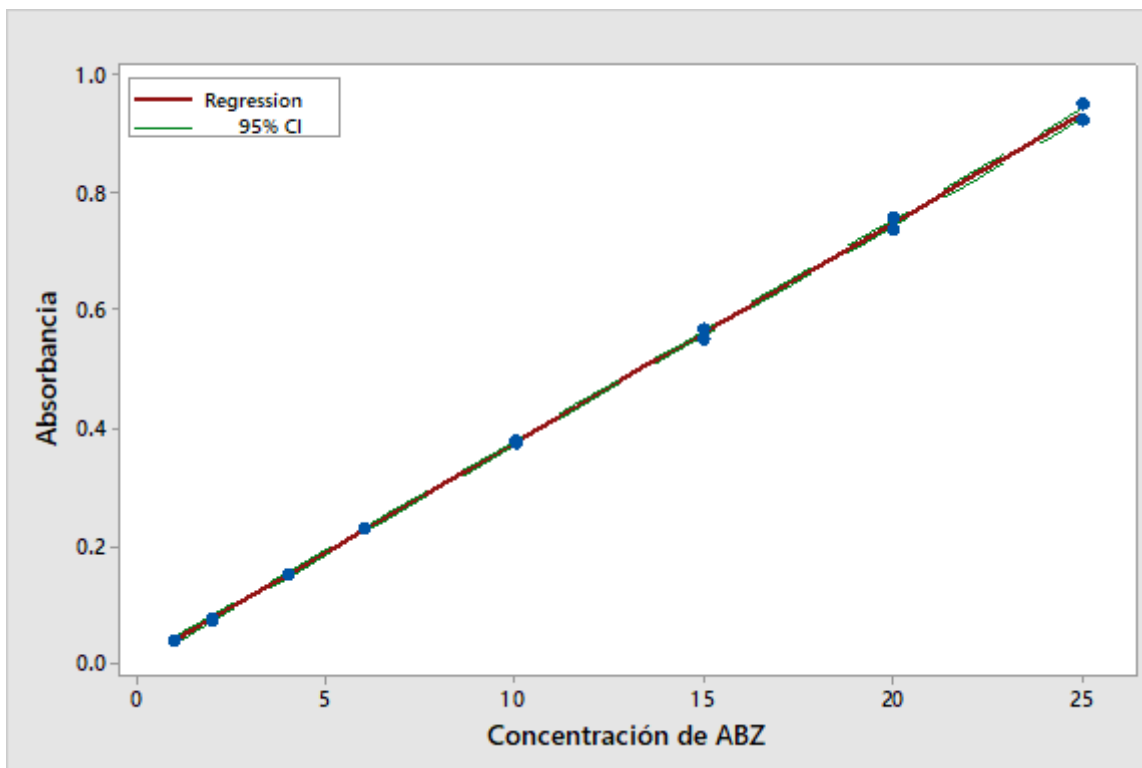


Figura 22. Curva de calibración del método espectrofotométrico.

Tabla 15. Linealidad y precisión del método espectrofotométrico

Concentración (µg/mL)	291 nm		305 nm	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
	<b>Factor respuesta</b>	<b>Factor respuesta</b>	<b>Factor respuesta</b>	<b>Factor respuesta</b>
1.0	0.0346	0.0377	0.0358	0.0358
2.0	0.0341	0.0373	0.0344	0.0363
4.0	0.0341	0.0373	0.0354	0.0358
6.0	0.0352	0.0383	0.0362	0.0358
10.0	0.0350	0.0378	0.0353	0.0357
15.0	0.0350	0.0368	0.0357	0.0345
20.0	0.0351	0.0371	0.0357	0.0347
25.0	0.0350	0.0370	0.0359	0.0348
<b>Promedio</b>	0.0348	0.0374	0.0355	0.0355
<b>Desviación estándar</b>	0.0004	0.0005	0.0005	0.0007
<b>CV (%)</b>	<b>1.3</b>	<b>1.3</b>	<b>1.5</b>	<b>1.9</b>
<b>r</b>	<b>1.00</b>	<b>0.99</b>	<b>1.00</b>	<b>0.99</b>
<b>ERR (%)</b>	<b>0.52</b>	<b>1.02</b>	<b>0.73</b>	<b>1.10</b>

### 7.5.1.2 Validación del método cromatográfico para cuantificación de ABZ

Asimismo, el método fue lineal en el rango de 3.0 a 25.0  $\mu\text{g/mL}$ , obteniendo curvas de calibración como la mostrada en la Figura 23. En la Tabla 16 se muestran los resultados de linealidad y precisión. El método fue confiable ya que los valores de coeficiente de correlación fueron mayores a 0.99 y tanto el error relativo a la regresión como el coeficiente de variación fueron menores al 2%.

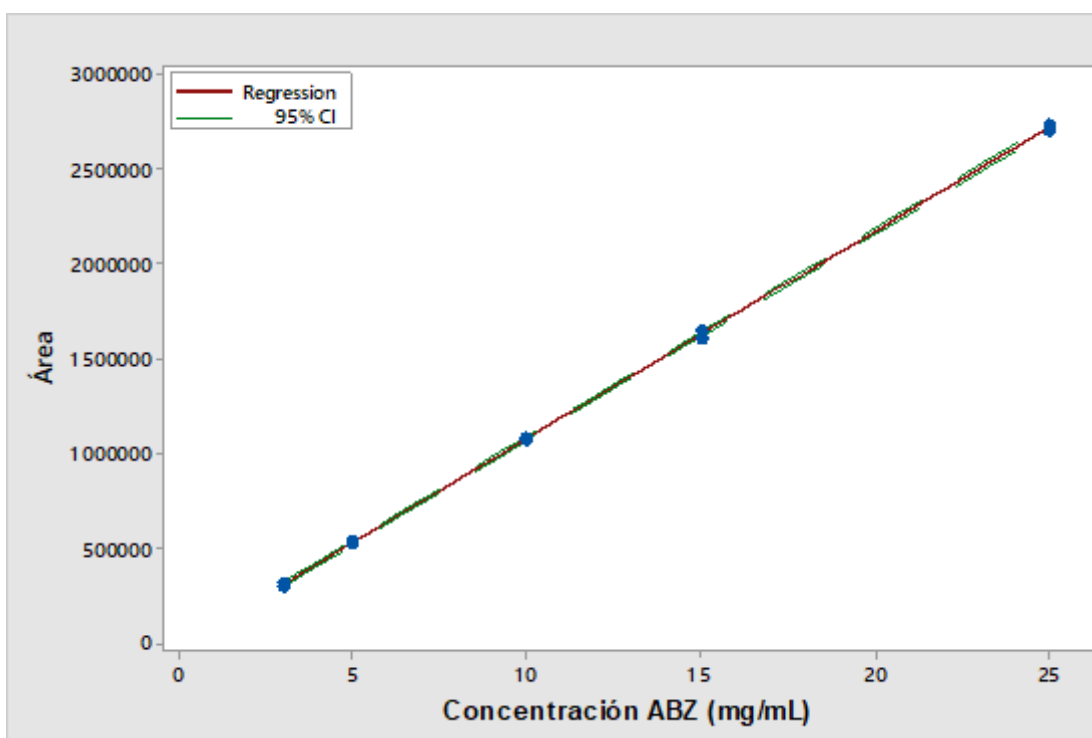


Figura 23. Curva de calibración del método cromatográfico.

Tabla 16. Linealidad y precisión del método cromatográfico

	Día 1	Día 2
<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Factor respuesta</b>	<b>Factor respuesta</b>
3.00	101209.4	106132.7
5.00	102325.0	103709.4
10.00	105271.7	107205.5
15.00	103904.6	103625.6
25.00	105268.2	106714.8
<b>Promedio</b>	103595.8	52738.8
<b>Desviación estándar</b>	1803.5	847.9
<b>CV (%)</b>	1.7	1.6
<b>r</b>	1.00	0.99
<b>ERR (%)</b>	0.79	1.95

### 7.5.2 Prueba de solubilidad

Los resultados de solubilidad de ABZ se muestran en la Tabla 17. Se puede observar que los disolventes en los que el ABZ fue más soluble fueron DMA y DMSO, que son disolventes polares de alta constante dieléctrica y que han sido aprobados para su uso en formas farmacéuticas parenterales. En el caso de la DMA, se ha demostrado que los efectos adversos se presentan al utilizar dosis mayores a 400 mg/Kg. Además, se ha reportado que no muestra actividad hemolítica, con una DL<sub>50</sub> de 37% v/v. En contraste, el DMSO presenta una mayor actividad hemolítica, con una DL<sub>50</sub> de 5.1%. (La DL<sub>50</sub> representa el porcentaje del volumen total requerido para producir hemólisis) (Gupta & Brazeau, 2010).

Los otros disolventes en los que el ABZ presentó buena solubilidad fueron los polietilenglicoles 400 y 600, en los que la solubilidad aumentó cerca de 2000 veces. El PEG 400 ha sido el más utilizado en formulaciones parenterales ya que presenta baja actividad hemolítica y no es irritante (Gupta & Brazeau, 2010). En contraste, el uso de PEG 600 en formulaciones parenterales ha sido baja, encontrándose en 5% de las formulaciones (U.S Food and Drug Administration, 2020).

Los resultados mostraron que en propilenglicol (PG) y etanol, que son los disolventes más comunes en formulaciones farmacéuticas, la solubilidad se incrementó entre 600 y 800 veces. Estos disolventes presentan baja toxicidad y pueden emplearse en altas concentraciones en formulaciones parenterales, llegando hasta 80-100% para formulaciones intramusculares (Gupta & Brazeau, 2010). Dado que el etanol presentó una mayor capacidad de solubilizar al ABZ y considerando que su densidad es menor a la del propilenglicol, se decidió utilizar este disolvente para el desarrollo de la formulación.

En resumen, los tres disolventes seleccionados para continuar con su evaluación para el desarrollo de la formulación fueron la dimetilacetamida, el PEG 400 y el etanol.

**Tabla 17.** Solubilidad de ABZ en diferentes disolventes e hidrotropos

Metodología de cuantificación	Disolvente	Concentración (µg/mL)		Aumento en solubilidad
		Promedio	CV (%)	
	Agua	0.815		
UV-Vis	Citrato de sodio 1.65%	1.115	16.0	1
UV-Vis	Poloxamero 188 5%	3.646	31.2	4
UV-Vis	Poloxamero 127 5%	12.493	10.0	15
HPLC	Tween® 20 5%	21.755	2.4	27

Metodología de cuantificación	Disolvente	Concentración (µg/mL)		Aumento en solubilidad
		Promedio	CV (%)	
UV-Vis	Benzoato de sodio 20%	11.520	7.8	14
UV-Vis	Poloxamero 127 8.5%	23.878	7.2	29
UV-Vis	Glicerina	27.946	14.3	34
HPLC	Tween® 80 5%	29.123	4.6	36
UV-Vis	Poloxamero 188 25%	32.628	34.2	40
HPLC	Cremofor®	88.327	46.1	108
UV-Vis	Propilenglicol	529.995	3.5	650
UV-Vis	Etanol	655.956	6.5	805
UV-Vis	PEG 600	1519.390	7.8	1864
UV-Vis	PEG 400	1582.617	6.2	1942
UV-Vis	DMSO	21593.558	28.1	26495
UV-Vis	DMA	24059.716	10.3	29521

### 7.5.3 Diseño de la formulación

Una vez seleccionados los tres disolventes a emplear en la formulación (DMA, PEG 400 y etanol) se empleó un diseño de experimentos factorial  $3^2$  para determinar cuál sería la proporción óptima de estos disolventes para alcanzar la mayor cantidad de ABZ disuelta. La gráfica de superficie de respuesta que se presenta en la Figura 24 mostró que la mayor concentración de ABZ se alcanza al usar la mayor proporción de los dos disolventes evaluados, que es 30% v/v de DMA y 50% m/v de PEG 400. Es por ello que se decidió elegir esta formulación, la cual se denominó F1.

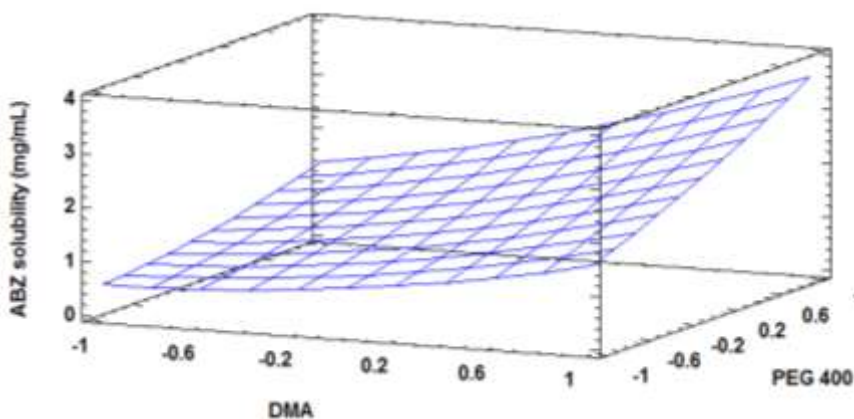


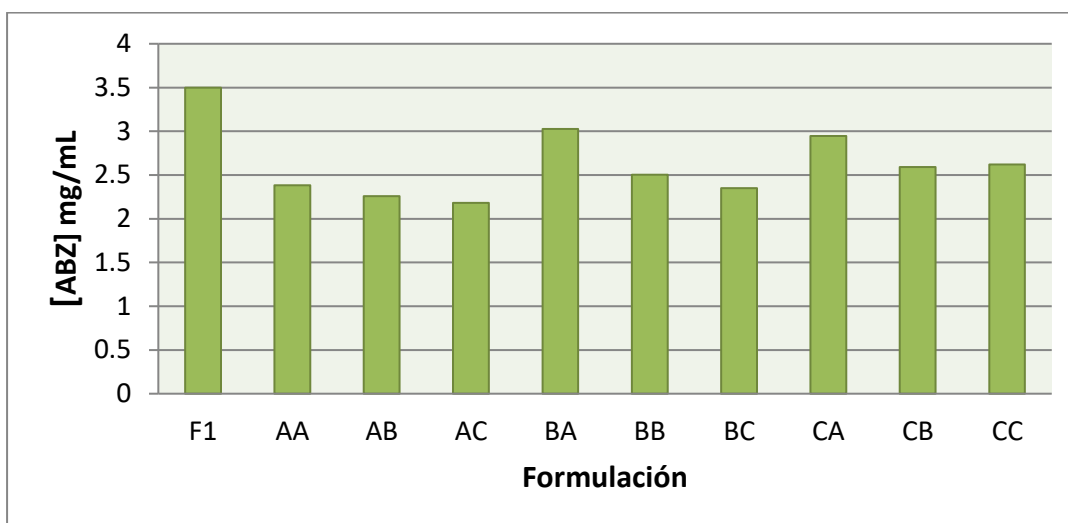
Figura 24. Gráfica de superficie de respuesta del Diseño de Experimentos.



Con el objetivo de disminuir el riesgo de hemólisis, se decidió combinar el EtOH con otras soluciones acuosas las cuales se presentan en la Tabla 3. Los resultados se muestran en la Figura 25. Dado que la mayor cantidad de ABZ disuelto se obtuvo con la formulación BA, constituida por 30% v/v DMA, 50% m/v PEG 400 y 25% v/v de una solución de benzoato de sodio 6% en EtOH al 70%, esta fue seleccionada para continuar con su evaluación y fue designada como F2.

En la Tabla 18 se presenta la composición final de las 2 formulaciones. Las concentraciones utilizadas de cada uno de los disolventes se encuentran dentro del rango aceptado por la FDA para su uso parenteral (U.S Food and Drug Administration, 2020).

A ambas formulaciones se les hizo la evaluación de estabilidad y hemólisis para posteriormente seleccionar la que se emplearía en el estudio de farmacocinética.



**Figura 25.** Solubilidad de ABZ en las formulaciones preparadas de acuerdo con la Tabla 3.

**Tabla 18.** Composición de las formulaciones finales

Formulación	Composición	Concentración de ABZ
F1	30% v/v Dimetilacetamida 50% m/v PEG 400 25% v/v Etanol	5 mg/mL
F2	30% v/v Dimetilacetamida 50% m/v PEG 400 25% v/v Solución de benzoato de sodio 6% en EtOH 70%	5 mg/mL

## 7.6 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Ambas formulaciones fueron transparentes e incoloras y mantuvieron sus características físicas después de 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Asimismo, el valor de pH fue de 5 durante el periodo evaluado y la concentración de ABZ no cambió en más de 10 %, cumpliendo con lo establecido en la guía de estabilidad de la FDA (U.S. Food and Drug Administration, 2008).

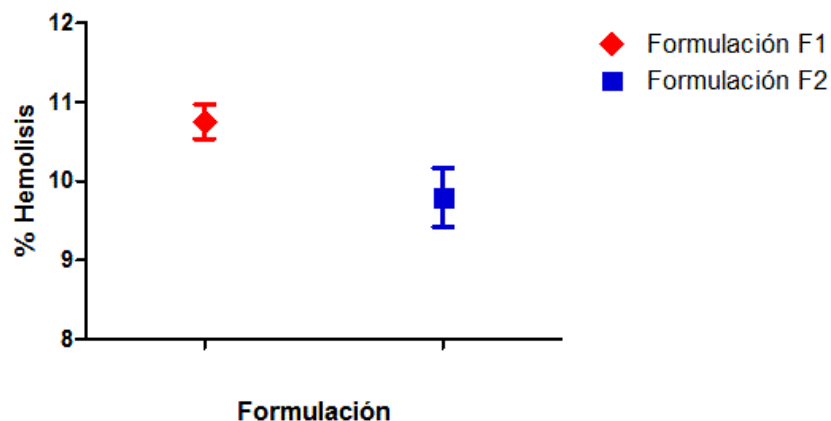
Al mantener las formulaciones en condiciones de refrigeración, se encontró que, después de 6 meses se presentó un precipitado blanco el cual no se resuspendió después de la agitación. Además, al término de los 6 meses, la concentración de ABZ disminuyó en un 30 %, por lo que se concluyó que, bajo estas condiciones de almacenamiento, las formulaciones no son estables.

**Tabla 19.** Estabilidad química de las formulaciones de cosolventes

Formulación	Condición	[ABZ] inicial mg/mL	[ABZ] final mg/mL	% Diferencia	Tiempo (meses)
F1	Temperatura ambiente	5.183	5.326	2.8	12
	Refrigeración	5.183	3.374	<b>-34.9</b>	6
F2	Temperatura ambiente	5.044	5.538	9.8	12
	Refrigeración	5.044	2.788	<b>-44.7</b>	6

## 7.7 EVALUACIÓN DE HEMÓLISIS

Debido a que se planeaba administrar el sistema de ABZ con cosolventes por vía intravenosa, se evaluó su capacidad hemolítica para asegurar que no causara un daño. En la Figura 26 se puede observar que el porcentaje de hemólisis con ambas formulaciones fue menor a 11%. Se considera que una formulación es hemolítica si el porcentaje de hemólisis es mayor a 25%, por lo que las formulaciones desarrolladas se consideran seguras para ser administradas por esta vía (Amin K, 2006).



**Figura 26.** Porcentaje de hemólisis producido por las formulaciones de cosolventes

Dado que ambas formulaciones fueron estables durante 1 año y que la formulación F2 presentó un menor porcentaje de hemólisis, se eligió a esta última para realizar el estudio de farmacocinética.

## 7.8 ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA DEL PROFÁRMACO DE ABZ Y DE LA FORMULACIÓN EN EL SISTEMA DE COSOLVENTES

### 7.8.1 Validación del método analítico para cuantificar ABZ y ABZSO

En las Figura 27 y Figura 28 se muestran los cromatogramas típicos de una MCB y una MCA respectivamente. En ellos se puede observar que los picos obtenidos para los dos analitos y el estándar interno son simétricos, tienen buena forma y se encuentran resueltos. Además, no se encontraron interferencias en la respuesta de los analitos.

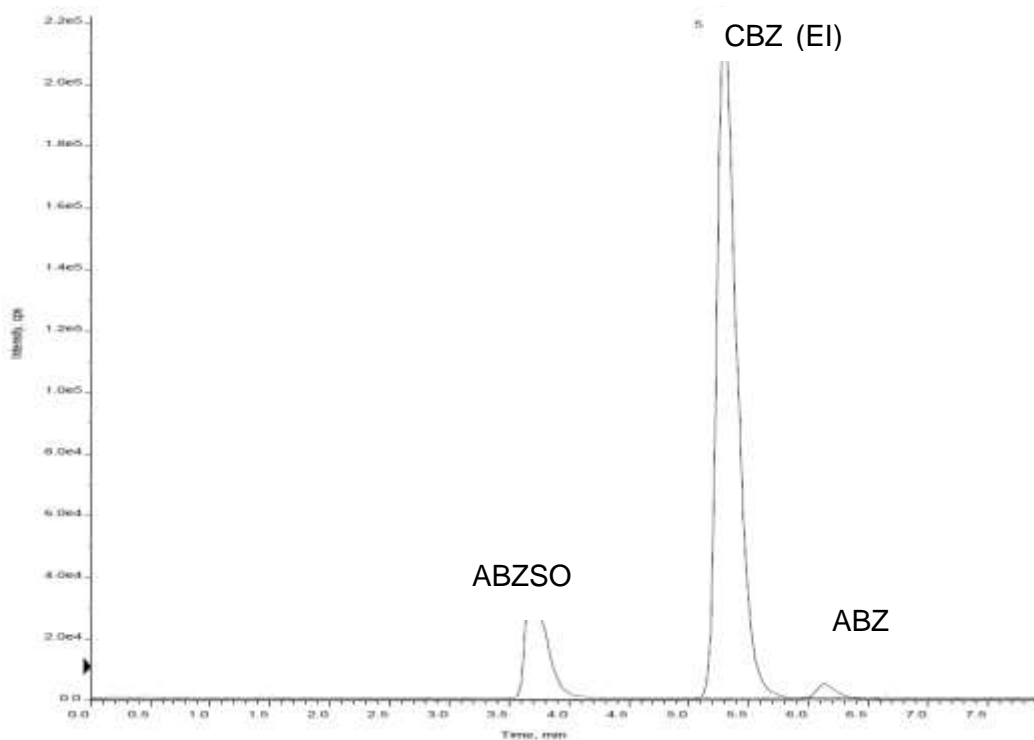


Figura 27. Cromatograma representativo de la muestra control baja (MCB)

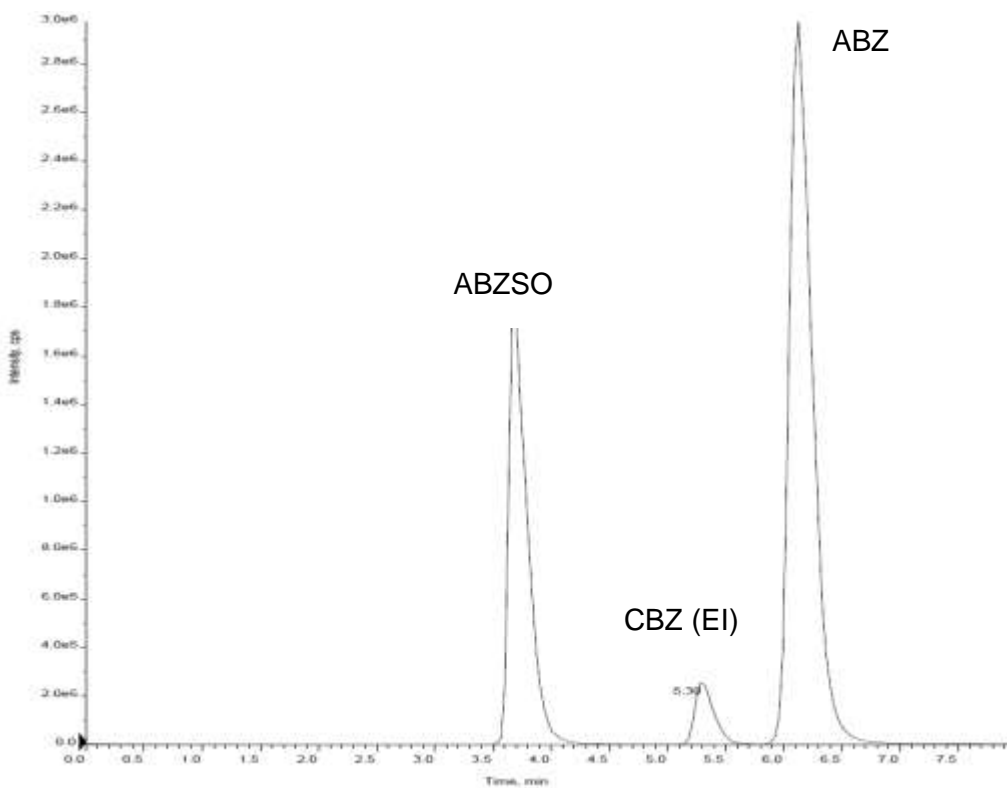


Figura 28. Cromatograma representativo de la muestra control alta (MCA)

### 7.8.1.1 Selectividad

Para la selectividad, se calculó la respuesta de la interferencia, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de respuesta (interferencia)} = \frac{\text{Área del analito o del EI en la muestra blanco}}{\text{Área promedio del analito o del EI en la muestra del LIC}} \times 100$$

Los resultados se presentan en la Tabla 20. Se demostró que el método es selectivo, ya que el porcentaje de la interferencia no fue mayor a 20 % de la respuesta obtenida para el límite de cuantificación y fue menor al 5 % para la respuesta del EI.

**Tabla 20.** Respuesta analítica de los blancos al evaluar selectividad

Tipo de blanco	% LIC ABZ	% LIC ABZSO	% EI
Normal	16.40	0.00	0.00
Normal	7.82	0.00	0.00
Normal	9.04	0.00	0.00
Conejo	5.26	0.00	0.00
Conejo	6.01	0.00	0.00
Hemolizado	10.24	0.00	0.00

### 7.8.1.2 Efecto de acarreo

Los resultados de la prueba se presentan en la Tabla 21. Después de la inyección de la concentración más alta de ABZ o ABZSO, el porcentaje de respuesta respecto al límite de cuantificación fue menor al 20% y menores al 5 % de respuesta con respecto al EI. Con ello se confirma que, bajo las condiciones analíticas empleadas, no existe efecto de acarreo.

**Tabla 21.** Respuesta de los blancos en la prueba de acarreo

Muestra	% LIC ABZ	% LIC ABZSO	% EI
Blanco 1	13.50	0.00	0.00
Blanco 2	15.50	0.00	0.00
Blanco 3	0.00	2.10	0.00

### 7.8.1.3 Efecto de matriz

En los resultados que se presentan en la Tabla 22, se reporta el valor promedio del factor de matriz normalizado (FMN), calculado de acuerdo con la ecuación mostrada en la sección 6.8.1.3.2. En ellos se observa que no existe efecto de matriz ya que el FMN es muy cercano a 1. Además, los datos fueron precisos ya que los valores de % CV fueron menores a 15% que es el límite establecido.

**Tabla 22.** Efecto de matriz normalizado para ABZ y ABZSO (n=5)

	Albendazol		Sulfóxido de albendazol	
	MCB	MCA	MCB	MCA
<b>FMN</b>	1.016	1.071	1.002	0.952
<b>DE</b>	0.066	0.020	0.028	0.019
<b>% CV</b>	6.5	1.9	2.8	2.0

### 7.8.1.4 Curva de calibración

El rango de la curva de calibración fue de 0.5 – 1000.0 ng/mL para el ABZ y de 10.0 – 1500.0 ng/mL para el ABZSO en plasma. En la figura 29 se muestra un ejemplo de una curva de calibración típica. Los datos fueron ajustados a una ponderación 1/x que fue con la que se logró el mejor ajuste.

En la Tabla 23 se muestra el % de desviación de la concentración calculada con respecto a la concentración nominal de los dos analitos en cada punto de las 3 curvas evaluadas. En ella se observa que se cumplen los criterios indicados en la NOM-177-SSA1-2013, por lo que se demuestra que el método analítico es lineal en el intervalo evaluado para ambos analitos.

**Tabla 23.** Porcentaje de desviación de la concentración calculada con respecto a la concentración nominal de ABZ y ABZSO. \*Punto eliminado para el cálculo de regresión lineal.

[ABZ] ng/mL	curva 1	curva 2	curva 3	[ABZSO] ng/mL	curva 1	curva 2	curva 3
0.5	-7.0	-3.0	-8.0	10.0	-6.4	-3.5	-3.0
1.0	10.6	3.5	14.0	20.0	-0.7	4.8	5.1
5.0	9.5	12.3	4.4	40.0	4.9	4.5	3.1
10.0	13.8	<b>16.2*</b>	10.8	100.0	-2.8	-2.5	-7.3
50.0	0.6	4.3	3.5	200.0	-4.6	2.1	3.8
100.0	6.9	6.4	2.4	500.0	-3.0	3.1	3.9
500.0	-9.4	-8.9	-12.2	1000.0	-2.5	-2.6	-0.4
1000.0	-8.8	-14.6	-14.9	1500.0	1.5	3.5	4.4

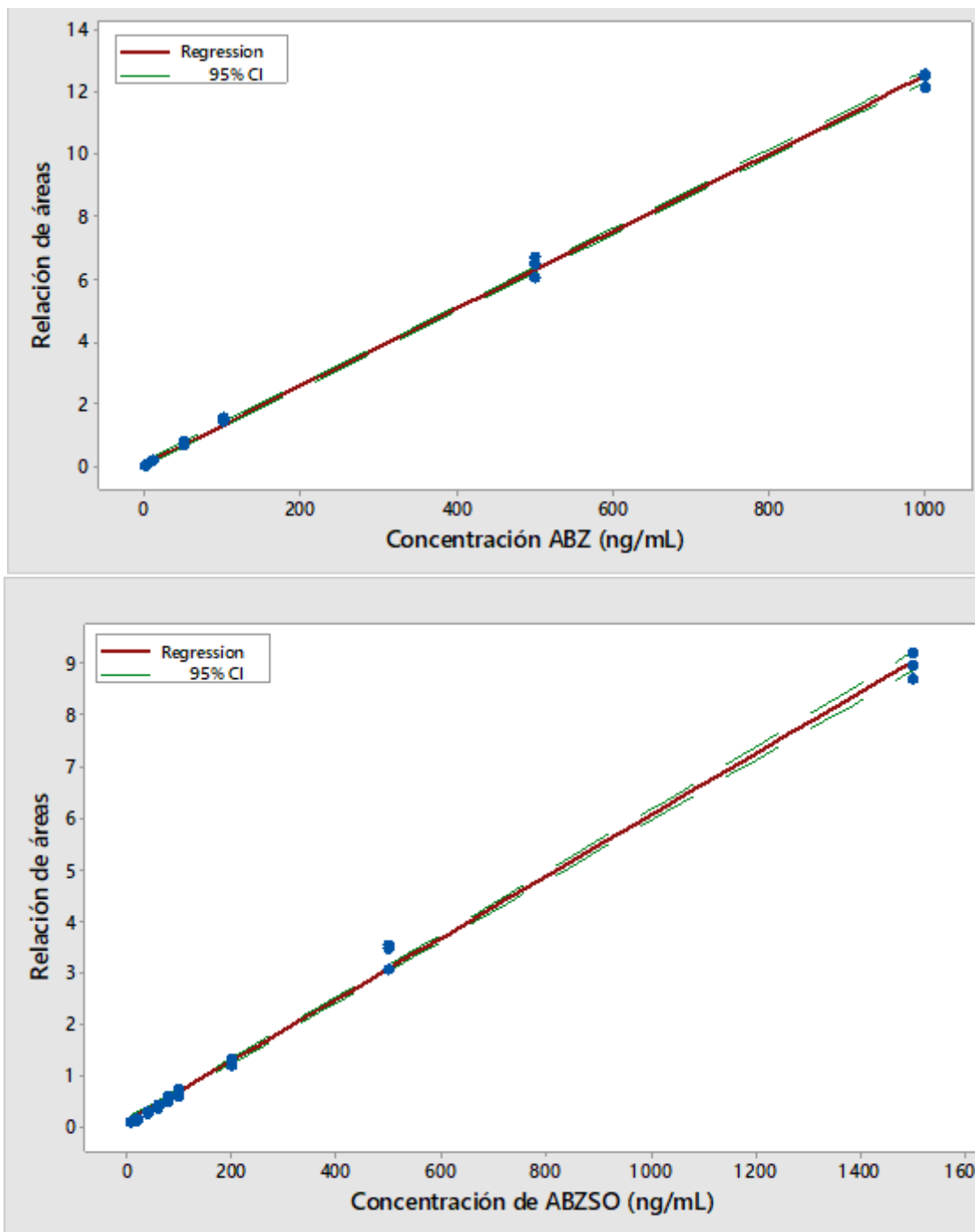


Figura 29. Curvas de calibración de ABZ y ABZSO

### 7.8.1.5 Precisión y exactitud

De acuerdo con los resultados mostrados en Tabla 24 y Tabla 25, se demostró que el método es preciso y exacto, ya que los valores de coeficiente de variación y % de desviación promedio fueron menores al 15 %. De igual forma, se obtienen valores menores a 20 % para el límite inferior, por lo que se confirma que la concentración seleccionada como LIC cumple con los criterios de precisión y exactitud.

**Tabla 24.** Repetibilidad y exactitud del método para ABZ

Répica	Concentración recuperada (ng/mL)				
	LIC	MCB	MCM1	MCM2	MCA
1	0.536	1.686	21.936	70.900	775.980
2	0.516	1.578	21.899	62.700*	759.550
3	0.551	1.663	21.942	74.300	724.520
4	0.550	1.684	21.699	74.300	752.890
5	0.514	1.631	20.753	73.300	754.370
<b>Promedio</b>	0.533	1.648	21.646	71.100	753.462
<b>DE</b>	0.02	0.05	0.51	4.90	18.59
<b>CV</b>	<b>3.3</b>	<b>2.7</b>	<b>2.4</b>	<b>6.9</b>	<b>2.5</b>
<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>	0.495	1.485	24.745	74.235	742.350
<b>Desviación (%)</b>	<b>7.8</b>	<b>11.0</b>	<b>-12.5</b>	<b>-4.2</b>	<b>1.5</b>

\*Valor con % de desviación mayor al 15%

**Tabla 25.** Repetibilidad y exactitud del método para ABZSO

Répica	Concentración recuperada (ng/mL)				
	LIC	MCB	MCM1	MCM2	MCA
1	10.1	28.2	156.4	774.6	1169.0
2	10.7	27.4	151.3	766.1	1189.0
3	10.9	27.5	155.1	792.2	1159.0
4	10.5	28.3	158.2	786.2	1169.0
5	10.3	28.0	152.8	778.3	1184.0
<b>Promedio</b>	10.5	27.9	154.8	779.5	1174.0
<b>DE</b>	0.32	0.41	2.76	10.14	12.25
<b>CV</b>	<b>3.0</b>	<b>1.5</b>	<b>1.8</b>	<b>1.3</b>	<b>1.0</b>
<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>	9.8	29.4	147.0	735.0	1225.0
<b>Desviación (%)</b>	<b>7.1</b>	<b>-5.2</b>	<b>5.3</b>	<b>6.1</b>	<b>-4.2</b>



Por otro lado, en la Tabla 26 y Tabla 27 se muestran los resultados de reproducibilidad de 3 corridas diferentes en dos días de análisis. En ella se observa que el método cumple con los criterios de precisión y exactitud, ya que los valores de %CV y % de desviación fueron menores a 15% en todos los casos.

**Tabla 26.** Reproducibilidad del método para ABZ

CORRIDA	Réplica	Concentración recuperada (ng/mL)			
		MCB	MCM1	MCM2	MCA
1	1	1.686	21.936	70.900	775.980
	2	1.578	21.899	62.700*	759.550
	3	1.663	21.942	74.300	724.520
	4	1.684	21.699	74.300	752.890
	5	1.631	20.753*	73.300	754.370
2	1	1.570	21.320	69.100	752.800
	2	1.540	21.840	73.700	711.200
	3	1.580	21.970	66.990	737.600
	4	1.500	22.100	68.200	735.200
	5	1.580	22.620	64.020	688.800
3	1	1.530	22.932	74.700	776.000
	2	1.540	21.903	71.550	741.100
	3	1.590	20.433*	73.200	746.200
	4	1.580	20.286*	73.350	760.100
	5	1.390	21.168	71.250	759.800
<b>Promedio</b>		1.576	21.653	70.771	745.074
<b>DE</b>		0.08	0.74	3.81	23.42
<b>CV</b>		<b>4.8</b>	<b>3.4</b>	<b>5.4</b>	<b>3.1</b>
<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>		1.485	24.745	74.235	742.350
<b>Desviación (%)</b>		<b>6.1</b>	<b>-12.5</b>	<b>-4.7</b>	<b>0.4</b>

\*Valor con % de desviación mayor al 15%

**Tabla 27.** Reproducibilidad del método para ABZSO

CORRIDA	Réplica	Concentración recuperada (ng/mL)			
		MCB	MCM1	MCM2	MCA
1	1	28.200	156.400	774.600	1169.000
	2	27.400	151.300	766.100	1189.000
	3	27.500	155.100	792.200	1159.000
	4	28.300	158.200	786.200	1169.000
	5	28.000	152.800	778.300	1184.000
2	1	25.300	148.000	769.100	1174.000
	2	26.900	146.400	804.400	1180.000
	3	25.500	148.300	827.500	1219.000
	4	25.200	147.400	806.000	1229.000
	5	26.200	148.600	808.900	1179.000
3	1	25.820	145.800	762.200	1121.000
	2	26.390	147.700	807.600	1126.000
	3	27.070	147.400	757.800	1157.000
	4	24.890*	145.100	798.900	1134.000
	5	24.610*	143.800	770.100	1180.000
<b>Promedio</b>		26.485	149.487	787.327	1171.267
<b>DE</b>		1.24	4.31	20.90	30.04
<b>CV</b>		<b>4.7</b>	<b>2.9</b>	<b>2.7</b>	<b>2.6</b>
<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>		29.400	147.000	735.000	1225.000
<b>Desviación (%)</b>		<b>-9.9</b>	<b>1.7</b>	<b>7.1</b>	<b>-4.4</b>

\*Valor con % de desviación mayor al 15%

### 7.8.1.6 Efecto de la dilución

Los resultados de precisión y exactitud obtenidos al realizar una dilución 1:2 y 1:5, se presentan en la Tabla 28. Se puede observar que, con ambas diluciones se mantienen los criterios de precisión y exactitud.

**Tabla 28.** Precisión y exactitud en muestras control diluidas

Réplica	Concentración recuperada (ng/mL)			
	ABZ		ABZSO	
	1:5	1:2	1:5	1:2
1	1247.6	1470.9	2485.5	2432.0
2	1240.8	1553.3	2571.3	2526.0
3	1310.7	1592.6	2622.7	2461.0
4	1319.8	1510.4	2342.1	2342.0
5	1288.8	1450.2	2537.0	2537.0
<b>Promedio</b>	1281.5	1515.5	2511.7	2459.6
<b>DE</b>	35.99	58.42	107.20	79.05
<b>CV</b>	<b>2.8</b>	<b>3.9</b>	<b>4.3</b>	<b>3.2</b>
<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>	1484.700	1484.700	2720.000	2450.000
<b>Desviación (%)</b>	<b>-13.7</b>	<b>2.1</b>	<b>-7.7</b>	<b>0.4</b>

### 7.8.1.7 Matriz sustituta

Para asegurar la confiabilidad de los resultados al emplear plasma humano para la curva de calibración en lugar plasma de conejo, se evaluó el efecto de la matriz sustituta. Para ello se prepararon muestras en plasma de conejo conteniendo una concentración conocida de ABZ y ABZSO y se interpolaron en una curva de calibración en plasma humano. Los resultados de precisión y exactitud se muestran en la Tabla 29 y Tabla 30. En ella se puede observar que se cumplen los criterios de precisión y exactitud para los dos analitos, por lo que es confiable utilizar la curva de calibración en plasma humano para interpolar las concentraciones de las muestras obtenidas en el estudio de farmacocinética en conejos.

**Tabla 29.** Precisión y exactitud obtenido en la prueba de matriz sustituta para ABZ.

Réplica	Concentración recuperada (ng/mL)			
	MCB	MCM1	MCM2	MCA
1	1.708	28.720	79.380	760.890
2	1.586	28.270	84.689	696.800
3	1.708	27.370	82.980	740.100
<b>Promedio</b>	1.667	28.120	82.350	732.597
<b>DE</b>	0.07	0.69	2.71	32.70
<b>CV</b>	<b>4.2</b>	<b>2.4</b>	<b>3.3</b>	<b>4.5</b>
<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>	1.485	24.745	74.235	742.350
<b>Desviación (%)</b>	<b>12.3</b>	<b>13.6</b>	<b>10.9</b>	<b>-1.3</b>

**Tabla 30.** Precisión y exactitud obtenido en la prueba de matriz sustituta para ABZSO.

Réplica	Concentración recuperada (ng/mL)			
	MCB1	MCM1	MCM2	MCA
1	25.125	141.950	638.850	1030.100
2	25.436	144.920	682.050	1052.120
3	25.873	147.700	638.210	1057.530
<b>Promedio</b>	25.478	144.857	653.037	1046.583
<b>DE</b>	0.38	2.88	25.13	14.53
<b>CV</b>	1.5	2.0	3.8	1.4
<b>Conc. nominal (ng/mL)</b>	29.400	147.000	735.000	1225.000
<b>Desviación (%)</b>	-13.3	-1.5	-11.2	-14.6

### 7.8.1.8 Estabilidad

Considerando que la estabilidad del ABZ y ABZSO ya se había demostrado previamente, en el presente trabajo solamente se evaluó la estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador. Como se muestra en la Tabla 31, ambos analitos cumplieron con los criterios de precisión y exactitud, por lo que se concluye que las muestras fueron estables durante 39 h para el ABZ y 45 h para el ABZSO.

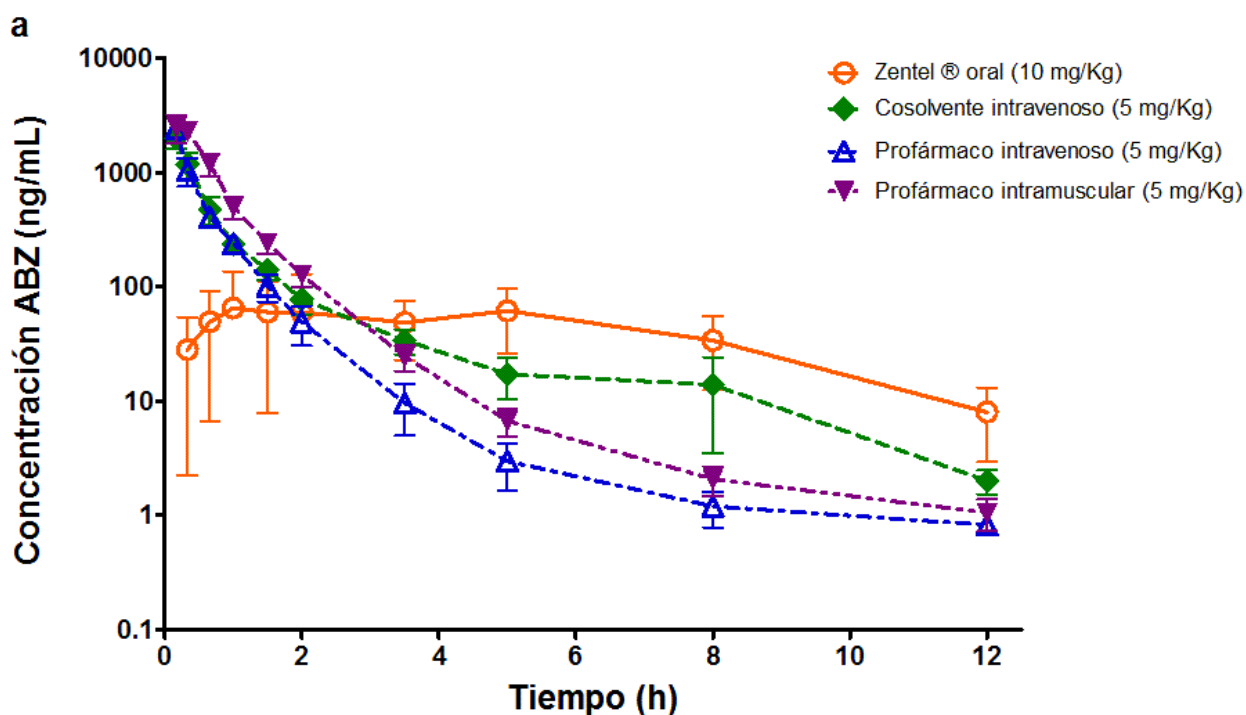
**Tabla 31.** Estabilidad en el automuestreador

Réplica	Concentración recuperada (ng/mL)			
	ABZ, 39 h		ABZSO, 45 h	
	MCB	MCA	MCB	MCA
1	1.140	753.120	28.800	1250.000
2	1.280	744.070	28.200	1290.000
3	1.260	798.340	28.000	1280.000
4	1.090	777.620	29.800	1220.000
5	1.200	815.160	30.200	1250.000
<b>Promedio</b>	1.194	777.662	29.000	1258.000
<b>DE</b>	0.08	29.85	0.97	27.75
<b>CV</b>	6.7	3.8	3.3	2.2
<b>Conc. nominal (pg/mL)</b>	1.240	742.350	29.400	1225.000
<b>Desviación (%)</b>	-3.7	4.8	-1.4	2.7

### 7.8.2 Farmacocinética de ABZ en las diferentes formulaciones desarrolladas

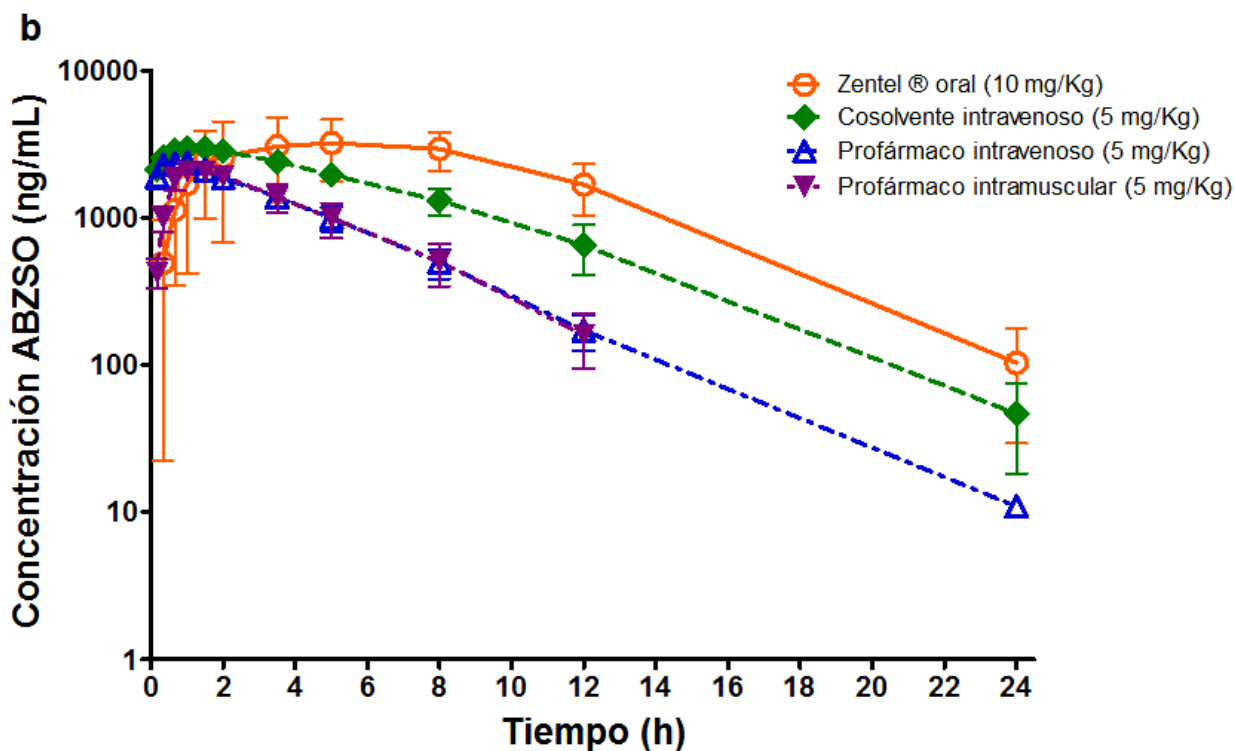
Existen diferentes reportes en la literatura indicando que, por el extenso metabolismo de primer paso, las concentraciones de albendazol eran muy bajas por lo que no era posible caracterizar su perfil farmacocinético (Alvarez, et al., 1999). Por la sensibilidad del método desarrollado, en el presente estudio fue posible cuantificar el ABZ, encontrando concentraciones medibles hasta las 12 h. La Figura 30 muestra el perfil de concentración vs tiempo obtenido. Los resultados mostraron que, después de la administración por vía oral, existe una gran variabilidad en las concentraciones plasmáticas de ABZ durante las primeras dos horas. Este comportamiento concuerda con los resultados previos reportados en humanos (Jung Cook, 2012).

Asimismo, se encontró que, durante las primeras dos horas, las concentraciones fueron mucho mayores después de la administración parenteral, aun cuando la dosis por vía oral fue el doble. Estos datos corroboran la baja biodisponibilidad oral del ABZ reportada previamente.



**Figura 30.** Perfil de concentración plasmática vs tiempo de ABZ (media  $\pm$  desviación estándar)

En la Figura 31 se presentan los resultados de concentración plasmática vs tiempo del ABZSO. En ella se puede observar que, por la vía oral, el metabolito también presenta una alta variabilidad en las concentraciones durante las primeras 2 h. Además, es de resaltar que las concentraciones fueron cuantificables hasta las 24 h.



**Figura 31.** Perfil de concentración plasmática vs tiempo de ABZSO (media  $\pm$  desviación estándar)

En las tablas 32 y 33 se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos. En ellas se puede observar que, en todas las vías de administración, la vida media del ABZ fue más corta que la del ABZSO. Esta rápida desaparición del ABZ del torrente sanguíneo se debe a su rápido metabolismo, así como a su amplia distribución a los tejidos, lo cual se comprueba con el gran volumen de distribución ( $V_z$ ) obtenido, resultado que concuerda con lo reportado por Li, et al, (1995) quienes encontraron una amplia distribución del ABZ a tejido muscular, hígado, corazón y riñón de conejo.

Al comparar los valores de vida media ABZ en las diferentes vías de administración, se encontró que no existe una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ellas. Para el caso del ABZSO, tampoco se encontraron diferencias significativas en la vida media entre las diferentes vías de administración, lo que indica que el proceso de eliminación tanto del fármaco como del metabolito es el mismo sin importar la vía ni la dosis administrada.

**Tabla 32.** Parámetros farmacocinéticos de ABZ en conejos (n=6)

Formulación (vía) <i>Dosis</i>	Cosolventes (IV) <i>5 mg/Kg</i>	Zentel® (oral) <i>10 mg/Kg</i>	Profármaco (IV) <i>5 mg/Kg</i>	Profármaco (IM) <i>5 mg/Kg</i>
$K_e$ ( $h^{-1}$ )	$0.345 \pm 0.061$	$0.316 \pm 0.096$	$0.667 \pm 0.339$	$0.448 \pm 0.211$
$t_{1/2}$ (h)	$2.06 \pm 0.31$	$2.34 \pm 0.60$	$1.51 \pm 1.12$	$1.88 \pm 0.92$
$T_{max}$ (h)	---	4.25 (0.67 – 5.00)	---	0.42 (0.17 – 0.75)
$C_{max}$ (ng/mL)/ $C_0$ (i.v.)	$3,892.31 \pm 1672.33$	$91.33 \pm 62.12$	$5,607.52 \pm 2805.15$	$2,257.33 \pm 574.06$
$C_{max}/dose$ (ng/mL/mg)	$259.49 \pm 111.49$	$2.85 \pm 1.94^{**}$	$353.12 \pm 176.65$	$150.49 \pm 38.27$
$AUC_{last}$ (ng*h/mL)	$1,750.88 \pm 433.13$	$522.11 \pm 295.97$	$1,926.06 \pm 579.53$	$1,897.89 \pm 303.70$
$AUC_{last}/Dose$ (ng*h/mL/mg)	$116.73 \pm 28.88$	$16.32 \pm 9.25^{**}$	$128.40 \pm 38.64$	$126.53 \pm 20.25$
$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	$1,755.20 \pm 434.64$	$541.69 \pm 291.62$	$1,928.14 \pm 579.40$	$1,900.66 \pm 303.60$
$V_z$ (mL)	$30,906.22 \pm 21,903.06$	---	$23,807.28 \pm 18,528.73$	---
Cl (mL/h)	$9,049.15 \pm 2459.85$	---	$8,328.39 \pm 2231.75$	---
F (%)	---	$15.5 \pm 9.7$	---	$102.6 \pm 20.9$

Los valores reportados son la media  $\pm$  SD, excepto para  $T_{max}$  donde se reporta mediana (rango)

\*\*p < 0.01 en prueba de Tukey vs las otras vías

Este es el primer estudio en el que se reportan los parámetros farmacocinéticos del ABZ en conejos. Los resultados muestran que el valor de  $t_{max}$  es mucho más variable por la vía oral que después de la administración del profármaco por vía parenteral. Asimismo, el valor de  $t_{max}$  es más rápido después de la administración del profármaco por vía intramuscular, lo que demuestra nuevamente la rápida hidrólisis del ABZ. En el caso del volumen de distribución, este es muy alto, lo cual podría estar relacionado a la alta lipofilidad del ABZ.

En el caso de ABZSO, los valores de  $t_{1/2}$  y  $t_{max}$ , encontrados en el presente estudio concuerdan con los reportados previamente (Kohri, 1999) (Li, et al., 1995).

Al comparar los parámetros farmacocinéticos de ABZ obtenidos por vía oral con los de la vía parenteral, se encontró una diferencia significativa (p<0.01) en el AUC corregida por la dosis, lo que indica que la cantidad absorbida por la vía oral es mucho menor. Al calcular la biodisponibilidad absoluta de la vía oral se encontró que es de 15.5%. En la literatura se menciona la baja biodisponibilidad de ABZ, sin embargo, este es el primer reporte del valor obtenido experimentalmente, el cual indica que solo el 15% de la dosis administrada llega a la circulación sistémica.

Al analizar los resultados obtenidos después de la administración intravenosa del profármaco y de la formulación de ABZ en el sistema de cosolventes, se encontró que las concentraciones plasmáticas fueron muy similares (Figura 30), lo cual indica que la liberación del ABZ del profármaco es muy rápida. Estos resultados se correlacionan con los obtenidos *in vitro* de la hidrólisis del profármaco y al hidrolizarse tan rápidamente, el comportamiento corresponde al de una formulación de ABZ. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos entre ambos productos.

Por otro lado, al comparar la administración del profármaco por vía intramuscular y por vía intravenosa, se encontró que no existen diferencias significativas entre ellos. Al calcular la biodisponibilidad del profármaco por vía intramuscular, esta fue completa con un valor de 102.6% respecto a la vía intravenosa. Con estas consideraciones, la vía intramuscular podría ser considerada la mejor vía de administración del profármaco ya que es más segura que la vía intravenosa.

De manera similar, al comparar los parámetros farmacocinéticos del ABZSO después de la administración del profármaco por las dos vías, no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que las formulaciones evaluadas presentan un comportamiento farmacocinético similar tanto para ABZ como para ABZSO.

**Tabla 33.** Parámetros farmacocinéticos de ABZSO en conejos (n=6)

Formulación (vía) <i>Dosis</i>	Cosolventes (IV) <i>5 mg/Kg</i>	Zentel® (oral) <i>10 mg/Kg</i>	Profármaco (IV) <i>5 mg/Kg</i>	Profármaco (IM) <i>5 mg/Kg</i>
$K_e$ ( $h^{-1}$ )	0.227 ± 0.048	0.235 ± 0.056	0.261 ± 0.016	0.269 ± 0.037
$t_{1/2}$ (h)	3.17 ± 0.57	3.08 ± 0.63	2.66 ± 0.16	2.61 ± 0.31
$T_{max}$ (h)	1.53 (0.66 – 1.58)	5.00 (3.57 – 8.15)	0.87 (0.73-1.25)	1.48 (1.15 – 2.00)
$C_{max}$ (ng/mL)	3,050.47 ± 205.34	3,641.68 ± 1491.04	2,412.08 ± 222.55	2,130.37 ± 174.99
$AUC_{last}$ (ng*h/mL)	25,781.02 ± 4,262.08	41,345.41 ± 14,188.88	12,252.11 ± 1,610.02	11,205.75 ± 2,075.62
$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	26,014.72 ± 4373.40	41,857.83 ± 14,271.74	12,759.72 ± 1,593.98	11,831.05 ± 2,354.29
ABZSO/ABZ $AUC_{0-\infty}$ ratio	15.63 ± 4.38	89.80 ± 37.26**	7.03 ± 1.95	6.46 ± 2.03

Los valores reportados son la media ± SD, excepto para  $T_{max}$  donde se reporta mediana (rango)

\*\*p < 0.05 en prueba de Tukey vs las otras vías



Considerando que se ha propuesto el uso de ABZ para el tratamiento de cáncer y que algunos estudios han demostrado que presenta una mejor actividad que su metabolito ABZSO (Cai ZY, 2007) (Králová, et al., 2013), se consideró importante determinar la proporción de metabolito formado en cada una de las vías. Dicha comparación se realizó empleando el cociente entre el AUC del ABZSO entre el AUC del ABZ. Los resultados presentados en la Tabla 33 muestran que hay una mayor formación del metabolito ( $p < 0.05$ ) por la vía oral que por la vía parenteral. Considerando que el ABZ presenta una mayor lipofilicidad (Cai ZY, 2007) y que no es sustrato de los transportadores de eflujo BCRP 1 y P-gp (Merino, et al., 2005), estas formulaciones permitirían que el ABZ alcance su sitio de acción y penetre más fácilmente en las células blanco. Los resultados obtenidos son prometedores y sustentan la necesidad de realizar otros estudios para evaluar la eficacia de estas formulaciones en modelos de cáncer *in vivo*.

## 8. CONCLUSIONES

Se desarrollaron dos formulaciones parenterales de ABZ, una de ellas a través de la síntesis de un profármaco fosfonooximetilado y la otra empleando la técnica de cosolventes. Con ambas estrategias se logró un aumento significativo en la solubilidad de ABZ.

El estudio de hidrólisis *in vitro* empleando fosfatasa alcalina, mostró que el profármaco es sustrato de esta enzima y que la liberación del ABZ fue rápida con una vida media de  $8.72 \pm 0.23$  min.

La formulación conteniendo el ABZ en el sistema de cosolventes no presentó hemólisis y fue estable a temperatura ambiente por al menos 12 meses.

Ambas formulaciones mostraron una mejora significativa en la exposición plasmática de ABZ en comparación con la administración oral. Además, la vía parenteral mostró una disminución significativa en la formación del metabolito ABZSO.

Dado que el perfil farmacocinético de las formulaciones parenterales desarrolladas fue semejante, cualquiera de ellas podría ser buena opción para el tratamiento de enfermedades sistémicas.

Considerando que la formulación de ABZ en el sistema de cosolventes es fácil de preparar y más económica, sería la de elección para continuar con la investigación para su uso para el tratamiento de cáncer.

## 9. PERSPECTIVAS

- Optimizar la formulación de ABZ en el sistema de cosolventes para su uso intramuscular.
- Evaluar la farmacocinética de la formulación de cosolventes por vía intramuscular.
- Evaluar la toxicidad aguda y crónica de la formulación conteniendo cosolventes.
- Realizar un estudio de eficacia de la formulación de ABZ con cosolventes, en un modelo *in xenograft* de cáncer de páncreas.

## 10. REFERENCIAS

- Aldaco-Sarvide, F., Pérez-Pérez, P., Cervántes-Sánchez, G., Torrecillas-Torres, L., Erazo-Valle-Sólis, A., Cabrera-Galeana, P., Cárdenas-Cárdenas, E. (2018). Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 17(1), 28-34.
- Alvarez, L., Lifschitz, A., Entrocasso, C., Manazza, J., Mottier, L., Borda, B.M., Lanusse, C. (2008). Evaluation of the interaction between ivermectin and albendazole following their combined use in lambs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(3), 230-239. PMID: 18471144
- Alvarez, L., Sanchez, S., Lanusse, C. (1999). In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behavior in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. Ther, 22, 77-86.
- American Cancer Society. (2019). *Etapas del cáncer de páncreas*. Recuperado el 24 de Julio de 2013, de <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-pancreas/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-por-etapas.html#:~:text=Los%20c%C3%A1nceres%20de%20p%C3%A1ncreas%20en,signif%20ica%20un%20c%C3%A1ncer%20m%C3%A1s%20avanzado>.
- Amin, K., Dannenfelser, RM. (2006). *In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 95(6):1173-1176
- Cai ,ZY, Galettis, P., Lu,Y., Morris, DL., Pourgholami, MH. (2007). Pharmacokinetics of albendazole in New Zealand white rabbits: oral versus intraperitoneal administration. *Anticancer Research*, 27, 417-422.
- Castro, L., Kwiecinski, M., Ourique, F., Parisotto, E., Grinevicius, V., Correia, J., Pedrosa, R. (2016). Albendazole as a promising molecule for tumor control. *Redox Biology*, 10, 90-99.
- Chassaing, C. P. (2009). *Estados Unidos de América Patente nº US2009/0131369 A1*.
- Chassaing, C., Berger, M., Heckerroth, A., Ilg, T., Jaeger, M., Kern, C., Uphoff, M. (2008). Highly Water-Soluble Prodrugs of Anthelmintic f anthelmintic benzimidazole carbamates: synthesis, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *Journal of Medicinal Chemistry* 13;51(5):1111-4. doi: 10.1021/jm701456r
- Chen, H., Weng, Z., Xu, C. (2020). Albendazole supresses cell proliferation and migration and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells . *Anti-cancer drugs*, 31(5), 431-439.

- Chen, H., Zhou, X., Weng, Z., Wei, X., Xu, C., & He, Y. (2020). Albendazole regulates radiosensitivity of human pancreatic cancer cells by inhibiting HIF-1 $\alpha$  and basic fibroblast growth factor. *Research Square*. doi:10.21203/rs.2.20141/v1
- Chow, D. S-L., Liang, D. (2008). *Estados Unidos de América Patente nº US 7,419,996 B2*.
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J. L., Artru, P. B. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(25), 2395-2406.
- Dal Negro, G., Cristofori, P. (1996). A new approach for evaluation of the in vitro haemolytic potential of a solution of a new medicine. *Comparative Haematology International*, 6, 35-41.
- Dayan, A. D. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, ;86(2-3):141-59. doi: 10.1016/s0001
- De Silva, N., Guyatt, H., Bundy, D. (1997). Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs*, 53(5), 769-788.
- Edwards, G., Breckenridge, A. (1988). Clinical pharmacokinetics of anthelmintic drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 15 (2), 67-93.
- Ehteda, A., Galettis, P., Wai Ling Chu, S., Pillai, K., & Morris, D. (2012). Complexation of Albendazole with Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin Significantly Improves its Pharmacokinetic Profile, Cell Cytotoxicity and Antitumor Efficacy in Nude Mice. *Anticancer Research*, 32, 3659-3666.
- Evans, B., Nelson, C., Yu, S., Beavers, K., Kim, A., Li, H., Duvall, C. (2013). Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *Journal of Visualized Experiments*, 73, 1-5.
- Evrard, B., Chiap, P., DeTullio, P., Ghalmi, F., Piel, G., Van Hees, T., Delattre, L. (2002). Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Journal of Controlled release*, 85, 45-50.
- Fischer, J., Patel, T., Fischer, P. (2003). Fosphenytoin. Clinical Pharmacokinetics and Comparative Advantages in the Acute Treatment of Seizures. *Drug Disposition*, 42(1), 33-58.
- Flores-Ramos, M., Ibarra-Velarde, F., Hernández-Campos, A., Vera-Montenegro, Y., Jung-Cook, H., Cantó-Alarcón, GJ., Del Rivero, LM., Castillo, R. (2014). A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(24), 5814-5817.

- Gupta, P. K., Brazeau, G. A. (2010). *Injectable Drug Development. Techniques to reduce pain and irritation*. New York: Informa Healthcare.
- Hettiarachchi, G., Samanta, S., Falcinelli, S., Zhang, B., Moncelet, D., Isaacs, L., Briken, V. (2016). Acyclic cucurbit[n]uril-type molecular container enables systemic delivery of effective doses of albendazole for treatment of SK-OV-3 xenograft tumors. *Molecular Pharmaceutics*, 13(3), 808-818.
- Hidalgo, M., Álvarez R., Gallego, J., Guillén-Ponce, C., Laquente, B., Macarulla, T., Muñoz, A., Salgado, M., Vera, R., Adeva, J., Alés, I., Arévalo, S., Blázquez, J., Calsina, A., Carmona, A., de Madaria, E., Díaz, R., Díez, L., Fernández, T., de Paredes, B.G., Gallardo, M.E., González, I., Hernando, O., Jiménez, P., López, A., López, C., López-Ríos, F., Martín, E., Martínez, J., Martínez, A., Montans, J., Pazo, R., Plaza, J.C., Peiró, I., Reina, J.J., Sanjuanbenito, A., Yaya, R., Carrato, A. (2017). Consensus guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of patients with pancreatic cancer in Spain. *Clinical and Translational Oncology*, 19(6), 667-681.
- Horton, J. (2000). Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitology*, 121 Suppl:S113-32. doi: 10.1017/s0031182000007290.
- Agency for Research on Cancer, WHO. (2023). *Cancer Today, GLOBOCAN*. Recuperado el 24 de Julio de 2023, de [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=1](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=1)
- Jung Cook, H. (2012). Pharmacokinetic variability of anthelmintics: implications for the treatment of neurocysticercosis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 5(1), 21 - 30.
- Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., Moreno Esparza, R. (1998). Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50 (1), 43-48.
- Kang, B.S., Choi, J.S., Lee, S.E., Lee, J.K., Kim, T.H., Jang, W.S., Tunsirikongkon, A., Kim, J.K., Park, J.S. (2017). Enhancing the in vitro anticancer activity of albendazole incorporated into chitosan-coated PLGA nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 159, 39-47.
- Kang, B.S., Lee, S.E., Ng, C. L., Cho, C.W., Park, J.S. (2015). Determination of preparation parameters for albendazole-loaded nanoparticles using chitosan and tripolyphosphate. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. doi:10.1007/s40005-015-0171-6

- Karimunnisa, S., Puja, P., Sangita, K., Chellampillai, B. (2018). Development and evaluation of a novel drug delivery system for albendazole. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52(3), 408-415
- Khalilzadeh, A., Wangoo, K.T., Morris, D.L., Pourgholami, M.H. (2007). Etoposide-resistant leukemic cells CEM/dEpoB300 are sensitive to albendazole: Involvement of apoptotic pathways. *Biochemical Pharmacology*, 74(3), 407-414. doi:10.1016/j.bcp.2007.05.006
- Kohri, N., Yamayoshi, Y., Xin, H., Iseki, K., Sato, N., Todo, S., Miyazaki K. (1999). Improving the oral bioavailability of albendazole in rabbits by the solid dispersion technique. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(2), 159-164.
- Králóvá, V., Hanusova, V., Stankova, P., Knoppova, K., Canova, K., Skalova, L. (2013). Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anti-Cancer Drugs*, 24(9), 911-919.
- Lanchote, V.L., Takayanagui, O. M., Mateus, F. H. (2004). Enantioselective renal excretion of albendazole metabolites in patients with neurocysticercosis. *Chirality*, 16, 520-525.
- Li, T., Qiao, G.L., Hu, G.Z., Meng, F.D., Qiu, Y.S., Zhang, X.Y., Guo, W.X., Yie, H.L., Li, S.F., Li, S.Y. (1995). Comparative plasma and tissue pharmacokinetics and drug residue profiles of different chemotherapeutants in fowls and rabbits. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18(4), 260 - 273.
- Liu, Y., Wang, X.Q., Ren, W.X., Chen, Y.L., Yu, Y., Zhang, J.K., Bawudong, D., Gu, J.P., Xu, X.D., Zhang XN. (2013). Novel albendazole-chitosan nanoparticles for intestinal absorption enhancement and hepatic targeting improvement in rats. *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*, 101B(6). doi: 10.1002/jbm.b.32908
- Lu, H., Noorani, L., Jiang, Y., Du, A., Stenzel, a. M. (2017). Penetration and drug delivery of albumin nanoparticles into pancreatic multicellular tumor spheroids. *Journal of Materials Chemistry B*. doi:10.1039/C7TB02902K.
- Mahajan, S., Singh, I.P. (2012). Determining and reporting purity of organic molecules: why qNMR. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 51(2), 76-81. doi.org/10.1002/mrc.3906
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R., Jones, C., Coleman, H., McCain, R. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, 24(43), 4846-4861.
- Merino, G., Alvarez, A. I., Prieto, J. G., Kim, R. B. (2002). The anthelmintic agent albendazole does not interact with P-glycoprotein. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(4), 365-369.

- Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., Pulido, M. M., Molina, A. J., Alvarez, A. I., Schinkel, A. H. (2005). Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition*, 33(5), 614-618.
- Mottier, M. L., Alvarez, L. I., Pis, M. A., & Lanusse, C. E. (2003). Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol-water partition coefficients. *Experimental Parasitology*, 103 (1), 1-7.
- Movahedi, F., Li, L., Gu, W., Ping Xu, Z. (2017). Nanoformulations of albendazole as effective anticancer and atiparasite agents. *Nanomedicine*, 12(20), 2555-2574.
- National Cancer Institute. (2020). *Cancer Stat Facts*. Recuperado el 24 de Julio de 2023, de <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html>
- Noorani, L., Stenzel, M., Liang, R., Pourgholami, M., Morris, D. L. (2015). Albumine nanoparticles increase the anticancer efficacy of albendazole in ovarian cancer xenograft model. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(25), 1-12.
- Ochoa, D., Saiz-Rodríguez, M., González-Rojano, E., Román, M., Sánchez-Rojas, S., Wojnicz, A., Ruiz Nuño, A., García-Arieta, A., Abad-Santos, F. (2021). High-Fat Breakfast increases bioavailability of albendazole compared to low-fat breakfast: Single-dose study in healthy subjects. *Frontiers in Pharmacology*, Apr 15;12:664465. doi 10.3389/fphar.2021.664465.
- Osorio, R., Carillo Mezo, R., Romo, M., Toledo, A., Matus, C., González Hernández, I., Jung-Cook, H., Fleury, A. (2019). Factors Associated with cysticidal treatment response in extraparenchymal neurocysticercosis. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 59(4), 548-556.
- Pace, R., Regmi, Y. (2006). The Finkelstein reaction: Quantitative reaction kinetics of an SN2 reaction using nonaqueous conductivity. *Journal of Chemical Education*, 83(9), 1344-1348.
- Paredes, A., de Campos Lourenco, T., Marzal, M., Rivera, A., Dorny, P., Mahanty, S., Guerra-Giraldez, C., García, H.H., Nash, T.E., Cass, Q. B. (2013). In vitro analysis of albendazole sulfoxide enantiomers shows that (+)-(R)-Albendazole sulfoxide is the active enantiomer against *Taenia solium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 944-949.
- Patel, K., Doudican, N., Schiff, P., Orlow, S. (2011). Albendazole sensitizes cancer cells to ionizing radiation. *Radiation Oncology*, 6: 160. doi: 10.1186/1748-717X
- Pourgholami, M. H., Akhter, J., Wang, L., Lu, Y., Morris, D. L. (2005). Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in



- xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother Pharmacol* , 55 (5), 425-432.
- Pourgholami, M. H., Wangoo, K. T., & Morris, D. L. (2008). Albendazole-Cyclodextrin complex: enhanced cytotoxicity in ovarian cancer cells. *Anticancer Research*, 28, 2775-2780.
- Pourgholami, M., Woon, L., Almajd, R., Akhter, J., Bowery, P., & Morris, D. (2001). In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. *Cancer Letters* , 165 (1), 43-49.
- Pranzo, M., Cruickshank, D., Coruzzi, M., Caira, M., & Bettini, R. (2010). Enantiotropically related albendazole polymorphs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(9), 3731-3742.
- Pushpakom S, I. F. (2019). Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(1), 41-58.
- Rawden, H., Kokwaro, G., Ward, S., & Edwards, G. (2000). Relative contribution of cytochromes P-450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 49 (4), 313-322.
- Rivera, J., Yépez Mullia, L., Hernández Campos, A., Moreno Esparza, R., Castillo, R., Navarrete Vázquez, G., Fuentes-Noriega, I., Jung Cook, H. (2007). Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 343, 159-165.
- Rodriguez, J., Bories, C., Emery, I., Fessi, H., Devissaguet, J., Liance, M. (1995). Development of an injectable formulation of albendazole and in vivo evaluation of its efficacy against *Echinococcus multilocularis* metacestode. *International Journal of Parasitology*, 25(12), 1437-1441.
- Samanta, K., Setua, S., Kumari, S., Jaggi, M., Yallapu, M., Chauhan, S. (2019). Gemcitabine combination nano therapies for pancreatic cancer. *Pharmaceutics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11111057>
- Sánchez Morales, G., Moguel Valladares, R., Flores Maza, J., Clemente Gutiérrez, U., Sánchez-García Ramos, E., Domínguez Rosado, I., Chan Núñez, L. (2021). Adenocarcinoma ductal de páncreas. Experiencia de 11 años en un centro de tercer nivel. *Revista de Gastroenterología de México*, 86(2), 118-124.
- Shaikh, J., Pradhan, R., Dandawate, P. R., Subramaniam, D., Ponnurangam, S., Martis, E. A. F., Ranpise, N., Coutinho, E., Evans, C., Khan, E. M., Padhye, S., Anant, S. (2017). Spectral and molecular modeling studies on the influence of b-cyclodextrin and its

- derivatives on albendazole and its anti-proliferative activity against pancreatic cancer cells . *Journal of Pharmaceutical Sciences and Pharmacology*, 3, 1-14.
- Shim J.S, L. J. (2014 ). Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *International Journal of Biological Sciences*, 10(7), 654-663.
- Sotelo, J., Jung, H. (1998). Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis . *Clinical Pharmacokinetics*, 34(6), 503-515.
- Soto Romo, S. (2018). Tesis de Maestría. *Estudios in vitro e in vivo de productos comerciales conteniendo albendazol*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Strickley, R. G. (2004). Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 201-230.
- Takagi, T., Ramachandran, C., Bermejo, M., Yamashita, S., Yu, L., Amidon, G. (2006). A provisional biopharmaceutical classification of the top 200 oral drug products in the United States, Great Britain, Spain and Japan . *Molecular Pharmaceutics*, 3(6), 631-643.
- U.S Food and Drug Administration. (2020). *Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products*. Recuperado el 10 de Agosto de 2020, de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>
- U.S. Food and Drug Administration. (2008). *Guidance for Industry: Drug Stability Guidelines*. Recuperado el 30 de Noviembre de 2022, de <https://www.fda.gov/media/69957/download>
- Vaquero, E., Castells, A. (2014). Tumores malignos del páncreas. En: *Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica* (págs. 657-666). Jarpyo Editores.
- Vinarov, Z., Gancheva, G., Katev, V., Tcholakova, S. (2018). Albendazole solution formulation via vesicle-to-micelle transition of phospholipid-surfactant aggregates. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 44(7), 1130-1138.
- Wuang, L.J., Lee, Y.C., Huang, C.H., Shi, Y.J., Chen, Y.J., Pei, S.N., Chow, Y.W., Chang, L.S. (2019). Non-mitotic effect of albendazole triggers apoptosis of human leukemia cells via SIRT3/ROS/p38 MAPK/TTP axis-mediated TNF- $\alpha$  upregulation. *Biochemical Pharmacology*, 162, 154-168.
- Yang, J., Li, J., Zhu, R., Zhang, H., Zheng, Y., Dai, W., Wang, F., Shen, M., Chen, K., Cheng, P., Zhang, Y., Wang, C., Wang, J., Xia, Y., Lu, J., Zhou, Y., Guo, C. (2014). K-ras mutational status in cytohistological tissue as a molecular marker for the diagnosis of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Disease Markers*, 2014. doi: 10.1155/2014/573783.

- Yeh, M.-K., Chang, L.C., Chiou, A. H.J. (2009). Improving tenoxicam solubility and bioavailability by cosolvent system. *AAPS PharmSciTech*, 10(1), 166-171.
- Zhang, X.N., Tang, L.H., Gong, J.H., Xu, X.Y., Zhang, Q. (2006). Alternative alendazole polybutylcyanoacrylate nanoparticles: preparation, pharmaceutical properties and tissue distribution in rats. *Letters in Drug Design & Discovery*, 3(4), 275-280.
- Zhang, X., Zhao, J., Gao, X., Pei, D., Gao, C. (2017). Anthelmintic drug alendazole arrests human gastric cancer cells at the mitotic phase and induces apoptosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(2), 595-603. doi: 10.3892/etm.2016.3992
- Zhou, F., Du, J., Wang, J. (2017). Alendazole inhibits HIF-1 $\alpha$ -dependent glycolysis and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*, 428, 171-178. doi: 10.1007/s11010-016-2927-3

# **Anexo 1.**

## **Constancias de presentación en congresos**



P-06257

**El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos  
México, A. C.**

**y la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez**

Otorgan la presente

**CONSTANCIA**

**a: M. en C. José Guadalupe Becerril Vega,  
Dra. Helgi Helene Jung Cook**



Por su participación como **PONENTES** del trabajo titulado:

**"Desarrollo de una nueva formulación parenteral de albendazol para tratamiento de cáncer de páncreas"**

en el **XXIX Congreso Nacional de Educación Químico Farmacéutica Biológica**  
y a la **XXV Reunión Nacional de Estudiantes de Farmacia**,  
realizado los días 12 al 15 de abril de 2021.

Ciudad de México, a 15 de abril de 2021

Dr. José Alberto López Díaz  
Jefe de Departamento de Ciencias Biológicas  
IBB, UACJ

DAR Juan José Díaz Esquivel  
Presidente Comisión de Educación  
del CNQFBA, A.C.

DESS Rodolfo Cruz Rodríguez  
Presidente Comisión de Reunión Nacional  
de Estudiantes de Farmacia del CNQFBA, A.C.

OFI Dayanira Chihua Ramirez  
Presidenta  
Colegio Nacional de Químicos  
Farmacéuticos Biólogos México, A.C.

CRC's = Créditos para el Retorno de la Certificación (0.6 Crc's por hora de capacitación), avalado por la Subcomisión de Educación Continua del COMECEP, Registro de Identidad DGP-SEP: SEP/DGP/CP09/17.

NOTA: Para ser válida en términos de certificación, esta constancia deberá estar impresa, contar con el sello del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. y cuando menos, una firma autógrafa.



**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



**INSTITUTO NACIONAL DE  
NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA**  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

*OTORGA EL PRESENTE*

**RECONOCIMIENTO**

**a: José Becerril-Vega, Alicia Hernández-Campos, Iliana González-  
Hernández, Lourdes Mayet-Cruz, Helgi Jung-Cook**

Por la **PRESENTACIÓN ORAL** del trabajo titulado:

**Desarrollo y evaluación farmacocinética de dos formulaciones parenterales de albendazol mediante el uso de un profármaco y cosolventes**

En el marco de la **XXXVII Reunión Anual de Investigación**  
celebrada del 5 al 7 de junio de 2023.

Dr. Ángel Antonio Arauz Góngora  
Director General

Dr. Benjamin Pineda Olvera  
Director de Investigación

**Anexo 2.**

**Artículo publicado generado del  
trabajo de investigación**



# Development and Pharmacokinetic Evaluation of Two Parenteral Formulations of Albendazole Using Prodrug and Cosolvent Approaches

José Becerril-Vega<sup>1</sup> · Alicia Hernández-Campos<sup>1</sup> · Iliana González-Hernández<sup>2</sup> · Miguel Flores-Ramos<sup>3</sup> · Rafael Castillo<sup>1</sup> · Gerardo Leyva-Gómez<sup>1</sup> · Lourdes Mayet-Cruz<sup>1</sup> · Helgi Jung-Cook<sup>1</sup>

Received: 14 April 2023 / Accepted: 28 June 2023 / Published online: 27 July 2023  
© The Author(s) 2023

## Abstract

Albendazole is a broad-spectrum anthelmintic drug used for parasitic infections. In addition, due to its mechanism of action, it has been studied as an anticancer agent. However, poor and highly variable bioavailability are limiting factors for its use in systemic illnesses. The present study aimed to develop two parenteral formulations of albendazole and to compare its pharmacokinetic profile with the conventional oral administration. Parenteral formulations were developed using two different approaches: a phosphonoxy-methylated prodrug and cosolvents. For the albendazole prodrug, once synthesized, its solubility and hydrolysis with alkaline phosphatase were evaluated. A factorial design of experiments was used for the cosolvent formulation. Stability and hemolytic activity were assessed. A pharmacokinetic study was performed on New Zealand rabbits. Both formulations were administered intravenously, and the prodrug was also administered intramuscularly. Results were compared with those obtained after the oral administration of albendazole. A 20,000-fold and 6000-fold increase in albendazole solubility was found with the prodrug and cosolvent formulations, respectively. Both parenteral formulations displayed higher albendazole plasma concentrations for the first 2 h compared with oral administration, even when the oral dose was doubled. The absolute bioavailability of oral albendazole was 15.5% while for the intramuscular administration of the prodrug was 102.6%. Both parenteral formulations showed a significant decrease in the formation of albendazole sulfoxide (ANOVA  $p < 0.05$ ) and allowed greater exposure to albendazole. Albendazole cosolvent parenteral formulation could be a promising option in systemic illnesses considering its ease of preparation and superb pharmacokinetic performance.

**Keywords** albendazole parenteral formulations · cosolvents · design of experiments · pharmacokinetics · phosphonooxymethylated prodrug

## Introduction

Albendazole (ABZ), a benzimidazole derivative approved in 1982 as an anthelmintic product, is the drug of choice for cystic hydatid disease as well as for the treatment of

parenchymal neurocysticercosis [1]. Its mechanism of action is related to its inhibitory effect on tubulin polymerization, which results in the selective degeneration of cytoplasmic microtubules and the death of the parasite [2].

Due to this effect, ABZ has also been evaluated for its potential against different types of cancer cells including liver [3, 4], stomach [5], colon [6], pancreas [7], ovarian [8], and leukemia [9]. A limiting factor in albendazole dosage regimes is its low solubility which leads to a great interindividual variability in plasma concentrations [2].

Although the oral administration is the most common for the convenience of the patients, the parenteral route represents a good option to attain the desired plasma concentrations. Few studies have described the development of ABZ parenteral formulations. In 2015, Noorani *et al.* assembled ABZ with bovine serum albumin into nanoparticles (nab) and reported a significant improvement in solubility and

✉ Helgi Jung-Cook  
helgi@unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, Mexico

<sup>3</sup> Escuela Nacional de Estudios Superiores, Unidad Mérida, Universidad Nacional Autónoma de México, Yucatán, Mexico

better efficacy than free ABZ in an ovarian cancer xenograft model [10]. Pillai K. *et al.* reported a new parenteral formulation, using sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin. Results showed that the solubility of ABZ in the complexed product was 8 mg/mL. Also, a potent cytotoxic *in vitro* and *in vivo* effect was found in an ovarian cancer cell line and in a *BALB/c* mice murine model with an ovarian tumor [11]. Recently, Viranov *et al.* evaluated the effect of different surfactants on ABZ solubility and found that the most promising candidate for parenteral application was a mixture of 60% of sodium dioctyl sulfosuccinate and 40% of the phospholipid sodium dipalmitoyl-phosphatidylglycerol. In this delivery system, a solubility of 4.4 mg/mL of ABZ was found [12].

Although the abovementioned strategies have improved ABZ bioavailability, most of them have some limitations. For instance, the size of the nab nanoparticles may limit the access of the drug into the tumor [10]. In the case of using surfactants, the need to use acidic conditions (pH=3) is a limitation because it might cause local irritation in parenteral administration [12].

Other alternatives to increase the drug solubility are the formation of prodrugs and the use of cosolvents. For example, Chassaing *et al.* developed phosphonoxy-methylated prodrugs of benzimidazoles. This study showed a 195,000-fold increase in the solubility of the fenbendazole prodrug. Also, higher plasma concentrations were obtained after the oral administration of the prodrug compared with the administration of an oral suspension [13].

In the case of cosolvents, when drugs are lipophilic or nonpolar and have low water solubility, they can be solubilized using aqueous solutions and water-miscible organic solvents (cosolvents). If this strategy does not allow to reach the adequate concentration of the drug, it is possible to use nonaqueous solutions composed of cosolvents [14]. The advantages of liquid cosolvent formulations include the following: no need for expensive technology for producing the dosage form, easy sterilization process, and facility in the administration process [15].

In the current study, we developed and evaluated two parenteral formulations of ABZ to improve its solubility and bioavailability. Techniques employed for the formulations were a phosphonoxy-methylated prodrug approach and the use of cosolvents.

## Materials and Methods

### Materials

Albendazole analytical standard, 1,4-dioxane, 4 M HCl in dioxane, cesium carbonate ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ), polyethylene glycol 400 (PEG 400), formic acid, and alkaline phosphatase EC 3.1.3.1 (type VII-S: from bovine intestinal mucosa) were purchased

from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The albendazole sulfoxide (ABZSO) analytical standard was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA). Dimethylformamide (DMF), dimethylacetamide (DMA), methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO), dichloromethane (DCM), ethyl ether, chloroform, ethanol (EtOH), acetonitrile, sodium bicarbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ), sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), sodium hydroxide (NaOH), ammonium dihydrogen phosphate ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), and sodium benzoate were purchased from J. T Baker (PA, USA). Isopropyl myristate, glycerin, castor oil, cremophor EL, propylene glycol (PG), and polyethylene glycol 600 (PEG 600) were kindly provided by Gattefossé (Saint-Priest Cedex, France). Di-*tert*-butyl (chloromethyl) phosphate was purchased from AccelaChemBio Co. (Pudong New Area, Shanghai).

Distilled or deionized water was obtained from the Elix 3 and Milli-Q water purification system (Millipore, Milford, MA, USA). Solvents used for chromatographic analysis were HPLC grade. All other reagents and solvents were of analytical grade.

### Preparation of Phosphonoxy-methylated ABZ Prodrug

The ABZ prodrug was prepared according to the synthetic sequence shown in Fig. 1. The synthesis was based on the methodologies previously reported by Chassaing *et al.* [13] and Flores *et al.* [16].

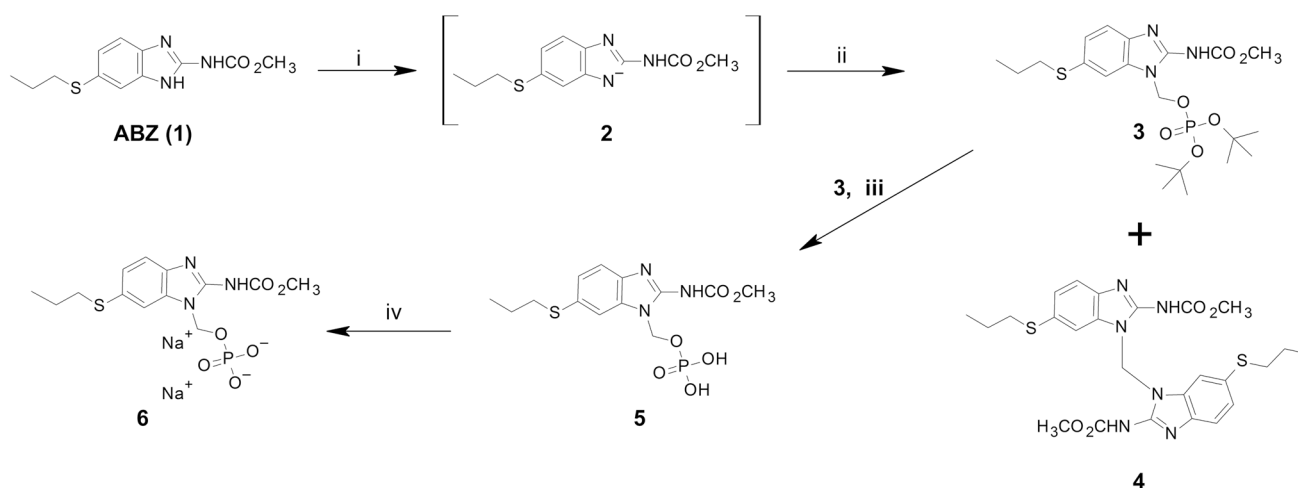
### Preparation of Methyl (1-(((di-*tert*-butoxyphosphoryl)oxy)methyl)-6-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate (3) from ABZ (1)

An ABZ (1) suspension in 25 mL of anhydrous DMF (1.0062 g, 3.77 mmol) was prepared, and  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (1.8700 g, 5.74 mmol) was added and stirred for 3 h at room temperature. Di-*tert*-butyl(chloromethyl) phosphate (1.464 g, 5.66 mmol) was dissolved in anhydrous DMF in an ice bath; then the ABZ mixture previously prepared was added dropwise while stirring and maintained at 0°C for 1 h. The reaction was stirred at room temperature for 6 h. DCM (400 mL) was added, and the reaction mixture was washed with 2%  $\text{NaHCO}_3$  ( $3 \times 300$  mL). A final washing was performed using water (300 mL). The organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and volatiles were evaporated. The residue (containing compound 3) was used without purification in the following step.

### Preparation of Methyl (1-((phosphonoxy)methyl)-6-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate (5)

The residue (containing compound 3) dissolved in 1,4-dioxane (10 mL) was cooled in an ice bath and treated with a 4 M solution of HCl in 1,4-dioxane (15 mL) by adding it





**Fig. 1** Preparation of phosphonooxymethylated prodrug of ABZ. Reagents and conditions: (i) NaH or Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF, rt, 3 h; (ii) Di-*tert*-butyl(chloromethyl) phosphate, DMF, 0°C, 1 h, then, 6 h at rt; (iii) HCl 4 M in dioxane, rt, 2 h; (iv) NaOH, MeOH/H<sub>2</sub>O, rt

dropwise. The mixture was stirred for 2 h at room temperature; then the solvent was eliminated under vacuum to afford compound (5).

#### Preparation of Sodium (2-((methoxycarbonyl)amino)-6-(propylthio)-1H-benzimidazol-1-yl)methyl phosphate (6)

The crude compound (5) was dissolved in MeOH (7 mL). Then, a solution of NaOH in MeOH:water (6:3) was added dropwise to reach pH 7 while stirring. Volatile solvents were removed on a rotary evaporator, and the solid residue was suspended in anhydrous EtOH with stirring for 3 h. The solid (6) was filtered, re-suspended, and maintained at stirring for 24 h in DCM to remove residual ABZ and other non-polar compounds. The solid obtained was placed in MeOH under continuous stirring for 24 h to dissolve the prodrug. The solvent was evaporated under a vacuum, and the solid recovered was dried in a vacuum for 72 h. The compound was characterized by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, <sup>31</sup>P NMR, and MS data. The residual content of solvents (DCM and dioxane) was determined by quantitative <sup>1</sup>H NMR using chloroacetic acid as an internal standard.

#### Solubility of the Prodrug

Solubility was evaluated in buffer solutions at pH 6.0, 7.4, and 8.0 using the shake flask method. Briefly, an excess amount of the compound was added to each solution within a water bath maintained at 25 ± 1°C. The tubes were kept on an oscillatory shaker at 150 rpm for 48 h. Then, they were filtered and diluted with water. Concentrations were determined by HPLC (Shimadzu LC-10ATvp) using a Spherisorb

ODS1 (5µm, 250 × 4.6 mm) column. The mobile phase was 1% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:methanol:acetonitrile (30:50:20 v/v) at a flow rate of 1 mL/min and a UV detector at 245 nm. Samples were prepared in triplicates.

#### Hydrolysis of the Prodrug

One milligram of prodrug was dissolved in 1.2 mL of Tris/HCl buffer pH 8.5 and placed in a water bath at 37°C. After 10 min, 50 µL (88 units) of alkaline phosphatase was added. Samples were withdrawn at 10, 20, and 30 s and 1, 3, 5, 10, and 90 min and mixed with 900 µL of acetonitrile to stop the enzymatic activity. Samples were centrifuged for 10 min at 14,000 rpm. The supernatant was analyzed for ABZ formation by HPLC.

#### Development of a Formulation Using Cosolvent Approach

Solubility of ABZ in isopropyl myristate, glycerin, castor oil, cremophor EL, PG, ethanol, PEG 600, PEG 400, DMSO, and DMA was evaluated using the shake flask method. For the assay of ABZ, samples were diluted with the mobile phase, and 30 µL was injected into the chromatographic system (Shimadzu LC-10ATvp), using an Hypersil ODS column (5µm, 150 × 4.6 mm), a mobile phase consisting of 1.25% NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:methanol:acetonitrile (30:50:20 v/v), a flow rate of 1.2 mL/min, and a UV detector at 295 nm. The method was linear in the range of 3.0–25.0 µg/mL.

According to ABZ solubility, the solvents selected were DMA, PEG 400, and EtOH. To choose the proportion of each solvent, a 3<sup>2</sup> factorial design of experiments (DOE) was used. DOE was carried out using Statgraphics Centurion XVI version 16.1.18. The response variable was ABZ

solubility. The formulation with the highest ABZ concentration was named F1.

To reduce hemolytic potential, different proportions of EtOH (60, 70, and 80% v/v) and 6% sodium benzoate were used. The formulation with the highest ABZ concentration was named F2.

### Physical and Chemical Stability

Formulations F1 and F2 were prepared at an ABZ concentration of 5 mg/mL. Formulations were stored at room temperature and refrigerated at 4°C. Samples were analyzed after they were prepared, and at 6 and 12 months for drug content, pH, and physical appearance.

### Hemolysis Assay

Hemolysis of both formulations was determined in fresh rabbit blood. Negative and positive controls were 0.9% saline solution and 1% Triton X100, respectively. Briefly, blood was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. Blood cells were separated and washed with 0.9% saline solution. Cells were suspended in saline solution, an aliquot of 0.9 mL was placed in a water bath at 37°C, and 0.1 mL of ABZ formulations or control solutions was added, vortexed for 5 s, and maintained at 37°C for 2 min. Samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min. A 0.3 mL aliquot of the supernatant was mixed with 5.7 mL of saline solution, and absorbance was measured at 540 nm. The percentage of hemolysis was calculated as:

$$\% \text{hemolysis} = \frac{\text{Abs test} - \text{Abs negative control}}{\text{Abs positive control} - \text{Abs negative control}} \times 100$$

### Pharmacokinetic Study

Animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CICUAL) of the Chemistry Faculty, UNAM. Protocol was approved on August 16, 2021, with the official number FQ/CICUAL/435/21. All experiments were conducted according to Mexican Guidance (NOM-062-ZOO-1999).

A pharmacokinetic study was performed in twelve male white New Zealand rabbits (2.5–3.5 kg). The animals were individually housed with access to food and water *ad libitum*. Rabbits were randomly assigned to two different groups. Group A received an oral dose of 0.8 mL of Zentel® suspension (40 mg ABZ/mL) while group B received 1 mL of the aqueous solution of the prodrug intramuscularly at a concentration equivalent to 15.88 mg/mL of ABZ. After a washout period of 15 days, group A received 3 mL of formulation F2 intravenously (5 mg/mL) in the marginal

ear vein, and group B received 1 mL of the prodrug intravenously at a concentration equivalent to 15.88 mg/mL of ABZ. Immediately prior to administration, both parenteral formulations were filtered through 0.22- $\mu$ m nylon filters.

Blood samples were taken from the marginal ear vein prior to dosing (0 h) and at 20 and 40 min and 1, 1.5, 2, 3.5, 5, 8, 12, and 24 h post administration. In the parenteral administration, a sampling time of 10 min was added. Samples were collected on EDTA K<sub>2</sub> tubes and centrifuged. Plasma samples were stored at –20°C until analysis.

### Albendazole and Albendazole Sulfoxide Assay

For the assay of ABZ and ABZSO, a liquid chromatographic method coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed and validated using a Shimadzu Prominence chromatograph (Shimadzu, Japan) coupled to a turbo ion spray ionization-triple quadrupole mass spectrometer, API 4500 (ABSciex, Darmstadt, Germany), with positive ion electrospray ionization using multiple reaction monitoring (MRM) mode to detect and quantify ABZ and ABZSO with mass-to-charge (*m/z*) transitions at 266.3 → 234.0 and 282.0 → 240.0, respectively.

Briefly, plasma samples (200  $\mu$ L) were spiked with 10  $\mu$ L of internal standard (carbamazepine, 2000 ng/mL). After vortex mixing, 3 mL of ether:dichloromethane:chloroform (60:30:10 v/v) was added. Samples were mixed and centrifuged at 3500 rpm for 10 min at 4°C. The organic phase was evaporated to dryness with a nitrogen stream. The residue was reconstituted with 200  $\mu$ L of mobile phase, and 1  $\mu$ L was injected into the chromatographic system, using a Sepax HP-C18 (5 $\mu$ m, 150 × 4.5 mm) column and an HP-C18 (5 $\mu$ m, 10 × 4 mm) precolumn. The mobile phase was methanol:0.1% formic acid (70:30, v/v) at a flow rate of 0.7 mL/min.

### Pharmacokinetic Analysis

Pharmacokinetic parameters of ABZ and ABZSO were estimated using Phoenix® WinNonlin® Version 8.3.3.33 (Pharsight, Mountain View, CA, USA). To compare the relative formation of ABZSO, the individual ABZSO/ABZ AUC<sub>0–∞</sub> ratio for each administration was calculated, and the mean ratios were compared. Also, the absolute bioavailability was determined for both extravascular administrations.

### Statistical Analysis

ANOVA statistical comparisons were performed using Statgraphics Centurion XVI version 16.1.18 followed by a Tukey test.

## Results

### Preparation of Phosphonooxymethylated Prodrug of ABZ

The prodrug was obtained through an alkylation of ABZ employing di-tert-butyl(chloromethyl) phosphate in DMF. A strong base was used to create the nucleophile (2) (Fig. 1). In the first instance, we proposed sodium hydride as the strong base; however, it promoted the formation of a methylene-bis-albendazole (4), which was the most abundant secondary product [13]. This compound (4) was isolated and characterized by <sup>1</sup>H NMR. A characteristic signal was obtained around 6.5 ppm, which was attributed to methylene binding albendazole molecules in the dimer.

To avoid the formation of compound (4), we decided to look for a weaker inorganic base in the same solvent. Cesium carbonate was selected because it has been used in similar reactions with an adequate performance [17]. When this reactive was used, the quantity of dimer was decreased; nevertheless, ABZ maintained a low reactivity. To achieve better yields, several reaction conditions including temperature, the quantity of electrophilic reagent, and the use of a Finkelstein activator as KI were tested [17]. The best results were obtained with the conditions mentioned in the methodology section.

A column purification of compound (3) was attempted, but ABZ appeared in all fractions. The only way to separate it was to use an acid-mobile phase; however, this led to the formation of compound (5), which was strongly retained on the column. Therefore, we decided to continue with the other reactions without purification.

Once compound (3) was obtained; an acid-promoted deprotection allowed us to obtain prodrug (5). Finally, the conversion of the free acid to the corresponding disodium salt was achieved with NaOH in methanol. These last two reactions were quick and did not require further optimization. However, the purification of the final product was complicated because most of the impurities were soluble in the same solvents as the compound (6). It is important to note that the prodrug was obtained as a mixture of their N1 and N3 regioisomers; however, this fact is irrelevant since both are enzymatically hydrolyzed to give ABZ. The global yield was 11%. Spectroscopical characterization of ABZ prodrug is included in the Supplementary material.

**Table I** Solubility of the Prodrug at Different pH Solutions

Buffer	Solubility (mg/mL)	Solubility (mM)
pH 6.0	27.3	64.8
pH 7.4	27.0	64.2
pH 8.0	29.6	70.4

Mass (Figure S1) and NMR spectra (Figures S2–S4) showed results for compound (5), since compound (6) when dissolved in water produces compound (5). Analysis of residual solvents using <sup>1</sup>H NMR spectra showed that dichloromethane was not detected. In the case of dioxane, the concentration was 224 ppm, which is lower than the ICH guidance specification (< 380 ppm) [18].

### Prodrug Solubility

As shown in Table I, the prodrug solubility was independent of pH in the range evaluated. A 20,000-fold increase in solubility was found, when compared to the reported ABZ solubility in water of 0.8 mg/L ( $3 \times 10^{-3}$  mM) [19].

### Hydrolysis of the Prodrug

ABZ was rapidly hydrolyzed in an alkaline phosphatase solution with a first-order half-life of  $8.72 \pm 0.23$  min. Since the hydrolysis of both regioisomers resulted in the same active compound, the pharmacokinetic study was performed with a mixture of them.

### Development of a Formulation Using Cosolvent Approach

Table II shows the ABZ solubility in the different cosolvents evaluated. Based on these results and considering the toxicity and hemolytic potential reported, the cosolvents selected were DMA, PEG 400, and EtOH. Table III shows the characteristics of the DOE. Different DMA and PEG 400 proportions were evaluated while the EtOH proportion was fixed at 25% v/v. Figure 2 shows the response surface plot of DOE. It was found that the highest ABZ solubility

**Table II** Solubility of ABZ in Different Solvents at 25°C

Solvent	Concentration (µg/mL)		Enhancement factor
	Mean	CV (%)	
Water	0.815		
Isopropyl myristate	8.511	4.4	10
Glycerine	27.946	14.3	34
Castor oil	39.667	17.2	49
Cremophor EL	88.327	46.1	108
PG	529.995	3.5	650
EtOH	655.956	6.5	805
PEG 600	1519.390	7.8	1864
PEG 400	1582.617	6.2	1942
DMSO	21,593.558	28.1	26,495
DMA	24,059.716	10.3	29,521

**Table III** DOE Factors and Levels Studied

Factor	Low (-1)	Medium (0)	High (1)
DMA	15% v/v	22.5% v/v	30% v/v
PEG 400	30% w/v	40% w/v	50% w/v

was reached with the high level of both solvents. From these results, the formulation named F1, composed of 30% v/v DMA, 50% w/v PEG 400, and 25% v/v of EtOH was selected. The concentrations used complied with the FDA requirements for intravenous formulations [20].

When the different proportions of EtOH and sodium benzoate were evaluated, it was found that the highest solubility was achieved using 30% v/v DMA, 50% w/v PEG 400, and 25% v/v of sodium benzoate 6% in ethanol 70% v/v, and therefore, this formulation, named F2, was selected. Formulations, F1 and F2, were prepared at an ABZ concentration of 5 mg/mL for further studies.

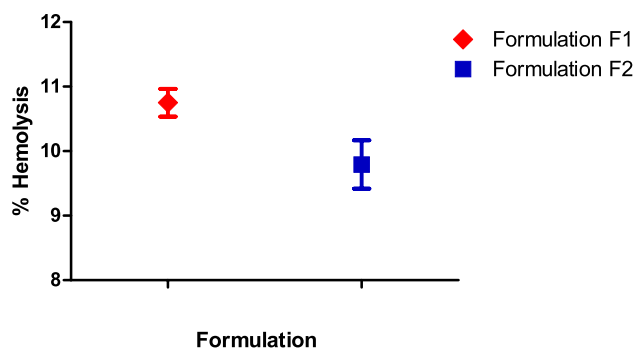
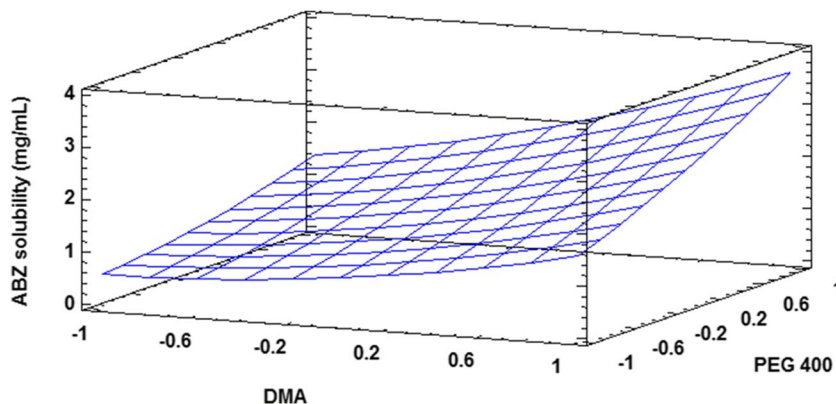
### Physical and Chemical Stability

Both formulations were colorless and transparent at the time of preparation. At room temperature, both formulations maintained their appearance, and no precipitation was observed even after 12 months of storage. Besides, drug content remained between 90 and 110%, which is the limit to be considered stable [21]. The pH was maintained throughout the time interval at a value of approximately 5. On the other hand, under refrigeration conditions, a white precipitate was formed at the end of the sixth month in both formulations, and the evaluation was not continued.

### Hemolysis

Figure 3 shows the mean percentage of hemolysis for formulations F1 and F2. The hemolysis was lower than 12%, and therefore, formulations were considered

**Fig. 2** Response surface plot of DOE. Evaluated levels for DMA were 15% v/v (low, -1), 22.5% v/v (medium, 0), and 30% v/v (high, 1) and for PEG 400 were 30% w/v (low, -1), 40% w/v (medium, 0), and 50% w/v (high, 1)



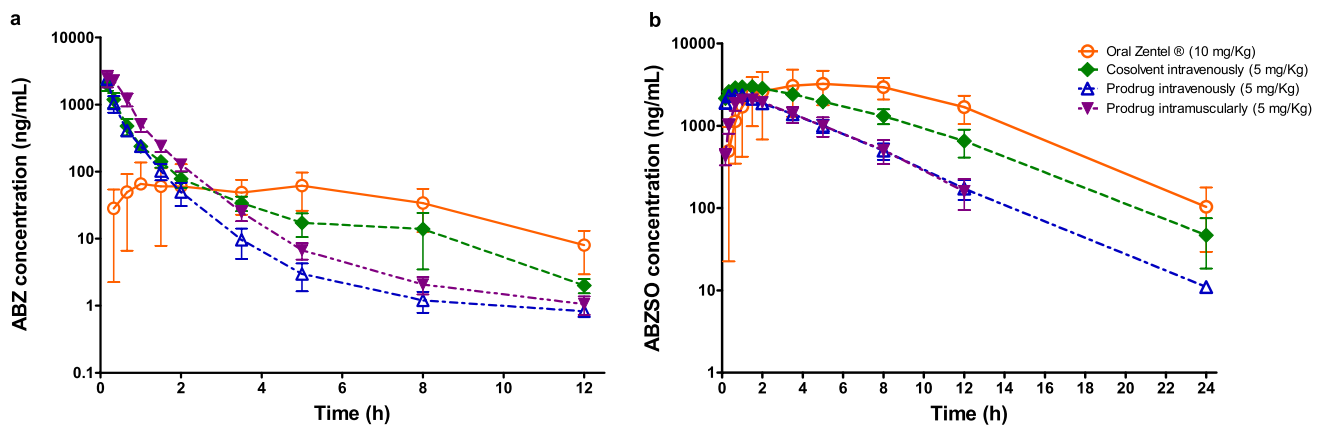
**Fig. 3** Hemolytic potential of the cosolvent formulations. The results are expressed as the mean  $\pm$  SD,  $n=3$

non-hemolytic [22]. Considering that formulation F2 presented the lowest percentage of hemolysis, it was selected for the *in vivo* study.

### Pharmacokinetic Evaluation

**Analytical Assay for ABZ and ABZSO** The method was linear using a weight factor of  $1/x$ . The calibration curves were linear in the range of 0.5–1000.0 ng/mL for ABZ and from 10.0 to 1500.0 ng/mL for ABZSO. The method was precise with intra-day coefficients of variation in the range of 2.4–8.0% for ABZ and 1.4–5.3% for ABZSO, while the inter-day assay precision was between 11.5 and 14.6% for ABZ and 2.6% and 4.7% for ABZSO. Accuracy was also demonstrated with deviation from the nominal concentration ranging from 0.3 to 6.2% for ABZ and 1.7 to 9.9% for ABZSO. Precision and accuracy were maintained after sample dilution ratios of 1:2 and 1:5.

**Pharmacokinetic Study** The mean pharmacokinetic profiles of ABZ and ABZSO after different routes of administration are shown in Fig. 4. ABZ concentrations were quantifiable up to 12 h after the dose, while ABZSO concentrations were quantifiable up to 24 h. It is important to consider that the



**Fig. 4** Plasma concentration-time curves (mean  $\pm$  SD) of a ABZ ( $n=6$ ) and b ABZSO ( $n=6$ ) after single-dose administration in rabbits of Oral Zentel® (10 mg/kg), cosolvent intravenously (5 mg/kg), prodrug intravenously (5 mg/kg) and prodrug intramuscularly (5 mg/kg)

oral dose of ABZ was twice the dose used in the other routes of administration.

The pharmacokinetic parameters of ABZ and ABZSO are presented in Tables IV and V, respectively. There were no statistically significant differences in  $t_{1/2}$  of elimination ( $p > 0.05$ ) of both analytes regardless of the route of administration. Similarly, no significant differences were found in  $V_z$  and  $Cl$  of ABZ after the intravenous administration of cosolvent and prodrug formulations.

After  $C_{max}$  and  $AUC_{last}$  dose normalization, it was found that there was a significant difference ( $p < 0.01$ ) between the parenteral and oral routes (Table IV), being greater the exposure of ABZ in the parenteral routes.

For oral administration, the absolute bioavailability of ABZ was 15.5%. For the prodrug, the absolute bioavailability after intramuscular administration was 102.6% with respect to intravenous administration of the same prodrug.

## Discussion

Different parenteral albendazole formulations were developed using two different approaches to improve its solubility. The first technique consisted of the synthesis of a phosphonoxy-methylated prodrug of ABZ. This methodology has already been used for other benzimidazoles [13, 23], and even fosphenytoin, a prodrug of phenytoin, has been approved by FDA and is available for parenteral administration [24].

Despite the low yield obtained during the synthesis, the prodrug possesses characteristics that make it a good candidate for a parenteral formulation. First of all, we found an improvement of 20,000-fold in ABZ solubility. In addition, the prodrug was able to rapidly release ABZ using alkaline phosphatase.

The other technique that was selected to improve ABZ solubility was the use of cosolvents. Due to the low solubility of ABZ, a combination of non-aqueous solvents was

**Table IV** Plasma Pharmacokinetic Parameters of Albendazole in Rabbits ( $n=6$ )<sup>a</sup>

Formulation (route) dose	Cosolvents (IV) 5 mg/kg	Zentel® (oral) 10 mg/kg	Prodrug (IV) 5 mg/kg	Prodrug (IM) 5 mg/kg
$K_e$ ( $h^{-1}$ )	$0.345 \pm 0.061$	$0.316 \pm 0.096$	$0.667 \pm 0.339$	$0.448 \pm 0.211$
$t_{1/2}$ (h)	$2.06 \pm 0.31$	$2.34 \pm 0.60$	$1.51 \pm 1.12$	$1.88 \pm 0.92$
$T_{max}$ (h)	---	4.25 (0.67–5.00)	---	0.42 (0.17–0.75)
$C_{max}$ (ng/mL)/ $C_0$ (for i.v.)	$3892.31 \pm 1672.33$	$91.33 \pm 62.12$	$5607.52 \pm 2805.15$	$2257.33 \pm 574.06$
$C_{max}/dose$ (ng/mL/mg)	$259.49 \pm 111.49$	$2.85 \pm 1.94^{**}$	$353.12 \pm 176.65$	$150.49 \pm 38.27$
$AUC_{last}$ (ng*h/mL)	$1750.88 \pm 433.13$	$522.11 \pm 295.97$	$1926.06 \pm 579.53$	$1897.89 \pm 303.70$
$AUC_{last}/dose$ (ng*h/mL/mg)	$116.73 \pm 28.88$	$16.32 \pm 9.25^{**}$	$128.40 \pm 38.64$	$126.53 \pm 20.25$
$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	$1755.20 \pm 434.64$	$541.69 \pm 291.62$	$1928.14 \pm 579.40$	$1900.66 \pm 303.60$
$V_z$ (mL)	$30,906.22 \pm 21,903.06$	---	$23,807.28 \pm 18,528.73$	---
$Cl$ (mL/h)	$9049.15 \pm 2459.85$	---	$8328.39 \pm 2231.75$	---
$F$ (%)	---	$15.5 \pm 9.7$	---	$102.6 \pm 20.9$

<sup>a</sup>Values are mean  $\pm$  SD, except for  $T_{max}$  where median (range) is reported.  $^{**}p < 0.01$  in Tukey vs all other treatments.  $K_e$ , elimination rate constant;  $t_{1/2}$ , terminal elimination half-life;  $C_{max}$ , maximum plasma concentration;  $T_{max}$ , time to  $C_{max}$ ;  $C_0$ , estimated initial drug concentration;  $AUC_{last}$ , area under the curve from 0 h to the time of the last quantifiable plasma concentration;  $AUC_{0-\infty}$ , AUC from 0 to infinity time;  $V_z$ , distribution volume;  $Cl$ , clearance;  $F$ , absolute bioavailability

**Table V** Plasma Pharmacokinetics Parameters of Albendazole Sulfoxide in Rabbits ( $n=6$ )<sup>a</sup>

Formulation (route) <i>dose</i>	Cosolvents (IV) 5 mg/kg	Zentel® (oral) 10 mg/kg	Prodrug (IV) 5 mg/kg	Prodrug (IM) 5 mg/kg
$K_e$ ( $h^{-1}$ )	0.227 ± 0.048	0.235 ± 0.056	0.261 ± 0.016	0.269 ± 0.037
$t_{1/2}$ (h)	3.17 ± 0.57	3.08 ± 0.63	2.66 ± 0.16	2.61 ± 0.31
$T_{max}$ (h)	1.53 (0.66–1.58)	5.00 (3.57–8.15)	0.87 (0.73–1.25)	1.48 (1.15–2.00)
$C_{max}$ (ng/mL)	3050.47 ± 205.34	3641.68 ± 1491.04	2412.08 ± 222.55	2130.37 ± 174.99
$AUC_{last}$ (ng*h/mL)	25,781.02 ± 4262.08	41,345.41 ± 14,188.88	12,252.11 ± 1610.02	11,205.75 ± 2075.62
$AUC_{0-\infty}$ (ng*h/mL)	26,014.72 ± 4373.40	41,857.83 ± 14,271.74	12,759.72 ± 1593.98	11,831.05 ± 2354.29
ABZSO/ABZ $AUC_{0-\infty}$ ratio	15.63 ± 4.38	89.80 ± 37.26**	7.03 ± 1.95	6.46 ± 2.03

<sup>a</sup>Values are mean ± SD, except for  $T_{max}$  where median (range) is reported. \*\* $p < 0.05$  in Tukey vs all other treatments.  $K_e$ , elimination rate constant;  $t_{1/2}$ , terminal elimination half-life;  $C_{max}$ , maximum plasma concentration;  $T_{max}$ , time to  $C_{max}$ ;  $AUC_{last}$ , area under the curve from 0 h to the time of the last quantifiable plasma concentration;  $AUC_{0-\infty}$ , AUC from 0 to infinity time

selected for the cosolvent formulation. This strategy has been used for other low-solubility drugs [14].

Formulations F1 and F2 resulted in a significant 6000-fold increase in ABZ solubility. In addition, both formulations were stable for 12 months at room temperature, and the hemolytic potential was lower than the proposed maximum value of 20% [22].

Pharmacokinetic parameters obtained by the oral administration, which is the only route of administration currently available, showed that  $t_{1/2}$  and  $t_{max}$  of ABZSO were similar to those reported in other studies in rabbits [25, 26]. Different studies have reported the difficulty to quantify ABZ concentrations due to its high and rapid metabolism after the oral route [27–29]. To our knowledge, this is the first study that reports ABZ pharmacokinetic parameters, including absolute bioavailability, in a rabbit model after oral administration. Results showed that the half-life of ABZ is relatively shorter than that of ABZSO. In addition, a higher variability in plasma concentrations of ABZ and ABZSO was found after oral administration than in parenteral routes. Furthermore, the  $C_{max}$  after the oral route was found to be much lower than concentrations after parenteral administrations despite the fact that double the dose was administered, which is consistent with the expected low bioavailability.

By comparing the pharmacokinetics of the intravenous cosolvent formulation vs. the oral suspension, a similar elimination half-life in both routes was found. The pharmacokinetic profile of ABZ (Fig. 4) showed that the intravenous administration maintained a much higher concentration of ABZ than the oral route at least for the first 2 h even when the dose was half the dose of the oral administration.

When the formulations (prodrug and cosolvent) administered by intravenous route were compared, there were no significant differences in any of the pharmacokinetic parameters neither for ABZ nor for ABZSO, demonstrating that *in vivo*, ABZ was rapidly released from the phosphonoxyethylated prodrug corroborating the *in vitro* results.

With respect to the prodrug administration by intravenous and intramuscular routes, no changes in pharmacokinetic

performance were found. This indicates a very rapid disposition of ABZ from the prodrug. Furthermore, a complete bioavailability of ABZ was obtained ( $F=102.6\%$ ). Due to these observations, the intramuscular route could be considered the route of choice for ABZ prodrug administration considering that it is safer than intravenous administration.

ABZ has been proposed for cancer treatment, and some studies have shown that it has a greater activity than its metabolites [30, 31]. Considering this information, the relative formation of metabolite after each administration route was compared using the ABZSO/ABZ  $AUC_{0-\infty}$  ratio. The results in Table V indicate that the mean ABZSO/ABZ  $AUC_{0-\infty}$  ratio was similar for parenteral administrations. However, a statistical difference was found with the oral route, with higher metabolite formation in the latter.

The lower formation of ABZSO in the parenteral route results in a higher proportion of ABZ, which added to its more lipophilic character [30], and the fact that it is not a substrate of Bcrp1 and P-gp [32] allows the drug to reach its site of action and to penetrate the target cells more easily. The results are promising for the further evaluation of its efficacy in *in vivo* cancer models.

## Conclusion

In the present study, two parenteral formulations of ABZ were developed using prodrug and cosolvent approaches. Both formulations showed a significant improvement in ABZ plasma exposure compared to oral administration. In addition, the parenteral route exhibited a significant decrease in the formation of the ABZSO.

Considering that there were no significant differences in the pharmacokinetic parameters of the parenteral formulations, either of them would be a good choice for the treatment of systemic diseases. However, the cosolvent formulation has the advantage that it does not need expensive technology,

which would make it more affordable and thus accessible for the patients in need of such treatment. Taking this into account, this formulation could be suitable for ABZ parenteral administration. More studies should be performed in order to determine the safety and efficacy of the formulation.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1208/s12249-023-02613-9>.

**Acknowledgements** We greatly appreciate the support provided by Nayeli Balbiux at USAII UNAM to characterize the prodrug. We are also grateful to Marisol Rivera Huerta and Lucia Macías Rosales for their support in the handling and care of the laboratory animals.

**Author Contribution** JBV and HJC conceived/designed the study. JBV, AHC, MFR, and RC contributed to the design and the synthesis of the prodrug. JBV carried out the experiments and data collection. JBV and GLG design the cosolvent formulation. JBV, IGH, and HJC carried out the analysis and interpretation of data. JBV, IGH, LMC, and HJC drafted the manuscript. All authors revised the manuscript critically for intellectual content and approved the final version of the manuscript.

**Funding** This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT [IN206122]. Student grant (589367) was provided to José Becerril-Vega by CONACYT during the study.

**Data Availability** The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information files. Should any raw data files be needed in another format, they are available from the corresponding author upon reasonable request.

## Declarations

**Ethical Approval** Animal experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CICUAL) of the Chemistry Faculty, UNAM. Protocol was approved on August 16, 2021, with the official number FQ/CICUAL/435/21. All experiments were conducted according to Mexican Guidance (NOM-062-ZOO-1999).

**Conflict of Interest** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Schulz JD, Neodo A, Coulibaly JT, Keiser J. Pharmacokinetics of albendazole, albendazole sulfoxide, and albendazole sulfone determined from plasma, blood, dried-blood spots, and mitra samples of hookworm-infected adolescents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(4) <https://doi.org/10.1128/AAC.02489-18>.
- Jung-Cook H. Pharmacokinetic variability of anthelmintics: implications for the treatment of neurocysticercosis. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2012;5:21-30. <https://doi.org/10.1586/ecp.11.72>.
- Rolin S, Souhaili-el Amri H, Batt AM, Levy M, Bagrel D, Siest G. Study of the in vitro bioactivation of albendazole in human liver microsomes and hepatoma cell lines. *Cell Biol Toxicol.* 1989;5:1-14. <https://doi.org/10.1007/BF00141060>.
- Pourgholami MH, Woon L, Almajd R, Akhter J, Bowery P, Morris DL. In vitro and in vivo suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. *Cancer Lett.* 2001;165:43-9. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(01\)00382-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00382-2).
- Zhang X, Zhao J, Gao X, Pei D, Gao C. Anthelmintic drug albendazole arrests human gastric cancer cells at the mitotic phase and induces apoptosis. *Exp Ther Med.* 2017;13:595-603. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3992>.
- Pourgholami MH, Akhter J, Wang L, Lu Y, Morris DL. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2005;55:425-32. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0927-6>.
- Chen H, Weng Z, Xu C. Albendazole suppresses cell proliferation and migration and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Drugs.* 2020;31:431-9. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000914>.
- Pourgholami MH, Wangoo KT, Morris DL. Albendazole-cyclodextrin complex: enhanced cytotoxicity in ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 2008;28:2775-9.
- Khalilzadeh A, Wangoo KT, Morris DL, Pourgholami MH. Epothilone-paclitaxel resistant leukemic cells CEM/dEpoB300 are sensitive to albendazole: Involvement of apoptotic pathways. *Biochem Pharmacol.* 2007;74:407-14. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.05.006>.
- Noorani L, Stenzel M, Liang R, Pourgholami MH, Morris DL. Albumin nanoparticles increase the anticancer efficacy of albendazole in ovarian cancer xenograft model. *J Nanobiotechnology.* 2015;13. <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0082-8>.
- Pillai K, Akhter J, Morris DL. Super aqueous solubility of albendazole in  $\beta$ -cyclodextrin for parenteral application in cancer therapy. *J Cancer.* 2017;8:913-23. <https://doi.org/10.7150/jca.17301>.
- Vinarov Z, Gancheva G, Katev V, Tcholakova SS. Albendazole solution formulation via vesicle-to-micelle transition of phospholipid-surfactant aggregates. *Drug Dev Ind Pharm.* 2018;44:1130-8. <https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1438461>.
- Chassaing C, Berger M, Heckerroth A, Ilg T, Jaeger M, Kern C, et al. Highly water-soluble prodrugs of anthelmintic benzimidazole carbamates: synthesis, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *J Med Chem.* 2008;51:1111-4. <https://doi.org/10.1021/jm701456r>.
- Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* 2004;21:201-30. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016235.32639.23>.
- Yeh MK, Chang LC, Chiou AH. Improving tenoxicam solubility and bioavailability by cosolvent system. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10:166-71. <https://doi.org/10.1208/s12249-009-9189-2>.
- Flores-Ramos M, Ibarra-Velarde F, Hernández-Campos A, Vera-Montenegro Y, Jung-Cook H, Cantó-Alarcón GJ, et al. A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24:5814-7. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.017>.
- Leahy DK, Pack SK. Preparation of phosphonoxyethyl prodrugs of HIV-1 attachment inhibitors. *Org Process Res Dev.* 2013;17:1440-44. <https://doi.org/10.1021/op400225>.
- Impurities: Guideline for Residual Solvents Q3C(R8). International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use. 2021. [https://database.ich.org/sites/default/files/ICH\\_Q3C-R8\\_Guideline\\_Step4\\_2021\\_0422\\_1.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q3C-R8_Guideline_Step4_2021_0422_1.pdf) Accessed 25 May 2023.

19. Chistyachenko YS, Khvostov MV, Belousov AI, Zhukova NA, Pakharukova MY, Katokhin AV, et al. Physicochemical properties and anti-opisthorchosis effect of mechanochemically synthesized supramolecular complexes of albendazole with the polysaccharide arabinogalactan from *Larix sibirica* and *Larix gmelinii*. *Dokl Biol Sci.* 2014;456:212–4. <https://doi.org/10.1134/S0012496614030156>.
20. Inactive ingredient search for approved drug products. U.S. Food and Drug Administration. 2023. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/> Accessed 15 Mar 2023.
21. Guidance for industry: drug stability guidelines. U.S. Food and Drug Administration. 2008. <https://www.fda.gov/media/69957/download> Accessed 30 Nov 2022.
22. Amin K, Dannenfelser RM. In vitro hemolysis: guidance for the pharmaceutical scientist. *J Pharm Sci.* 2006;95:1173–6. <https://doi.org/10.1002/jps.20627>.
23. Zimmermann SC, Tichý T, Vávra J, Dash RP, Slusher CE, Gadiano AJ, et al. N-substituted prodrugs of mebendazole provide improved aqueous solubility and oral bioavailability in mice and dogs. *J Med Chem.* 2018;61:3918–29. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01792>.
24. Aleyadeh R, Carson RP. Fosphenytoin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560745/>. Accessed 26 March 2023.
25. Kohri N, Yamayoshi Y, Xin H, Iseki K, Sato N, Todo S, et al. Improving the oral bioavailability of albendazole in rabbits by the solid dispersion technique. *J Pharm Pharmacol.* 1999;51:159–64. <https://doi.org/10.1211/0022357991772277>.
26. Li T, Qiao GL, Hu GZ, Meng FD, Qiu YS, Zhang XY, et al. Comparative plasma and tissue pharmacokinetics and drug residue profiles of different chemotherapeutants in fowls and rabbits. *J Vet Pharmacol Ther.* 1995;18:260–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1995.tb00590.x>.
27. Alvarez LI, Sánchez SF, Lanusse CE. In vivo and ex vivo uptake of albendazole and its sulphoxide metabolite by cestode parasites: relationship with their kinetic behaviour in sheep. *J Vet Pharmacol Ther.* 1999;22:77–86. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1999.00194.x>.
28. Evrard B, Chiap P, DeTullio P, Ghalmi F, Piel G, Van Hees T, et al. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J Control Release.* 2002;85:45–50. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00270-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00270-5).
29. Dayan AD. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Trop.* 2003;86:141–59. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(03)00031-7).
30. Cai ZY, Galettis P, Lu Y, Morris DL, Pourgholami MH. Pharmacokinetics of albendazole in New Zealand white rabbits: oral versus intraperitoneal administration. *Anticancer Res.* 2007;27:417–22.
31. Králová V, Hanušová V, Staňková P, Knoppová K, Čáňová K, Skálová L. Antiproliferative effect of benzimidazole anthelmintics albendazole, ricobendazole, and flubendazole in intestinal cancer cell lines. *Anticancer Drugs.* 2013;24:911–19. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e3283648c69>.
32. Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, Pulido MM, Molina AJ, Alvarez AI, et al. Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metab Dispos.* 2005;33:614–18. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.003319>.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.